



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**Verificação das Propriedades Antibacteriana e Farmacológica do Óleo Essencial
de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker.**

Nara Kelly Albuquerque Santos

CRATO

2009

NARA KELLY ALBUQUERQUE SANTOS

**Verificação das Propriedades Antibacteriana e Farmacológica do Óleo Essencial
de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

CRATO

2009

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa do Departamento de Química Biológica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Regional do Cariri e co-orientação da Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte.

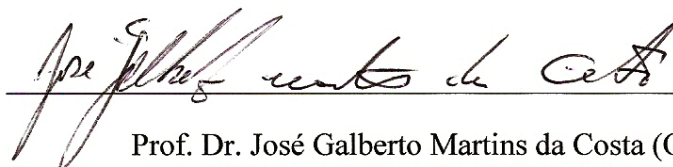
NARA KELLY ALBUQUERQUE SANTOS

**Verificação das Propriedades Antibacteriana e Farmacologica do Oleo
Essencial de *Vanillosmopsis arborea* (Asteracea) Baker**

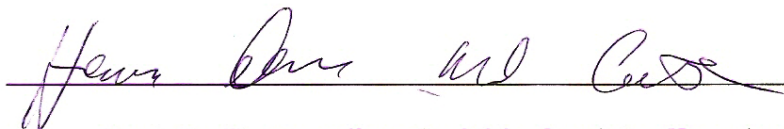
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovada em: 22\07\2009.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Orientador)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Examinador)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Iri Sandro Pampolha Lima (Examinador)
Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ

Dedico aos meus pais, Valdeberto e Francisca de Jesus.
Os grandes responsáveis pela minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

As dificuldades enfrentadas durante este período tornaram o momento ainda mais prazeroso. Um desafio que exigiu esforço, dedicação, perseverança e acima de tudo fé. Acreditar no que fazemos é fundamental para alcançarmos a conquista. Assim, eu só poderia começar agradecendo a Deus, que me enviou de diversas formas, fé e força para superar cada obstáculo desta caminhada até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Valdeberto Gonçalves dos Santos e Francisca de Jesus Albuquerque Santos, meu porto seguro, e minha irmã, Nirley Dayse Albuquerque Santos, pelo apoio incondicional, pela paciência e orações. Pelos momentos de confraternização familiar que adoçam nossas vidas e fortificam nossos laços.

Ao meu querido e amado esposo, Ricardo Alencar Macedo, companheiro de todos os momentos que me dá ânimo e me faz acreditar que sempre é possível. Sua dedicação, amizade, paciência e cumplicidade tornaram o fardo da caminhada muito mais leve. Seu apoio incondicional me fortalece a alma. Seu amor faz minha vida mais feliz. Obrigada por me amar. Obrigada também a sua família.

Ao meu tio Raimundo Gonçalves dos Santos pelo apoio e confiança e por sempre ter acreditado em mim. Saiba que o senhor é e será sempre muito importante na minha vida, um exemplo de humanidade, de humildade, de família... Sinto-me muito honrada por tê-lo fazendo parte da minha vida. Obrigada!

Agradeço ao professor Dr. José Galberto Martins da Costa por acreditar no meu trabalho, pela orientação, apoio e amizade. Pelas oportunidades sempre a mim concedidas. Por me mostrar na prática o mais nobre significado da palavra “orientar”. Obrigada por ser exigente, firme, e ao mesmo tempo amigo, companheiro.

À professora Dra. Glauce Socorro de Barros Viana sempre pronta a ensinar e ajudar, obrigada pela confiança e pela paciência nos ensinamentos.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pelo apoio, amizade e companheirismo, obrigada por ter se mostrado sempre presente nos ensinamentos.

As funcionárias da FMJ, Xênia e Ivna, que se tornaram amigas muito queridas, obrigada pela atenção, pelo apoio e paciência nos ensinamentos.

A FUNCAP, pela concessão da bolsa de estudo.

Quero agradecer aos meus amigos de laboratório pelo espírito de coletividade presente a cada dia, em especial à Fabíola Fernandes, Paula Ferreira, Erlânio Oliveira e Josniel Pires, pelos anos de trabalho, amizade e companheirismo que conquistamos juntos. Para que o tempo nunca desgaste a linda amizade conquistada neste período tão importante de nossas vidas. Sem poder esquecer Eidla Mikaelly pela ajuda inestimável durante os experimentos, Carla Karine, Samara e Thiago pela amizade e companheirismo.

Muitas são as pessoas que passam pelo nosso caminho no decorrer de nossas vidas. Algumas simplesmente passam, outras deixam suas marcas boas ou não. Existem ainda aquelas que nos cativam de tal forma que passam a fazer parte de nossas histórias estejam perto ou longe. Assim são os amigos.

As Famílias Alencar Macedo pela acolhida ajuda, apoio e amizade e por me proporcionar momentos em família durante minha estadia no Crato – Ce.

Aos amigos de curso sempre presentes durante esta caminhada e que serão para sempre lembrados com muito carinho, em especial ao meu querido amigo Glauberto Quirino. Nunca vou esquecer sua disponibilidade em ajudar, nossas conversas em momentos de descontração.

Aos meus amigos quero dizer que não importa o tempo, a distância, nem a falta de notícias. Algo sempre nos unirá porque firmamos bases fortes em nossa amizade. Estudamos, trabalhamos, conversamos e brincamos, ajudamos e apoiamos. Entre piadas e sérios conselhos, choros e risadas, idas e vindas, partidas e reencontros. Fogo, Terra, Água e Ar não podem deixar de existir.

A todos os meus amigos eu desejo: que Deus os faça brilhar sempre forte e bem alto.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURA

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. Produtos Naturais	26
3.2. Óleos Essenciais	28
3.3. <i>Vanillosmopsis arborea</i>	30
3.4. α -bisabolol	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Material botânico	46
4.2. Métodos de Análises	46
4.2.1. Métodos de Análises Cromatográficos	46
4.2.2. Métodos Físicos de Análise	46
4.2.2.a. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	47
4.2.2.b. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e de Carbono – 13 (RMN ¹³ C)	47
4.2.2.c. Espectrometria de Massas (EM)	47
4.3. Obtenção do Óleo Essencial	48
4.4. Tratamento Cromatográfico do Óleo Essencial e Isolamento do α -bisabolol	50
4.5. Atividade Antioxidante	51
4.5.1. Método de Sequestro do Radical DPPH	51
4.6. Avaliação da Atividade Antibacteriana	52
4.6.1. Avaliação Antibacteriana do Óleo Essencial de <i>Vanillosmopsis arborea</i> Através da Técnica de Difusão de Disco	52

4.6.2. Avaliação da Interferência do OEVA sobre a Atividade de alguns Antibióticos	54
4.7. Avaliação Farmacológica do Óleo Essencial de <i>V. arborea</i>	56
4.7.1. Atividade Nocicepitiva e Antiinflamatória	56
4.7.1.a. Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético	56
4.7.1.b. Teste de Formalina	59
4.7.1.c. Edema Induzido pela Injeção Intraplantar de Carragenina	61
4.7.2. Avaliação da Atividade do Sistema Nervoso Central	63
4.7.2.a. Teste de Atividade Exploratória – Campo-aberto	63
4.7.2.b. Tempo de Sono Induzido por Barbitúrico	65
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
6.1. Determinação Estrutural de VA1	69
6.2. Atividade Antioxidante	80
6.3. Resultado da Avaliação Antibacteriana através do Método de Difusão de Disco	82
6.4. Resultado da Avaliação Antibacteriana através do Método de Contato Gasoso	87
6.5. Resultado dos Testes de Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético	89
6.6. Resultado dos Testes de Formalina	91
6.7. Resultado dos Testes de Edema de Pata Induzido pela Injeção Intraplantar de Carragenina	93
6.8. Resultado dos Testes de Campo Aberto	95
6.9. Resultado dos Testes de Tempo de Sono Induzido por Barbitúrico	98
7. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	128

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Estruturas químicas do bisabolol e seus derivados.	44
QUADRO 2. Esquema do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	58
QUADRO 3. Esquema do teste de formalina	60
QUADRO 4. Esquema do teste de edema de pata induzido por carragenina	62
QUADRO 5. Esquema do teste de campo aberto	64
QUADRO 6. Esquema do teste do tempo de sono	66

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1. Metodologia da extração do óleo essencial do caule de <i>V. arborea</i>	49
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker	22
FIGURA 2. Representação fotográfica do método de difusão de disco	53
FIGURA 3. Avaliação da atividade sinérgica do OEVA por contato gasoso	55
FIGURA 4. Estrutura do α -bisabolol	72
FIGURA 5. Cromatograma do óleo essencial de <i>V. arborea</i>	74
FIGURA 6. Espectro de absorção da Região Infravermelho de VA1	75
FIGURA 7. Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de VA1	76
FIGURA 8. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT (75 MHz, CDCl_3) de VA1	77
FIGURA 9. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VA1	78
FIGURA 10. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VA1 (Expandido)	79
FIGURA 11. Representação fotográfica dos melhores resultados da ação antibacteriana sobre cepas de microrganismos estados contra o OEVA	83
FIGURA 12. – Resultado do OEVA testado contra a bactéria <i>S. aureus</i> pelo método de difusão de disco	85
FIGURA 13. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizando camundongos machos Swiss adultos	90
FIGURA 14. Primeira e segunda fase do teste de formalina	92
FIGURA 15. Teste de Edema de pata	94
FIGURA 16. Teste de Campo aberto	97
FIGURA 17. Indução e duração do tempo de sono	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies, derivados e quantificações do bisabolol	33
TABELA 2. Dados de correlação de RMN ^1H e ^{13}C de acordo com análise do espectro DEPT 135°	71
TABELA 3. Comparação dos dados de RMN ^{13}C de VA1 (75 MHz, CDCl_3) com aqueles registrados na literatura para o α -bisabolol	73
TABELA 4. Resultado do teste da atividade antioxidante do OEVA, usando DPPH	81
TABELA 5. Valores das médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano em mm do OEVA através do método de difusão de disco	84
TABELA 6. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) do OEVA	86
TABELA 7. Valores das médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano, em mm, do OEVA através de contato gasoso	88
TABELA 8. Efeito do OEVA sobre edema de pata induzido por carragenina	129
TABELA 9. Efeito do OEVA no teste do campo aberto em camundongos	130
TABELA 10. Efeito do OEVA sobre o tempo de indução e duração do sono induzido por barbitúrico em camundongos	131

LISTA DE ABREVIATURA

ABIFISA – Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde.

AINES – Antiinflamatório não-esteroidal

APA – Área de Proteção Ambiental

ATP – Adenosina tri-fosfato

ANOVA – Análise de Variância

AZI – Azitromicina

BHA – butil-hidroxi-anisol

BHT – 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol

C – Carbono não-hidrogenado

C+ - Controle positivo

C- - Controle Negativo

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

cm – centímetros

CENAUREMN – Centro Nordestino de Aplicação e Usuário de Ressonância Magnética Nuclear

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas

CH – Carbono metínico

CH₂ – Carbono metilênico

CH₃ – Carbono metílico

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLO – Clorafenicol

Cont. – Controle

COX – Enzima Cicloxigenase

°C – Graus Celsius

d – Dupleto

DAINES – Drogas Antiinflamatórias Não-Esteroidais

dd – Duplo dupleto

DMSO – Dimetil sulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DZP – Diazepam
EM – Espectrometria de massas
EPM – Erro Padrão da Média
FIG. – Figura
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FLONA – Floresta Nacional do Araripe
FMJ – Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte
g – Grama
GEN – Gentamicina
H₂O + crem. – Água mais Cremophor
i.p. – Intraperitoneal
i.pl. – Intraplantar
IV – Infravermelho
L – Litro
LCE – Labirinto em Cruz Elevado
m – múltiplo
mg/Kg – miligrama por quilograma
min – minuto
mL – mililitro
mL/Kg – mililitro por quilograma
µg – micrograma
µg/mL – micrograma por mililitro
µL – microlitro
Na₂SO₄ – Sulfato de sódio
ND – Não detectável
NEBA – Número de Entradas nos Braços Abertos
NEBF – Número de Entradas nos Braços Fechados
OEVA – Óleo Essencial de *Vanillosmopsis arborea*
OMS – Organização Mundial de Saúde
Pag. – Página
ppm – Parte por milhão
PTB – Pentobarbital Sódico
q – Quarteto

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

seg. – Segundo

s.pl. – Subplanar

sl – Singleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

t – Tripleto

TET – Tetraciclina

TOB – Tobramicina

TPBA – Tempo de Permanência nos Braços Abertos

TPBF – Tempo de Permanência nos Braços Fechados

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-carboxílico

UV – Ultravioleta

VA1 – Amostra do óleo de *Vanillosmopsis arbórea*

v.o.- Via oral

% - Porcentagem

RESUMO

Vanillosmopsis arborea Baker, é uma arvoreta conhecida popularmente como “candeeiro” e endêmica da biorregião do Araripe. Trata-se de uma planta que possui em seu caule óleo essencial com um elevado valor econômico devido ao alto teor de um de seus constituintes químicos, o α -bisabolol, usado em produtos dermatológicos por apresentar atividades antimicrobiana e antiinflamatória, e também por possuir baixa toxicidade. Na presente dissertação foram investigados os fitoconstituintes presentes no óleo essencial e atividades como antioxidante, antibacteriana (técnicas de difusão de disco e contato gasoso) bem como suas propriedades farmacológicas nos modelos de nocicepção e inflamação (contorções abdominais, formalina a 1% e edema de pata) e nos modelos comportamentais (campo aberto e tempo de sono induzido por pentobabital). Para a técnica de difusão de disco, o óleo essencial de *V. arborea* apresentou inibição de crescimento para as bactérias *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexineri* - com uma inibição considerável em praticamente todas as concentrações testadas. Com a técnica do contato gasoso foi permitido observar que a tetraciclina e tobramicina foram os antibióticos que tiveram a maior interferência do óleo essencial, sendo observada, em quase todas as interações, uma interferência sinérgica, exceto contra a linhagem *P. aeruginosa*, enquanto que a gentamicina mostrou um efeito antagônico contra a cepa *P. vulgaris*. Para as análises farmacológicas, o óleo apresentou diminuição significativa do número de contorções abdominais provocadas pela injeção de ácido acético indicando um efeito antinociceptivo. Para reforçar tal resultado o óleo foi testado em outro modelo de nocicepção (formalina a 1%) e em um modelo de inflamação (edema de pata). Na 1ª fase do teste de formalina observou-se que o óleo essencial teve um efeito antinociceptivo significativo nas doses de 50 e 25 mg/Kg. E na 2ª fase o efeito se mostrou ainda mais intenso em relação ao controle nas mesmas dosagens. De acordo com os resultados do teste de edema de pata o óleo essencial da *V. arborea* diminuiu a capacidade da carragenina de induzir edema na pata dos camundongos em todos os tempos observados, com intensidade maior na 2ª, 3ª e 4ª horas de observação onde ocorre o pico da inflamação confirmando desta forma a ação antiinflamatória do óleo. No modelo comportamental (campo aberto) o óleo essencial de *V. arborea* reduziu o número de *rearing* em todas as doses usadas associada também a uma redução da atividade locomotora sugerindo desta forma uma possível atividade depressora ou sedativa deste óleo. Houve também uma diminuição do *grooming* típico

no caso de drogas ansiolíticas, sedativas ou depressoras. Para o teste de tempo de sono nossos resultados mostram que quanto à indução do sono/seg. não há diferença significativa entre as doses testadas e o controle, já analisando a duração do sono/seg. podemos notar que houve um aumento em relação ao controle demonstrando efeito depressor do Sistema Nervoso Central, sedativo e hipnótico. Os resultados deste trabalho reforçam a utilização popular da planta, não apenas como antiinflamatória, mas também como analgésica, sedativa e depressora.

ABSTRACT

Vanillomopsis arborea Backer is a tiny tree known as “candeeiro” and endemic of Araripe ecozone. It is about a plant that owns in its stem a kind of essential oil with a high economic importance due to the high content of one of its chemical constituents, the α -bisabolol used in dermatological for featuring anti-microbe activities and anti-bacterial and for containing low toxicity as well. In this paper have been investigated the herbal constituents present in the essential oil and tasks such as the anti-oxidant one, the anti-bacterial one (techniques by disc diffusion and gas contact) as well as its pharmacological features in the patterns of nociception and inflammation (abdominal contortions, formaldehyde at 1% and paw edema) and in the behaviorist models (outdoor field and sleep time induced by pentobarbital). For the technique of disc diffusion, the essential oil by *V. arborea* presented growth inhibition for the bacterias *Proteus vulgares*, *Staphylococcus aureus* and *Shigella flexineri* - there has been a considerable inhibition in almost all the concentrations tested. With the gas contact technique it was possible to observe that tetracycline and tobramycin were the antibiotic which had the biggest influence from the essential oil, then it has been possible to observe, in almost all interactions, one synergic interference, except against the *P. aeruginosa*, while the gentamicina showed an antagonistic effect against the *P. vulgares* lineage. For pharmacological analysis, the oil presented a significant decrease in the incident of abdominal contortions caused by the injection of acetic acid, which leads to an anti nociceptive effect. In order to attest such a result the oil was tested in other noniception pattern (formaldehyde at 1%) and in an inflammation model (paw edema). In the first stage of the formaldehyde test it was observed that the essential oil had an effect antinoceptive significative in the 50 and 25 mg/Kg doses, and in the second phase the effect was still shown more intense in relation to the control in the same dosagens. According to the results of the paw edema, tests the essential oil gotten from *V. arborea* the capacity of carrageenan of induce edema into mice's paws in all the seasons observed, with larger intensity in the 2nd, 3rd and 4th hour of observation in which occurs the peak of the inflammation, confirming thus, the oil anti-inflammatory response. In the behaviorist model (outdoor field) the *V. arborea* essential oil has reduced the occurrences of *rearing* in all the dosages used, as well as one reduction of the musculoskeletal activity showing up one possible depressive activity or calmative of this oil. There was also a *grooming* decrease typical in case of calmative drugs. For the

sleep timing test featured that about the sleep/sec. induction there has not been any increase towards the control demonstrating depressive effect on the central nervous system calmative or hypnotic. The results gotten from the assignment reinforce the popular utility of the plant and as analgesic, calmative and depressive.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Devido as suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular (MARTINS *et al.*, 2000). Com o desenvolvimento das ciências naturais e dos mais variados métodos científicos na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica. Esforços têm sido feitos no sentido de melhorar as substâncias naturais aumentando as propriedades desejadas e minimizando seus efeitos adversos (SCHULZ, HANSEL & TYLER, 2002). Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade (CARLINI, 1995).

A procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Diversas plantas da flora brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que dêem suporte científico ao seu uso na terapêutica (SOUZA BRITO & SOUZA BRITO, 1993).

Vanillosmopsis arborea (Asteraceae), conhecida popularmente como candeeiro é uma arvoreta que mede cerca de 4 m e é endêmica da biorregião do Araripe. Trata-se de uma planta que possui em seu caule óleo essencial com um elevado valor econômico devido ao alto teor de um de seus constituintes químicos, o α -bisabolol, bastante utilizado em produtos dermatológicos por apresentar atividades antimicrobiana e antiinflamatória, e também por possuir baixa toxicidade (MATOS *et al.*, 1988).

A biodiversidade da Chapada com suas riquezas naturais têm atraído uma intensa atividade antrópica que resulta em degradação e risco de extinção para várias formas de vida ali existentes. Dentre elas, destacamos a espécie *Vanillosmopsis arborea* Baker (Figura 1), uma arvoreta que mede cerca de 4m de altura e que ao longo dos anos vem sendo dizimada (CAVALCANTI & NUNES, 2002).

Na perspectiva de oferecer maiores subsídios para a complementação das informações científicas sobre a espécie *V. arborea*, o presente trabalho aborda a extração do óleo essencial do caule do candeeiro e sua caracterização química, bem como a avaliação de suas atividades antibacteriana, antioxidante e farmacológica.



Figura1 - *Vanillosmopsis arborea* Baker

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* com relação à sua composição química, suas propriedades biológicas e farmacológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial do candeeiro;
- Isolar e purificar o constituinte principal, o α -bisabolol, através de técnicas cromatográficas;
- Determinar a atividade antibacteriana por difusão de disco;
- Verificar as atividades nociceptiva e antiinflamatória;
- Verificar as atividades ansiolítica, sedativa e depressora do sistema nervoso central;
- Verificar o potencial antioxidante através do método de seqüestro de radical livre;
- Verificar a ação sinérgica ou antagônica do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* por contato gasoso.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produtos Naturais

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A medicina tradicional chinesa foi desenvolvida com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos.

Com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas têm representado a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (HOSTETTMANN, QUEIROZ & VIEIRA, 2003). No início do século passado, esses recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e se estabeleceu a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos” (SIMÕES *et al.*, 2007).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na década de 70. Este órgão internacional aponta que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas como medicamento para atender às necessidades de cuidados primários de saúde (LIMA, 2006).

Ainda é do reconhecimento da OMS que as práticas da medicina tradicional foram difundidas globalmente na última década e ganharam popularidade. É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas, visto que o uso desta prática vem sendo incentivado não somente pelos profissionais que atuam na rede básica de saúde dos países em desenvolvimento, mas também naqueles onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local (LIMA, 2006).

De acordo com a ABIFISA (Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde), os fitoterápicos movimentariam, anualmente, no Brasil, cerca de US\$ 400 milhões e representariam cerca de 6% das vendas do setor de medicamentos. É de se esperar que em 2010, esses medicamentos cheguem a alcançar 15% da fatia do mercado, com US\$ 2 bilhões de vendas ao ano (LIMA, 2006).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% da flora mundial, e não menos de 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas. Entre os elementos que constituem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (Brasil. Ministério da Saúde, 2006). Além de seu uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (TOLEDO ACO *et al.*, 2003).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

3.2. Óleos Essenciais

Os Óleos essenciais são do ponto de vista químico, misturas bastante complexas constituídas por vários componentes orgânicos, principalmente tratando-se de mono- e sesquiterpenóides. Geralmente esses produtos naturais possuem atividade antimicrobiana (SHANE *et al*, 1999), entretanto a complexidade da composição química dificulta freqüentemente a explicação de atividades supracitadas (RUBERTO & BARATTA, 2000). Se excluirmos o fato de alguns componentes fenólicos cuja atividade antimicrobiana e antioxidante é bem conhecida e amplamente documentada (HELANDER *et al*, 1998; YANISHLIEVA *et al*, 1999), e alguns outros exemplos de combinações puras (AESCHBACH *et al*, 1994; MADSEN & BERTELSEN, 1995), nada é conhecido sobre a efetividade da maioria dos componentes (RUBERTO & BARATTA, 2000). A avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais é bastante problemática devido a muitos fatores como a composição e solubilidade do óleo, a fonte do organismo de teste usada, e a quantidade da combinação ativa no óleo essencial (KAMATOU *et al*, 2005).

Os óleos essenciais são conhecidos por possuir potencial como agentes naturais para preservação de comida; na realidade a sua efetividade contra uma gama extensiva de microorganismos foi demonstrada repetidamente (BARATTA *et al*, 1998a; BARRATTA *et al*, 1998b; DEANS, 1991; DEANS & RITCHIE, 1987; HELANDER *et al*, 1998). Além desta atividade muitos óleos essenciais foram qualificados como antioxidantes naturais (AESCHBACH *et al*, 1994; BARATTA *et al*, 1998a; BARATTA *et al*, 1998b; YANISHLIEVA, *et al.*, 1999), e propostos como potenciais substitutos de antioxidantes sintéticos em setores específicos de preservação de comida onde o seu uso não está em contraste com o seu aroma (RUBERTO E BARATTA, 2000).

Os óleos essenciais e vários extratos de plantas provocaram interesse como fontes de produtos naturais. Eles foram escolhidos por seus usos potenciais como remédios para o tratamento alternativo de muitas doenças infecciosas e a preservação de comidas dos efeitos oxidantes tóxicos. Particularmente, as atividades antimicrobianas de óleos e extratos de planta formaram a base de muitas aplicações, incluindo preservação de comida crua, medicamentos comerciais, alternativos e terapias naturais (LISBALCHIN & DEANS, 1997; REYNOLDS, 1996). Além disso, eles oferecem um modo efetivo para prevenir o desenvolvimento de combinações indesejáveis que resultam da peroxidação de lipídio em comidas (WANG *et al*, 1998). São permitidos como

elementos aditivos de comida selecionada (WENG & WANG, 2000). Por causa da possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos (BHA e BHT), foi dirigido um aumento na atenção para antioxidantes naturais (NAIMIKI, 1990).

Pela utilização crescente nas indústrias de alimento, cosmética e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a extração de óleos essenciais constituem importante atividade econômica. Embora a utilização maior ocorra nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticas (perfumes e produtos de higiene), também em farmácias, drogas vegetais ricas em óleos voláteis são empregadas *in natura* para a preparação de infusões e/ou sob a forma de preparações galênicas simples (SIMÕES, 2007).

3.3. *Vanillosmopsis arborea*

Vanillosmopsis arborea (Asteraceae), popularmente conhecida como candeeiro, representa uma das sete espécies nativas do Brasil do gênero *Vanillosmopsis*. O óleo essencial dessa espécie possui um elevado valor econômico devido ao alto teor do seu principal constituinte químico, o α -bisabolol, compondo aproximadamente 70% do óleo. Esse constituinte químico é bastante utilizado pelas indústrias de cosméticos e de medicamentos devido suas propriedades farmacológicas (MATOS *et al.*, 1988). Recentes estudos mostram que o rendimento do óleo a partir da madeira chega a 0,6%, e que o mesmo além de apresentar atividades antimicrobiana, antifúngica e antiinflamatória, possui também baixa toxicidade (LIMA, SILVA & CAVALCANTI, 2006).

Trata-se de uma planta que possui uma madeira de boa qualidade, muito resistente às intempéries e com alto teor de óleo essencial. O nome popular candeeiro, pela qual é conhecida na região do cariri, se deve ao fato de que a madeira dessa planta promove queima fácil provocando chama intensa (CAVALCANTI & NUNES, 2002).

Além das propriedades citadas, o óleo essencial dessa planta foi testado por Furtado *et al.* (2005) que verificaram sua atividade larvicida contra o mosquito da dengue (*Aedes aegypti*), principal inseto-transmissor da dengue nos países tropicais. Os autores verificaram que dentre os óleos essenciais testados, foi o que apresentou maior efeito.

A espécie em estudo é endêmica da biorregião do Araripe localizada no sertão do Nordeste brasileiro, na interseção dos estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, abrangendo uma área de aproximadamente 10.000 Km². A bacia é dominada por um planalto sedimentar com altitude média de 800 m, denominado Chapada do Araripe.

3.4. α -bisabolol

O α -bisabolol, também conhecido por levomenol é um álcool sesquiterpênico monocíclico com bastante utilidade em diversas linhas industriais. Possui grande tendência para sofrer oxidação, tendo como principal produto o óxido-bisabolol, cuja atividade antiinflamatória é menor que 50%, quando comparado com o substrato (SCHILCHER, 1987).

O α -bisabolol pode ser isolado de óleos essenciais de uma variedade de plantas, arbustos e árvores. Como exemplo mais comum temos o óleo essencial de *Chamomilla recutita* que contém o α -bisabolol como componente principal que contribui entre outros com o efeito antiinflamatório moderado da camomila (JAKOVLEV & SCHLICHTEGROLL, 1969; JAKOVLEV *et al*, 1979). Devido ao seu uso atóxico em animais, é extensamente usado em preparações cosméticas. Porém, só alguns relatos científicos descrevem os efeitos biológicos do α -bisabolol (HERNANDEZ-CERUELOS, MADRIGAL-BUJAJIDAR & DE LACRUZ, 2002; VILLEGAS *et al*, 2001).

De acordo com Cavalieri *et al*. (2004) o α -bisabolol pode ser considerado como um indutor promissor de apoptose em células de glicoma altamente malignas, visto que não é tóxico em animais nem reduz a viabilidade de células normais. Apesar de seu efeito em células malignas, ele não induziu qualquer citotoxicidade em células normais de rato.

Essa substância é caracterizada fisicamente por se apresentar na forma oleosa e viscosa, além de ter propriedade inodora. Pode ser obtida de óleos essenciais de diversas fontes vegetais, como pode ser observado na Tabela 1. O bisabolol é conhecido por ter propriedades antiirritantes, antiinflamatórias e antimicrobianas, tendo sido utilizado durante centenas de anos em cosméticos por causa das suas propriedades que ajudam na saúde da pele.

Embora o α -bisabolol seja o componente principal do óleo essencial e apresente várias atividades biológicas, o mesmo não apresenta atividade claramente contra o *S. aureus* (NASCIMENTO *et al*, 2007). Enquanto que o mesmo devido a sua baixa toxicidade apresenta boa atividade antifúngica, podendo representar um agente terapêutico e servir como adjuvante no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (PAULI, 2006).

Uma fonte bastante pertinente de óleo essencial que apresenta o α -bisabolol como componente majoritário é *Vanillosmopsis arborea*. A importância deste óleo foi demonstrada durante o desenvolvimento de um programa de pesquisa com produtos naturais micromoleculares na Universidade Federal do Ceará, quando uma investigação química não dirigida, revelou a presença de um metabólito com atividade antiinflamatória conhecido como α -bisabolol (MATOS, 1990). Daí em diante essa espécie vegetal vem sendo alvo de muitos estudos, com abordagens químicas, farmacológicas, microbiológicas e agrônomicas (CAVALCANTI & NUNES, 2002).

Este capítulo trata da revisão bibliográfica sobre α -bisabolol e seus derivados identificados e/ou isolados em diversos gêneros e espécies de fontes naturais, bem como as atividades relatadas, desde 2000 até os dias atuais. A revisão foi realizada no Chemical Abstract, usando como palavra chave “bisabolol”, e refinada pelo termo “natural products”, resultando em 189 referências, e, tendo como base a “activity biological”. Refinada pelo nome “ α -bisabolol”, a pesquisa resultou em 142 referências.

Esta pesquisa nos permitiu a formatação da Tabela 1, pag. 33 e do quadro 1, pag. 44 onde estão agrupados as respectivas espécies, derivados, quantificações e referências.

Tabela 1. Espécies, derivados e quantificações do bisabolol.

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Achillea aleppica</i> DC. <i>Subsp. Aleppica</i>	α - bisabolol (0,9) Óxido de bisabolol (0,6) Óxido A de α -bisabolol (3,6) Óxido B de α -bisabolol (1,1) Óxido A de bisabolone (0,4)	ISCAN <i>et al.</i> , 2006
<i>Achillea millefolium</i>	α - bisabolol (5,5) Óxido B de α -bisabolol (0,2)	SULEIMENOV <i>et al.</i> , 2001
<i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>Millefolium</i>	α - bisabolol (2,1) Óxido de bisabolol (3,8)	CANDAN <i>et al.</i> , 2003
<i>Achillea nobilis</i>	α - bisabolol (0,1)	SULEIMENOV <i>et al.</i> , 2001
<i>Achillea grandiflora</i>	β -bisaboleno (0,5)	SULEIMENOV <i>et al.</i> , 2001
<i>Achillea ligustica</i> All.	α - bisabolol (0,4)	FILIPPI <i>et al.</i> , 2006
<i>Achillea setacea</i>	Óxido B de bisabolol (1,2) Óxido de bisabolone (3,7)	ÜNLU <i>et al.</i> , 2002
<i>Achyrocline satureioides</i>	β -bisabolol (1,1)	GILLIJ <i>et al.</i> , 2008
<i>Ageratina adenophora</i>	<i>epi</i> -bisabolol (4,7) β -bisaboleno (3,2) (Z)- γ -bisaboleno (tr)	PALÁ-PAÚL <i>et al.</i> , 2002
<i>Anemia tomentosa</i>	α - bisabolol (51,4) β -bisaboleno (1,5) Óxido de α - bisabolol (1,1)	* GILLIJ <i>et al.</i> , 2008
<i>Angelica pubescens</i>	α - bisabolol (2,8)	SONG <i>et al.</i> , 2004
<i>Apis millifera anatolica</i>	α - bisabolol (2,02)	SILICI e KUTLUCA, 2005
<i>Apis millifera carniça</i>	α - bisabolol (1,24)	SILICI e KUTLUCA 2005

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Apis millifera caueasica</i>	α - bisabolol (0,81)	SILICI e KUTLUCA 2005
<i>Arnica longifolia</i>	α - bisabolol (8,2) Óxido B de α - bisabolol (0,5)	TABANCA <i>et al.</i> , 2007
<i>Artemisia absinthium</i>	α - bisabolol (0,2)	LOPES-LUTZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Artemisia aucheri</i>	α - bisabolol (0,92)	HASHEMI <i>et al.</i> , 2007
<i>Artemisia glauca</i>	α - bisabolol (0,1) β -bisabolol (0,2) <i>epi</i> -bisabolol (0,1)	POLYANSKAYA <i>et al.</i> , 2007
<i>Artemisia molinieri</i>	α - bisabolol (0,6) Óxido B de α -bisabolol (2,5) Óxido A de α -bisabolol (1,4)	MASOTTI <i>et al.</i> , 2003
<i>Artemisia verlotiorum</i>	<i>epi</i> -bisabolol (0,5)	CHERICONI <i>et al.</i> , 2004
<i>Aster hesperius</i>	α - bisabolol (0,8)	TABANCA <i>et al.</i> , 2007
<i>Auxemma glazioviana</i>	α - bisabolol (46,38)	COSTA <i>et al.</i> , 2002
<i>Cananga odorata</i>	β -bisabolol (2,96) β -bisaboleno (0,04)	KRISTIAWAN <i>et al.</i> , 2008
<i>Cannabis sativa</i>	α - bisabolol (0,71)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Carum nigrum</i>	α - bisabolol (0,5) β -bisaboleno (0,1) <i>cis</i> - γ -bisaboleno (0,4) <i>trans</i> - α -bisaboleno (0,1)	SINGH e MARIMUTHU, 2006
<i>Cedrelopsis grevei</i> Baill.	α - bisabolol (1,1) β -bisaboleno (tr)	GAUVIN <i>et al.</i> , 2004
<i>Centaurea mucronifera</i>	α - bisabolol (2,0)	DURAL <i>et al.</i> , 2003

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Centaurea chrysantha</i>	α - bisabolol (4,9) β -bisabolol (tr) β -bisaboleno (1,2)	DURAL <i>et al.</i> , 2003
<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rausch.	α -bisabolol (41,54) Óxido B de α - bisabolol (3,61) Óxido A de α - bisabolol (0,42) bisabolon-oxido (1,07)	*SZÖKE <i>et al.</i> , 2004
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	α - bisabolol (0,8)	FLAMINI, CIONI & MORELLI, 2003
<i>Chrysanthemum indicum</i>	<i>epi</i> -bisabolol (1,61)	SHUNYING <i>et al.</i> , 2005
<i>Citrus aurantifolia</i>	α - bisabolol (0,2) β - bisabolol (0,4) (<i>E</i>)- γ -bisaboleno (0,2)	YADAV <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus bergamia</i>	β -bisaboleno (0,43) (<i>E</i>)- γ -bisabolol (0,01) α -bisabolol (0,03)	MONDELLO <i>et al.</i> , 2003 e SOKOVIC <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrus limon</i>	α - bisabolol (0,02) γ -bisaboleno (0,007) β - bisaboleno (1,29)	MONDELLO <i>et al.</i> , 2003 e SOKOVIC <i>et al.</i> , 2006
<i>Clausena lansium</i>	α – bisabolol (13,7)	ZHAO <i>et al.</i> , 2004
<i>Copaifera cearensis</i>	β -bisabolol (8,2) β -bisabololeno (2,8)	VEIGA JR <i>et al.</i> , 2007
<i>Copaifera multijuga</i>	β -bisabolol (0,1) β -bisabololeno (0,3) Óxido de α -bisabololeno (0,4)	VEIGA JR <i>et al.</i> , 2007

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Copaifera reticulata</i>	β -bisabolol (0,4) β -bisabololeno (0,8)	VEIGA JR <i>et al.</i> , 2007
<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk	α - bisabolol (13,86) β -bisaboleno (0,55)	CHENG <i>et al.</i> , 2008
<i>Curcuma longa</i>	β -bisaboleno (1,23)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Daucus carota</i> L.	α - bisabolol (0,2) β - bisaboleno (21,3) (<i>E</i>)- α -bisaboleno (1,1)	ROSSI <i>et al.</i> , 2007
<i>Elionurus elegans</i> Kunth	α - bisabolol (1,6) <i>epi</i> -bisabolol (2,6) β - bisaboleno (0,3) <i>cis</i> - γ -bisaboleno (0,2) bisabolen-2-ol (0,4) bisabolenol (0,3) bisabolono (3,9)	*MEVY <i>et al.</i> , 2002
<i>Elsholtzia splendens</i>	α - bisabolol (0,13)	CHOI <i>et al.</i> , 2008
<i>Eremanthus erythropappus</i>	α - bisabolol (63,0) β -Bisaboleno (2,7) Óxido de α - bisabolol (6,6)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2007
<i>Eugenia</i> sp. A	α - bisabolol (0,4)	COLE <i>et al.</i> , 2007
<i>Eugenia</i> sp. B	<i>trans</i> - α -bisaboleno (tr) β -bisaboleno (0,1)	COLE <i>et al.</i> , 2007
<i>Eryngium amethystinum</i>	α - bisabolol (0,6) β - bisabolol (2,6) β -bisaboleno (0,9)	FLAMINI <i>et al.</i> , 2008
<i>Eryngium palmatum</i>	α - bisabolol (6,8) β -bisaboleno (0,2)	CAPETANOS <i>et al.</i> , 2007
<i>Eryngium serbicum</i>	β -bisaboleno (0,7)	CAPETANOS <i>et al.</i> , 2007

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Filipendula hexapetala</i>	Óxido B de α -bisabolol (0,8)	PAVLOVIC <i>et al.</i> , 2007
<i>Fistulina hepatica</i>	Óxido B de α -bisabolol (tr)	WU <i>et al.</i> , 2005
<i>Ganoderma lucidum</i>	α - bisabolol (2,0) Óxido B de α -bisabolol (0,9)	ZIEGENBEIN <i>et al.</i> , 2006
<i>Haplopappus bustillosianus</i>	α - bisabolol (tr)	URZÚA <i>et al.</i> , 2007
<i>Helichrysum italicum</i>	α - bisabolol (0,8)	MASTELIC <i>et al.</i> , 2005
<i>Helichrysum petiolare</i>	β - bisabolol (0,8)	LOURENS <i>et al.</i> , 2004
<i>Hexalobus crispiflorus</i>	<i>epi</i> -bisabolol (1,47)	BOYOM <i>et al.</i> , 2003
<i>Juniperus drupacea</i> L.	α - bisabolol (0,21)	EL-GHORAB <i>et al.</i> , 2008
<i>Kadsura longepedunculata</i>	α - bisabolol (1,8)	SONG <i>et al.</i> , 2007
<i>Lantana achyranthifolia</i>	α - bisabolol (11,23) β -bisaboleno (5,68)	HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2005
<i>Laurus nobilis</i>	α - bisabolol (0,84)	KOVACEVIC <i>et al.</i> , 2007
<i>Lavandula canariensis</i> (L.) Mill.	α - bisabolol (1,5) β -bisaboleno (20,8)	PALÁ-PAÚL <i>et al.</i> , 2004
<i>Lingularia kanaitzensis</i>	β - bisabolol (tr)	TORI <i>et al.</i> , 2008
<i>Lychnophora ericoides</i>	α - bisabolol (76,4) <i>epi</i> -bisabolol (2,45)	*CURADO <i>et al.</i> 2006
<i>Matricaria chamommilla</i>	α - bisabolol (2,31) Óxido B de α - bisabolol (4,31) Óxido de α - bisabolol (5,30) Óxido A de α - bisabolol (41,77) <i>trans</i> - γ -bisaboleno (8,48)	*HERNÁNDEZ-CERUELOS <i>et al.</i> , 2002 e SOKOVIC <i>et al.</i> , 2006

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Matricaria recutita</i> L.	α - bisabolol (6,6) Óxidos A e B de α - bisabolol (27 % e 27,5 %)	*GANZERA <i>et al.</i> , 2006
<i>Mentha spicata</i>	α - bisabolol (0,3) α -bisaboleno (0,3)	VIAN <i>et al.</i> , 2008
<i>Nepeta cataria</i> L.	α - bisabolol (0,1) β -bisaboleno (0,5)	BARANAUSKIENE <i>et al.</i> , 2003
<i>Notoptergium incium</i>	α - bisabolol (0,77) <i>trans-Z</i> - α -bisaboleno epoxido (0,76)	GUO <i>et al.</i> , 2003
<i>Ocimum americanum</i>	α - bisabolol (0,03)	JIROVETZ <i>et al.</i> , 2003
<i>Ocimum basilicum</i> L.	α - bisabolol (0,08) β - bisabolol (0,03) α - bisabololeno (0,05) <i>cis</i> - γ -bisaboleno (2,48)	JIROVETZ <i>et al.</i> , 2003 e TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Ocimum canum</i>	α - bisabolol (0,11)	OUSSOU <i>et al.</i> , 2004
<i>Ocimum gratissimum</i>	α - bisabolol (0,02) β - bisabolol (0,06) α - bisabololeno (0,08)	JIROVETZ <i>et al.</i> , 2003
<i>Ocimum sanctum</i>	α - bisabolol (0,44) β - bisabolol (0,23) α - bisabololeno (0,13)	JIROVETZ <i>et al.</i> , 2003
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	α - bisabolol (0,03)	KOTHARI <i>et al.</i> , 2004
<i>Ocotea quixos</i>	<i>cis</i> - γ -bisaboleno (0,89)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Origanum dictamnus</i> L.	β -bisaboleno (0,3)	CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2004
<i>Origanum floribundum</i>	β - bisabololeno (0,2) α - bisabololeno (tr)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Origanum glandulosum</i>	β - bisabololeno (0,9) α - bisabololeno (tr)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006
<i>Origanum vulgare</i> L.	α - bisabolol (0,1) β - bisabolol (0,3) <i>epi</i> - α -bisabolol (0,3) β -bisaboleno (1,6)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006 e NOSTRO <i>et al.</i> , 2004
<i>Osyris tenuifolia</i>	<i>epi</i> - bisabolol (5,1) (<i>Z</i>)- α -bisaboleno (tr) β - bisaboleno (3,7) (<i>Z</i>)- γ - bisaboleno (tr) (<i>E</i>)- α -bisaboleno (tr) (7 <i>Z</i> , 10 <i>Z</i>)-bisabolatrien-13- ol (5,6)	KREIPL e KÖNIG, 2004
<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	α - bisabolol (tr)	VAN TOL <i>et al.</i> , 2002
<i>Peperomia galioides</i>	α - bisabolol (tr) β - bisabolol (tr)	*VILLEGAS <i>et al.</i> , 2001
<i>Peperomia sui</i>	β - bisabolol (tr)	* CHENG <i>et al.</i> , 2003
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	α - bisabolol (0,84) β -bisaboleno (0,15)	BARRA <i>et al.</i> , 2007
<i>Photinia serrulata</i>	α -bisabolol (0,57) <i>epi</i> -bisabolol (3,0) β -bisaboleno (0,37)	JIE <i>et al.</i> , 2007
<i>Pimpinella junoniae</i>	α - bisabolol (1,3) β -bisaboleno (6,1)	VELASCO- NEGUERUELA <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus nigra</i>	<i>cis</i> - γ -bisaboleno (0,4)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Prangos pabularia</i> Lindl.	α - bisabolol (0,23) <i>epi</i> -bisabolol (1,53) β -bisaboleno (0,1) (<i>E</i>)- α -bisaboleno (0,3) γ -bisaboleno (tr)	ÖZEK <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhaponticum acaule</i> DC	α - bisabolol (1,2) β - bisabolol (4,8)	BOUSSAADA <i>et al.</i> , 2008
<i>Rosmarinus officinalis</i>	α - bisabolol (2,1)	MATA <i>et al.</i> , 2007
<i>Salvia albicaulis</i> Benth.	<i>epi</i> - bisabolol (2,0)	KAMATOU <i>et al.</i> , 2007
<i>Salvia cryptantha</i>	α - bisabolol (0,4)	TEPE <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvia hydrangea</i>	α - bisabolol (0,5) β - bisabolol (2,2)	*KOTAN <i>et al.</i> , 2008
<i>Salvia multicaulis</i>	α - bisabolol (0,4)	TEPE <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvia officinalis</i>	α - bisabolol (0,13)	TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Salvia repens</i>	α - bisabolol (0,7)	KAMATOU <i>et al.</i> , 2005
<i>Salvia runcinata</i>	α - bisabolol (41,1) <i>epi</i> - bisabolol (2,1) Óxido B de α - bisabolol (1,7)	*KAMATOU <i>et al.</i> , 2005
<i>Salvia stenophylla</i>	α - bisabolol (8,2)	*KAMATOU <i>et al.</i> , 2005
<i>Santalum album</i>	α - bisabolol (tr)	JONES <i>et al.</i> , 2006
<i>Satureja biflora</i>	α - bisabolol (1,78) Óxido B de α -bisabolol (8,77)	VAGIONAS <i>et al.</i> , 2007
<i>Satureja Montana</i>	α - bisabolol (0,14) β - bisaboleno (1,97)	MICHAELAKIS <i>et al.</i> , 2007

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Satureja parnassica</i> subsp. <i>Parnassica</i>	α -bisabolol (0,11) β - bisaboleno (2,0)	CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2006 e CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2004
<i>Satureja spinosa</i> L.	α - bisabolol (0,24) β - bisaboleno (3,26)	MICHAELAKIS <i>et al.</i> , 2007
<i>Satureja thymbra</i>	α - bisabolol (0,24) β - bisaboleno (1,03)	CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2006
<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>Clandestina</i>	α - bisabolol (7,06) β -bisaboleno (1,63)	ALIGIANNIS <i>et al.</i> , 2001
<i>Sideritis erytrantha</i> var. Boiss. & Heldr. Apud	α – bisabolol (>10)	KIRIMER <i>et al.</i> , 2004
<i>Sideritis italica</i> (Miller)	α - bisabolol (4,9) β -bisaboleno (1,8)	BASILE. <i>et al.</i> , 2006
<i>Sideritis phlomoides</i> Boiss. & Bal.	α - bisabolol (>10)	KIRIMER <i>et al.</i> , 2004
<i>Sideritis raeseri</i> subsp. <i>Attica</i>	β –bisaboleno (0,22)	ALIGIANNIS <i>et al.</i> , 2001
<i>Sideritis raeseri</i> subsp. <i>Raeseri</i>	α - bisabolol (1,25) β -bisaboleno (0,87)	ALIGIANNIS <i>et al.</i> , 2001
<i>Sideritis species nova</i>	β –bisabolol (>10)	KIRIMER <i>et al.</i> , 2004
<i>Sideritis syriaca</i> subsp. <i>Syriaca</i>	α - bisabolol (0,29) β -bisaboleno (0,57)	ALIGIANNIS <i>et al.</i> , 2001
<i>Sideritis taurica</i> Stephan ex Willd.	α - bisabolol (10,0)	KIRIMER <i>et al.</i> , 2004

Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Stachys alopecuroides</i> (L.) Benth	α - bisabolol (1,8) β - bisabolol (6,8) (Z)- γ -bisaboleno (0,3)	SKAL TSA <i>et al.</i> , 2003
<i>Stachys cretica</i> L. ssp. <i>Cretica</i>	β – bisabolol (2,1) β -bisaboleno (0,7)	SKAL TSA <i>et al.</i> , 2003
<i>Stachys euboica</i> Rech	α - bisabolol (2,6) β -bisaboleno (0,5) (E)- γ -bisaboleno (0,3)	SKAL TSA <i>et al.</i> , 2003
<i>Stachys menthifolia</i> Viss.	α - bisabolol (0,2)	SKAL TSA <i>et al.</i> , 2003
<i>Stachys germanica</i> L. ssp. <i>heldreichii</i> (Boiss.) Hayek	α - bisabolol (1,2) β - bisabolol (1,3) (E)- γ -bisaboleno (0,3)	SKAL TSA <i>et al.</i> , 2003
<i>Teucrium atratum</i>	α - bisabolol (tr)	KABOUCHE <i>et al.</i> , 2005
<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>Aurasiacum</i>	α - bisabolol (tr)	KABOUCHE <i>et al.</i> , 2005
<i>Teucrium turredanum</i>	β - bisabolol (8,3) <i>cis</i> - γ -bisaboleno (6,9)	ALI <i>et al.</i> , 2008
<i>Thymus fontanesii</i>	α - bisabolol (0,1)	KABOUCHE <i>et al.</i> , 2005
<i>Thymus guyonii</i>	β -bisaboleno (2,5) α -bisaboleno (0,1)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006
<i>Thymus longicaulis</i> L.	β – bisaboleno (2,03)	CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2004
<i>Thymus munbyanus</i>	β -bisaboleno (0,1)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006
<i>Thymus numidicus</i>	α - bisabolol (0,4) β -bisaboleno (3,4) α - bisabololeno (0,4)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006
<i>Thymus pallescens</i>	β -bisaboleno (0,5) α -bisaboleno (0,1)	HAZZIT <i>et al.</i> , 2006

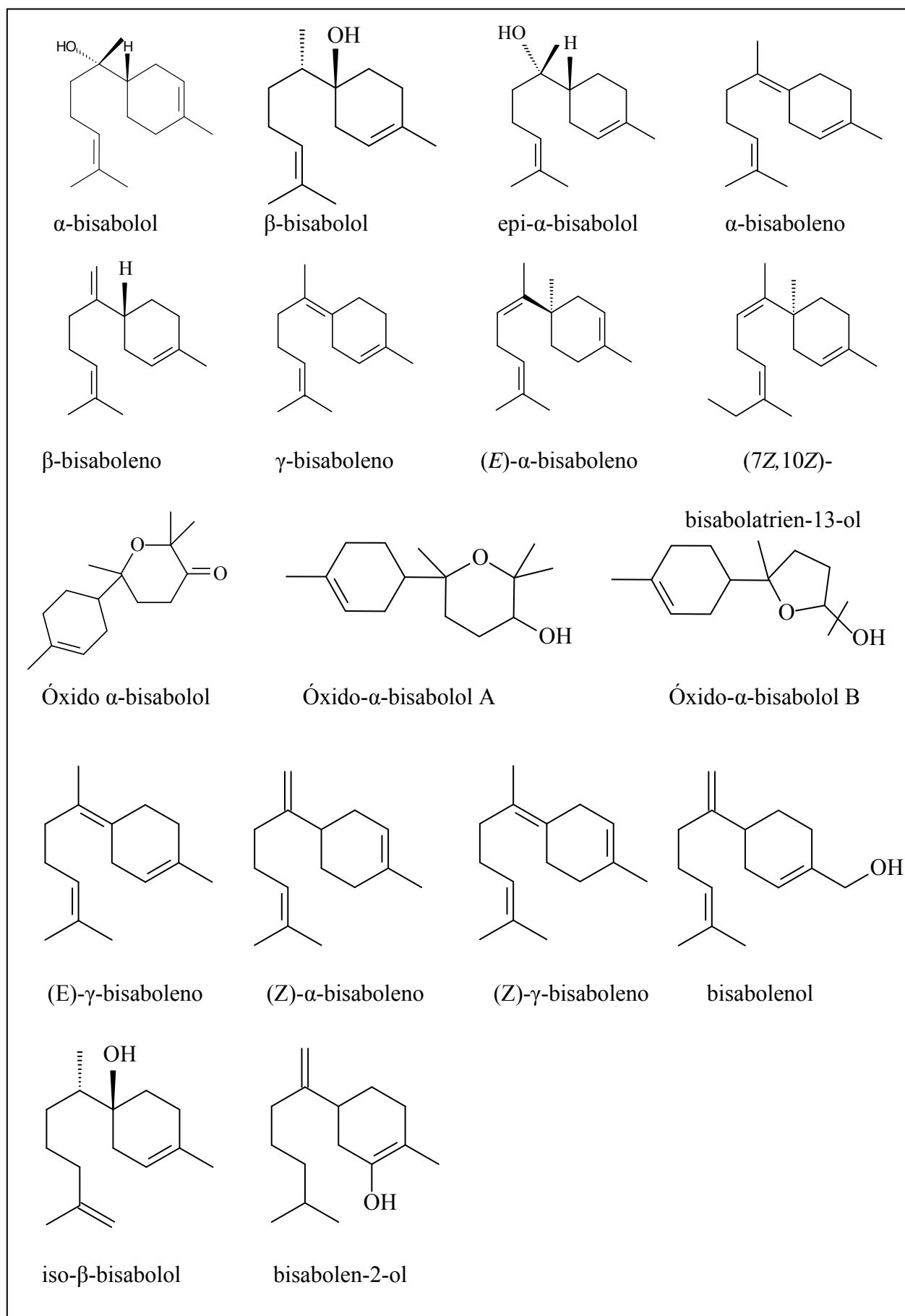
Continuação (Tabela 1)

Espécie	(%) de bisabolol e/ou derivados	Referências
<i>Trametes gibbosa</i>	β -bisaboleno (tr) α -bisabolol (0,02)	THAKEOW <i>et al.</i> , 2008
<i>Valeriana officinalis</i> L.	α -bisabolol (0,91) <i>epi</i> -bisabolol (0,6) β -bisaboleno (0,4)	LETCHAMO <i>et al.</i> , 2004 e SAFARALIE <i>et al.</i> , 2008
<i>Vanillosmopsis pohlii</i> <i>Baker</i>	α -bisabolol (89,9) Óxido de bisabolol (2,4)	*DE ANDRADE <i>et al.</i> , 2004
<i>Xanthoxylum piperitum</i> DC.	α -bisabolol (0,66)	JIANG e KUBOTA <i>et al.</i> , 2004
<i>Zingiber officinale</i>	α -bisabolol (0,21) β -bisaboleno (2,49) <i>cis</i> - γ -bisaboleno (3,84)	BARTLEY <i>et al.</i> , 2000 e TOGNOLINI <i>et al.</i> , 2006

Tr: Traço

Nesta pesquisa bibliográfica foi observado que, apenas 12 espécies apresentam atividades relacionadas ao α -bisabolol, indicadas na tabela com “asterisco”. Destas três apresentam atividade inseticida (*Anemia tomentosa*, *Salvia hydragea* e *Vanillosmopsis pohlii*), cinco apresentam atividade antiinflamatória (*Chamomilla recutita*, *Lychnophora ericoides*, *Matricaria recutita*, *Salvia runcinata* e *Salvia stenophylla*), duas antimicrobiana (*Chamomilla recutita* e *Matricaria recutita*), duas antioxidante (*Elionurus elegans* e *Matricaria chamomilla*), uma analgésica (*Lychnophora ericoides*), uma cicatrizante (*Peperomia galioides*) e uma citotóxica (*Peperomia sui*). Quatro espécies apresentaram teores de α -bisabolol acima de 50%.

QUADRO 1. Estruturas químicas do bisabolol e seus derivados.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material botânico

Na realização deste estudo foi utilizado o caule de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae), que foi coletada na linha D da Floresta Nacional do Araripe, município do Crato, Ceará. A exsicata do espécime coletada encontra-se depositada (# 18639) no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri.

4.2. Métodos de análise.

4.2.1. Métodos de Análises Cromatográficos.

Os processos cromatográficos empregados na separação, identificação e quantificação dos constituintes foram diversificados. A cromatografia de adsorção em coluna, a mais comumente utilizada, foi realizada empregando-se como fase estacionária a sílica gel ($\phi=0,05 - 0,20\text{mm}$). Na cromatografia em camada delgada a sílica gel 60 G, cód. 1094 da VETEC, foi utilizada como adsorvente.

Para revelação das substâncias presentes no material em placas analíticas de sílica foi realizada a exposição das mesmas em câmara de iodo, e observadas após o aparecimento de manchas.

As fases móveis empregadas nos processos foram os solventes: éter de petróleo, dicloro-metano e clorofórmio, isoladamente ou em misturas binárias de modo a obter-se polaridade adequada.

4.2.2. Métodos Físicos de Análise.

Os vários espectros foram obtidos em aparelhos instalados na central analítica do Centro Nordestino de Aplicação e Usuário de Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN, da Universidade Federal do Ceará e no Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

4.2.2.a. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro PERKIN - ELMER, modelo FT – IR Spectrum 1000, utilizando-se filmes de KBr para análise do material.

4.2.2.b. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono – 13 (RMN ^{13}C).

Os espectros de ressonância magnética nuclear protônica (RMN ^1H) e ressonância magnética nuclear de carbono - 13 (RMN ^{13}C) uni – e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker, modelos Avance DPX – 300 e Avance DRX – 500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para o hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono - 13, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm), tendo como referência no caso dos espectros de RMN ^1H , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado utilizado: clorofórmio (CDCl_3 , δ 7,24). Para os espectros de RMN ^{13}C , a referência utilizada foi o clorofórmio (δ 77,0). As multiplicidades dos sinais em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multipeto). O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da técnica de DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), com ângulo de nutação de 135° e foi descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados através da subtração dos sinais espectrais observados nos espectros BB (*Broad Band*) e DEPT 135° .

4.2.2.c. Espectrometria de Massas (EM).

Os espectros de massas dos óleos essenciais foram registrados em espectrômetro de massas Hewlett – Packard, modelo HP5971 A acoplado a cromatógrafo gás líquido, modelo HP – 5890 A, série II (CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone, com 25,0 cm de comprimento 0,20 mm de diâmetro

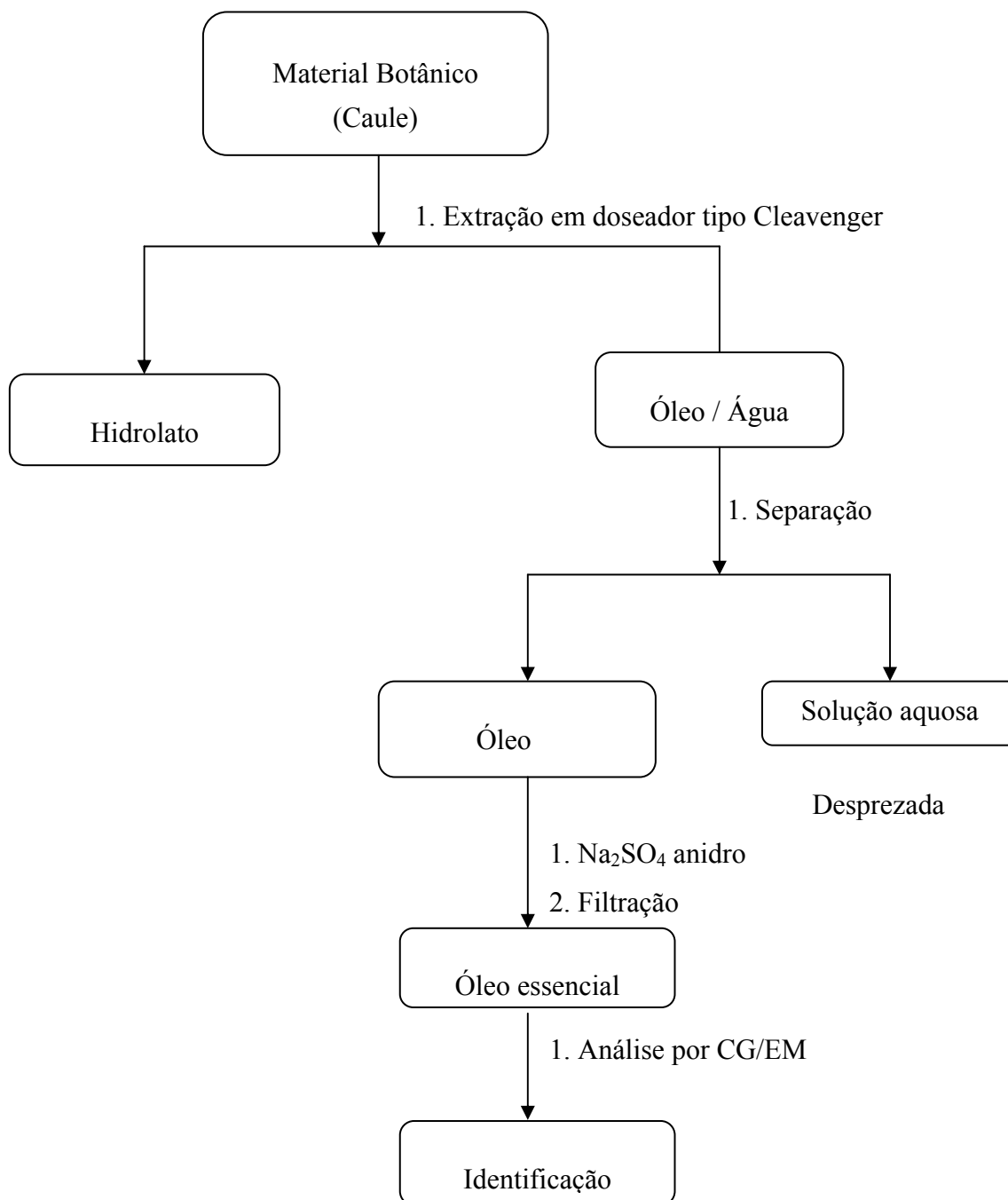
interno e 0,30 mm de diâmetro externo, utilizando-se um gradiente de temperatura de 4° C/min de 50 a 180° C e 20° C/min de 180 a 280° C, sendo a temperatura do injetor de 250° C; e VG analytical 7070 E – HF, operando em impacto eletrônico a 70 eV.

4.3. Obtenção do Óleo Essencial

A extração do óleo foi realizada utilizando-se sistema de arraste de vapor, e coletado em um aparelho doseador tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb (1960). O procedimento se deu de forma que foram colocadas 800 g do caule de *V. arborea*, em balão de 5 litros juntamente com 2,5 L de água, e mantido em ebulição por 3 horas. Após, a mistura água/óleo obtida, no doseador, foi separada da água, tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e filtrada (Fluxograma 1, pag. 49). Houve também tentativa da extração das folhas da planta, não havendo rendimento considerável.

O óleo obtido foi analisado com uso de um cromatógrafo gasoso-acoplado a espectrômetro de massa. Os resultados das análises de identificação dos componentes químicos do óleo estão dispostos na Tabela 2, pag. 71.

Fluxograma 1 - Metodologia de extração de óleos essenciais do caule de *V. arborea*.



4.4. Tratamento cromatográfico do óleo essencial e isolamento do α -bisabolol.

No processo cromatográfico foram utilizados 2,0 g do óleo, sobre 20,0 g de sílica, e como solvente foram utilizados éter de petróleo, diclorometano e clorofórmio puros ou em combinações binárias. Foram coletadas 148 frações de 5,0 mL cada. Análise por CCD permitiu fazer comparação e reunião das frações obtidas conforme mostrado a seguir. As frações 54-75, com rendimento de 0.92 g, se mostraram com aspecto líquido incolor, recebendo denominação de VA1.

Solventes utilizados:

1. Éter de petróleo
2. Éter de petróleo: diclorometano (8:2)
3. Éter de petróleo: diclorometano (1:1)
4. Diclorometano
5. Diclorometano: clorofórmio (8:2)
6. Diclorometano: clorofórmio (1:1)
7. Diclorometano: clorofórmio (2:8)
8. Clorofórmio

Frações obtidas:

Solventes	Frações
Éter de petróleo	1-15
Éter de petróleo: diclorometano (8:2)	16-30
Éter de petróleo: diclorometano (1:1)	31-53
Diclorometano	54-75
Diclorometano: clorofórmio (8:2)	76-90
Diclorometano: clorofórmio (1:1)	91-110
Diclorometano: clorofórmio (2:8)	111-130
Clorofórmio	131-148

4.5. Atividade antioxidante

4.5.1. Método de seqüestro do Radical DPPH

A verificação da capacidade antioxidante do óleo essencial de *V. arborea* foi realizada usando o método do seqüestro de radicais livres, utilizando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) na forma de solução 60 µM DPPH em etanol. Numa cubeta de 3 mL colocou-se 1 mL da solução de DPPH juntamente com 1 mL de etanol, em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro UV, com ajuste de leitura de comprimento de onda de 520 nm, e obtendo-se uma absorbância “X” (HEGAZI; HADY, 2002).

A partir do óleo essencial foram preparadas quatro concentrações diferentes, conforme mostrado na Tabela 3, pag. 66. Colocou-se 1 mL da solução amostra em cubeta, e em seguida adicionou-se 1 mL da solução de DPPH, que foi lida em espectrofotômetro UV, obtendo-se uma absorbância “Y”. O declínio da concentração é registrado como declínio na absorbância em λ_{\max} 520 nm por um período de 30 minutos. A absorbância correspondente a 100% de seqüestro de radical é determinada com o teste realizado usando-se Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e BHT(2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol) como controles positivos, que causam o seqüestro completo dos radicais livres.

A porcentagem de seqüestro é calculada como: $100[(X/Y) - 1]$, onde:

X = absorbância com DPPH

Y = absorbância com DPPH mais absorbância da substância teste.

4.6. Avaliação da Atividade Antibacteriana

4.6.1. Avaliação antibacteriana do OEVA através da técnica de difusão de disco.

Para realização do ensaio foram preparadas soluções em seis concentrações diferentes (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,62% e 0,31%) do óleo essencial de *V. arborea* (OEVA) através de diluições feitas em dimetil sulfóxido (DMSO), seguindo a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966), adaptada por Koneman *et al.* (1993) e Romeiro (2001), em triplicata.

Bactérias utilizadas

Foram avaliadas cinco culturas de bactérias padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo uma Gram-positiva – *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) e cinco Gram-negativas – *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

Preparo do meio de cultura

Foram preparados 120 mL de Agar Mueller Hinton desidratado (Difco, Michigan, USA) na proporção 4,56 g do Agar em 120 mL de água destilada, conforme especificação do fabricante. Em seguida, submeteu-se à esterilização por calor úmido, em autoclave 121° C por 15 min. e deixado resfriar, até a temperatura de 45-50° C. Logo após 20 mL do meio foi dispensado em placas de petri.

Procedimentos

Após a solidificação do meio, em temperatura ambiente, as bactérias foram replicadas com auxílio de um swab estéril. Foram inseridos na superfície da placa discos de papel filtro embebidos nas soluções correspondentes a cada concentração, bem como o controle negativo (DMSO). Já para os controles positivos foram utilizados discos dos antibióticos Cloranfenicol (30 µg/disco) e Azitromicina (15 µg/disco) cedidos pela empresa Laborclin. Após a realização do teste as placas de petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e os halos de inibição do crescimento medidos em milímetros (Fig. 2, pag. 53).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 2. Representação fotográfica do método de difusão de disco. (A) Inoculação dos discos contendo a solução. (B) Resultado contra a bactéria *E. coli*. (C) Resultado contra *S. aureus*. (D) Medição, em mm, do halo de inibição.

4.6.2. Avaliação da interferência do OEVA sobre a atividade de alguns antibióticos.

Para realização do ensaio de interferência sobre a resistência a antibióticos por contato gasoso (modificado a partir de INOUYE *et al.*, 2001), o ensaio foi realizado em triplicata com soluções de 50% de óleo essencial de *V. arborea* (OEVA) diluído em dimetil sulfóxido (DMSO).

Bactérias utilizadas

Foram utilizadas no teste três culturas de bactérias padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo uma Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) e duas Gram-negativas - *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

Preparo do meio de cultura

Foram preparados 120 mL de Agar Mueller Hinton desidratado (Difco, Michigan, USA), conforme especificação do fabricante. O meio foi esterilizado em autoclave a 121° C por 15 min, sendo em seguida dispenso em placas de Petri.

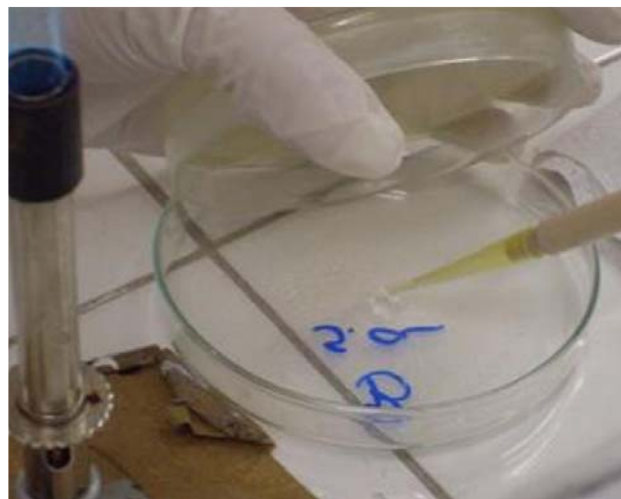
Procedimentos

Após a solidificação do meio, as bactérias diluídas em água destilada estéril foram replicadas com auxílio de um swab estéril. Discos de antibióticos nas suas respectivas concentrações foram colocados sobre a placa de Petri contendo o microorganismo a ser testado. Em seguida, 100 µL da solução do OEVA foram inoculadas na parte interna da tampa das placas (Fig. 3, pag. 55), de modo que os componentes gasosos do óleo pudessem interagir diretamente com o antibiótico, com a finalidade de observar se o mesmo possui efeito sinérgico ou antagônico. Para o controle negativo foi colocado sobre a tampa apenas o DMSO utilizado para diluir ambas as substâncias testadas, e para o controle positivo foi colocado apenas os discos de antibióticos. Após a realização do teste as placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e os halos de inibição do crescimento medidos em

milímetros. Foram utilizadas no estudo duas classes de antibióticos: os aminoglicosídeos gentamicina e tobramicina (ambos a 10 µg/mL), e a tetraciclina (30 µg/mL), tomando como base sua disponibilidade na rede básica de saúde.



(A)



(B)

Figura 3. Avaliação da atividade sinérgica do OEVA por contato gasoso. (A) Inoculação do microorganismo; (B) Adição das soluções testadas.

4.7. Avaliação Farmacológica do Óleo Essencial de *V. arborea*

Foram utilizados camundongos machos Swiss adultos (20 a 32 g), provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (20 e 24 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos uma hora antes da realização dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (FMJ) sob protocolo nº 2009_0187_FR246195.

4.7.1. Atividade nociceptiva e Antiinflamatória

4.7.1.a. Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético

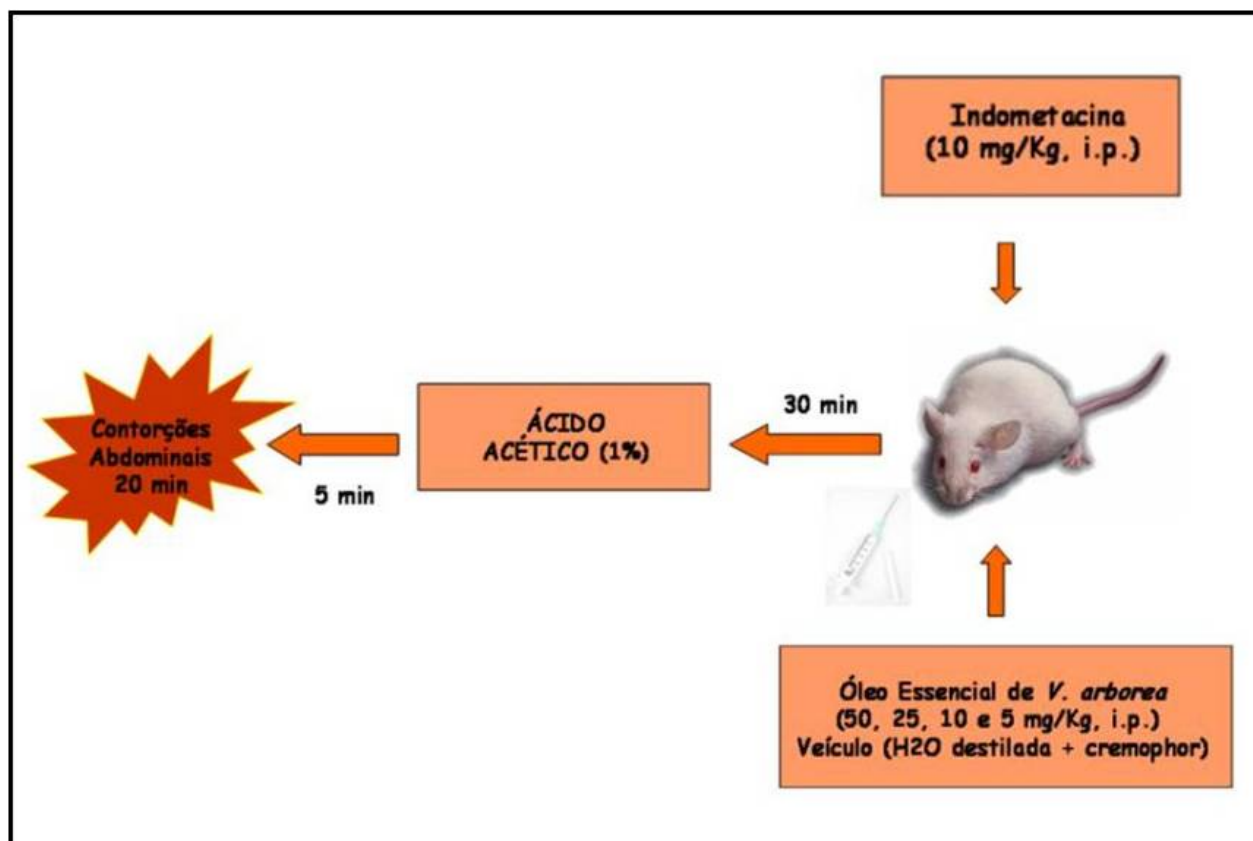
As contorções abdominais, em camundongos, caracterizam-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras. Esta resposta motora decorre da aplicação de um estímulo nociceptivo por via intraperitoneal. A contagem do número de contorções ocorridas em um intervalo de tempo pré-determinado é tomada como índice da resposta nociceptiva (KOSTER, ANDERSON, DE BEER, 1959).

O ácido acético conhecido por induzir a liberação rápida de mediadores capazes de aumentar a permeabilidade vascular, como acetilcolina, ATP, íons potássio e hidrogênio entre outros (GÖK *et al.*, 1999) foi utilizado como estímulo para os testes. As diluições foram feitas com ácido acético e água destilada a 1% e utilizadas por um período máximo de duas horas. O volume de ácido acético diluído foi injetado de acordo com o peso dos animais. Foram utilizadas quatro concentrações do OEVA (50, 25, 10 e 5 mg/Kg) e aplicadas também de acordo com o peso dos animais. Para este experimento foram utilizados 6 grupos contendo 8 camundongos machos cada um. A indometacina foi usada como controle positivo e como controle negativo foi utilizado água e cremophor utilizado para emulsificar o óleo essencial.

Os animais, já ambientados à sala de experimentação, foram colocados dentro de caixas de visualização, 10-15 minutos antes da injeção i.p. de ácido acético. As contorções foram contadas cumulativamente durante os 20 minutos subsequentes à

injeção do ácido acético, e o número total neste período tomado como índice da resposta nociceptiva. A administração das diferentes doses do OEVA foi feita via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção do ácido. Tal via de administração foi escolhida por apresentar melhor efeito do que via oral devido à menor absorção no trato gastrointestinal em comparação com a cavidade peritoneal.

QUADRO 2. Esquema do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



4.7.1.b. Teste de Formalina

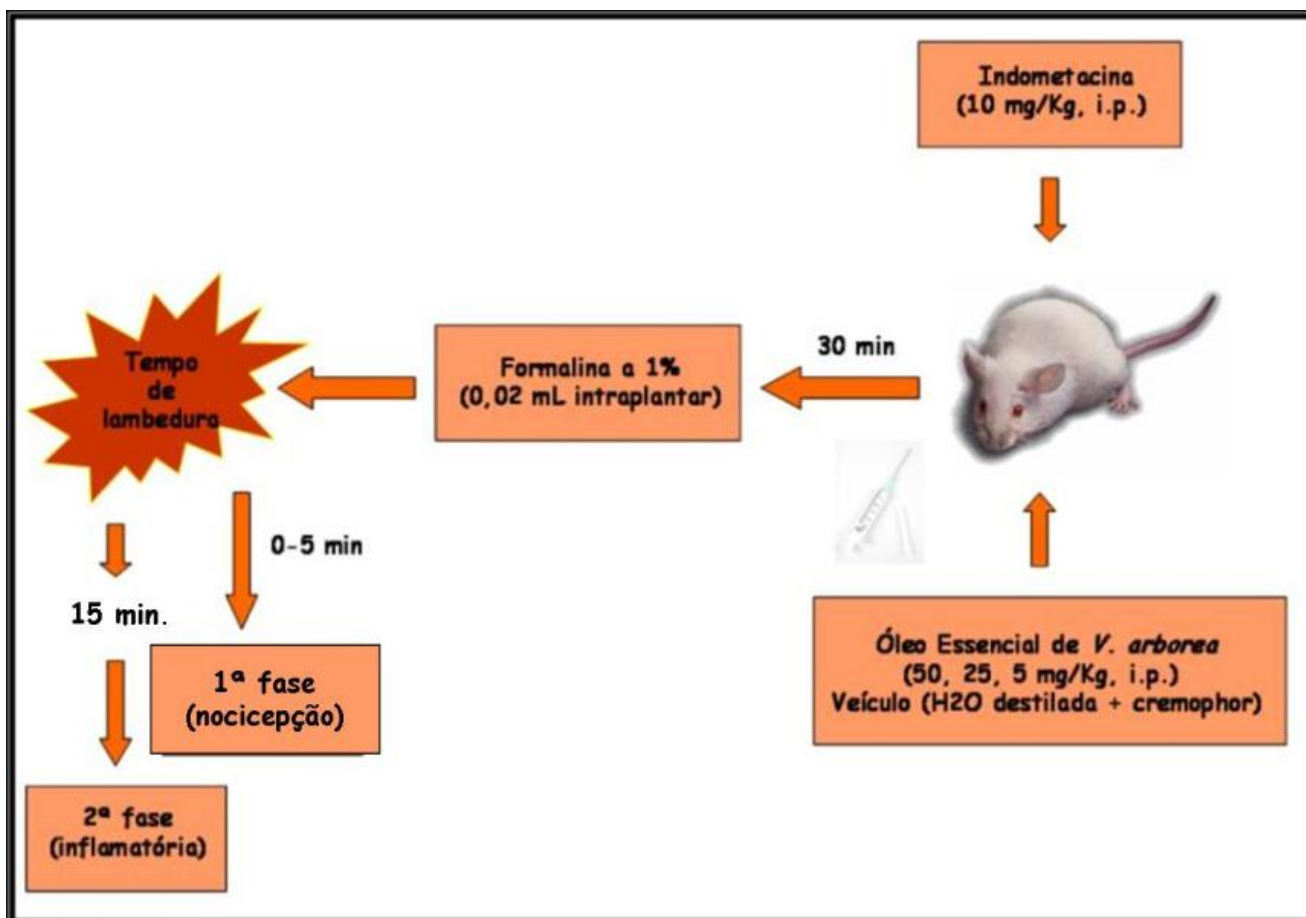
Para avaliação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *V. arborea* foi usada a variação do método proposto por Hunskaar & Hole (1987), no qual a injeção de formalina é feita na pata traseira de camundongos. Neste modelo, a primeira fase, referente à atividade antinociceptiva, começa imediatamente após a injeção e perdura por cerca de 5 minutos. Esta fase é seguida por um período de quiescência, de cerca de 5-10 minutos, após o qual se desenvolve a 2ª fase da resposta, correspondente à ação antiinflamatória, que se inicia 15-20 minutos após a injeção e atinge o máximo aos 30-45 minutos.

A avaliação da resposta nociceptiva dos animais deu-se de acordo com Dubuisson & Dennis (1977), que a faz através do tempo despendido pelo animal em comportamentos relacionados à dor (lambadura ou mordida na pata). Como índice de nociceção foi usado o tempo, contado em segundos, em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada: *licking – time* (HÜNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989; ABBOTT *et al.*, 1995; TJØLLESEN *et al.*, 1992). Desta forma é possível observar e avaliar a resposta de mais de um animal simultaneamente.

Nos experimentos foram utilizados como controle positivo a indometacina (10 mg/mL, i.p.) e como controle negativo a mistura de água e cremophor usada para emulsificar o óleo. O óleo foi administrado via intraperitoneal nas doses de 50, 25 e 5 mg/Kg 30 minutos antes do estímulo nociceptivo. O *licking-time* é computado em segundos durante os primeiros 5 minutos (1ª fase) e de 15 a 20 minutos (2ª fase) após a injeção de formalina.

A formalina na concentração de 1% é injetada por via subplanar (s.pl.) em uma das patas posteriores, num volume constante de 0,02 mL/pata (camundongos).

QUADRO 3. Esquema do teste de formalina.



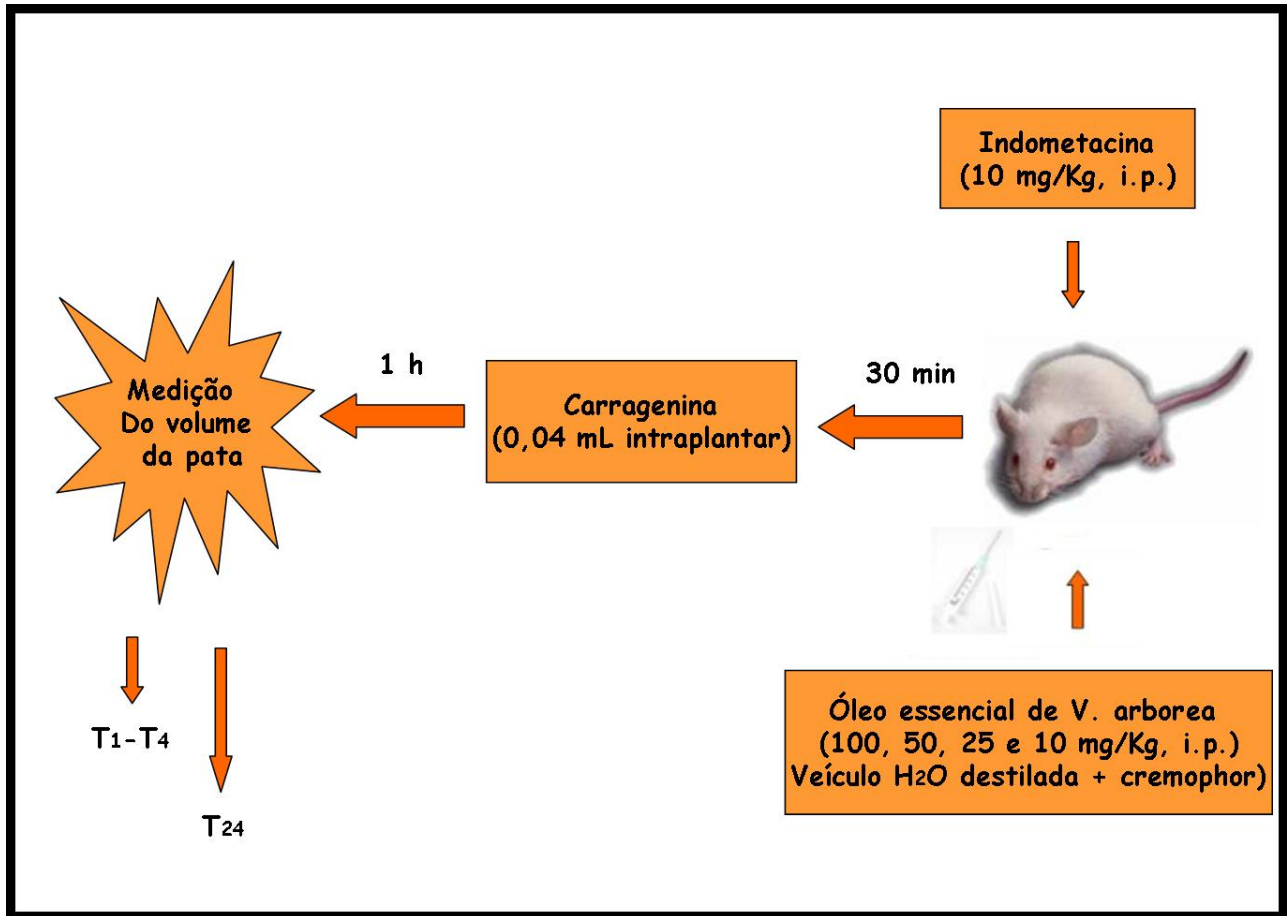
4.7.1.c. Edema induzido pela injeção intra-plantar de carragenina

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores que contribuem também à intensa migração celular para o sítio inflamatório (CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; HENRIQUES *et al.*, 1987) induzindo aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos.

A metodologia utilizada permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local. O edema é induzido pela administração intra-plantar (i.pl.) de carragenina (0,04 mL/pata, i.pl.) na pata traseira direita dos camundongos (adaptado de LEVY, 1969).

O volume da pata traseira dos animais foi avaliado imergindo-a até o maléolo lateral em um hidropletismômetro elétrico, sendo essa a medida basal. Em seguida, para avaliar o efeito do OEVA o mesmo foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) nas doses (100, 50, 25 e 10 mg/Kg) utilizando como controle positivo a indometacina (10 mg/Kg) e água e cremophor como controle negativo, 30 minutos antes da administração da carragenina. Após uma hora da aplicação do estímulo inflamatório a espessura da pata traseira direita de cada animal foi avaliada nos períodos e o procedimento se repete a cada hora até completar 4 horas da injeção da carragenina, uma 2ª fase é observada 24 h depois (HENRIQUES *et al.*, 1987).

QUADRO 4. Esquema do teste de edema de pata induzido por carragenina



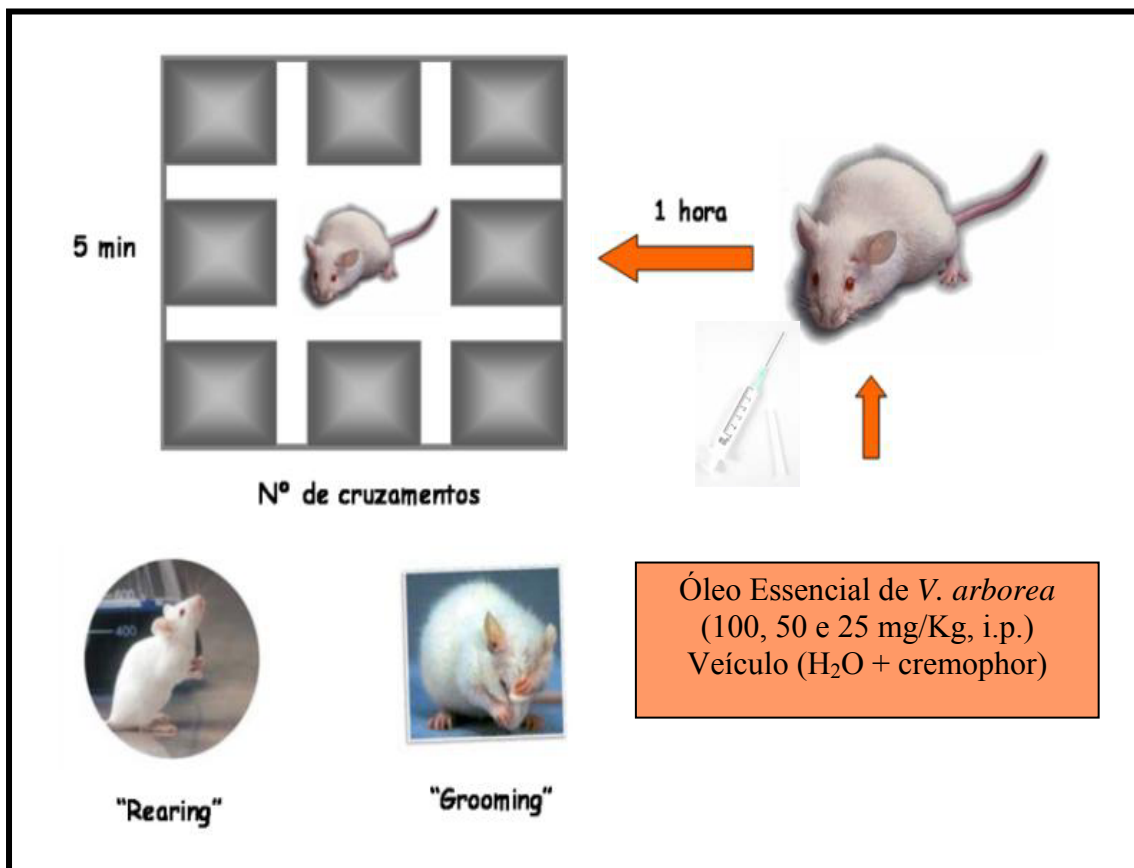
4.7.2. Avaliação da Atividade no Sistema Nervoso Central

4.7.2.a. Teste de Atividade Exploratória - Campo-aberto

Camundongos machos (24 - 32 g) foram separados em 5 grupos de 6 animais cada e tratados via intraperitoneal (i.p.) com óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* (100, 50 e 25 mg/Kg), água e cremophor (controle negativo) e diazepam – 1 mg/Kg, i.p. (controle positivo). Os animais foram levados individualmente ao campo aberto confeccionado em acrílico (30 x 30 x 15 cm) para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo) na periferia (atividade exploratória) e no centro (atividade ansiolítica ou sedativa) do campo, o número de comportamento de auto-limpeza (*grooming*), de levantar (*rearing*) registrados durante um período de 5 minutos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946), uma hora após os tratamentos.

A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1955). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como a ansiolítica.

QUADRO 5. Esquema do teste de campo aberto.



4.7.2.b. Tempo de Sono Induzido por Barbitúrico

Camundongos machos (24 – 32 g) foram divididos em cinco grupos de seis animais cada, tratados via intraperitoneal (i.p.) com OEVA (100, 50 e 25 mg/Kg), água e cremophor (controle negativo) e diazepam (controle positivo). Todos receberam tratamento 30 minutos antes da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico – 40 mg/Kg (agente indutor do sono) que é aplicado conforme o peso do animal. Indicado o período de sono, os animais, foram posicionados em decúbito dorsal, em local de adequada observação. Os animais foram observados durante todo o período de sono, sendo o tempo gasto entre a injeção do pentobarbital e a perda dos reflexos do animal (início do sono), denominado latência do sono e o tempo registrado do início do sono e o retorno voluntário dos reflexos, denominado tempo de sono (WAMBEBE, 1985; ROLLAND *et al.*, 1991). Um tempo máximo de 10.800 seg. foi imposto neste modelo, isto é animais cujo tempo de sono ultrapassaram este período de tempo, a duração do sono foi considerada em 10.800 segundos.

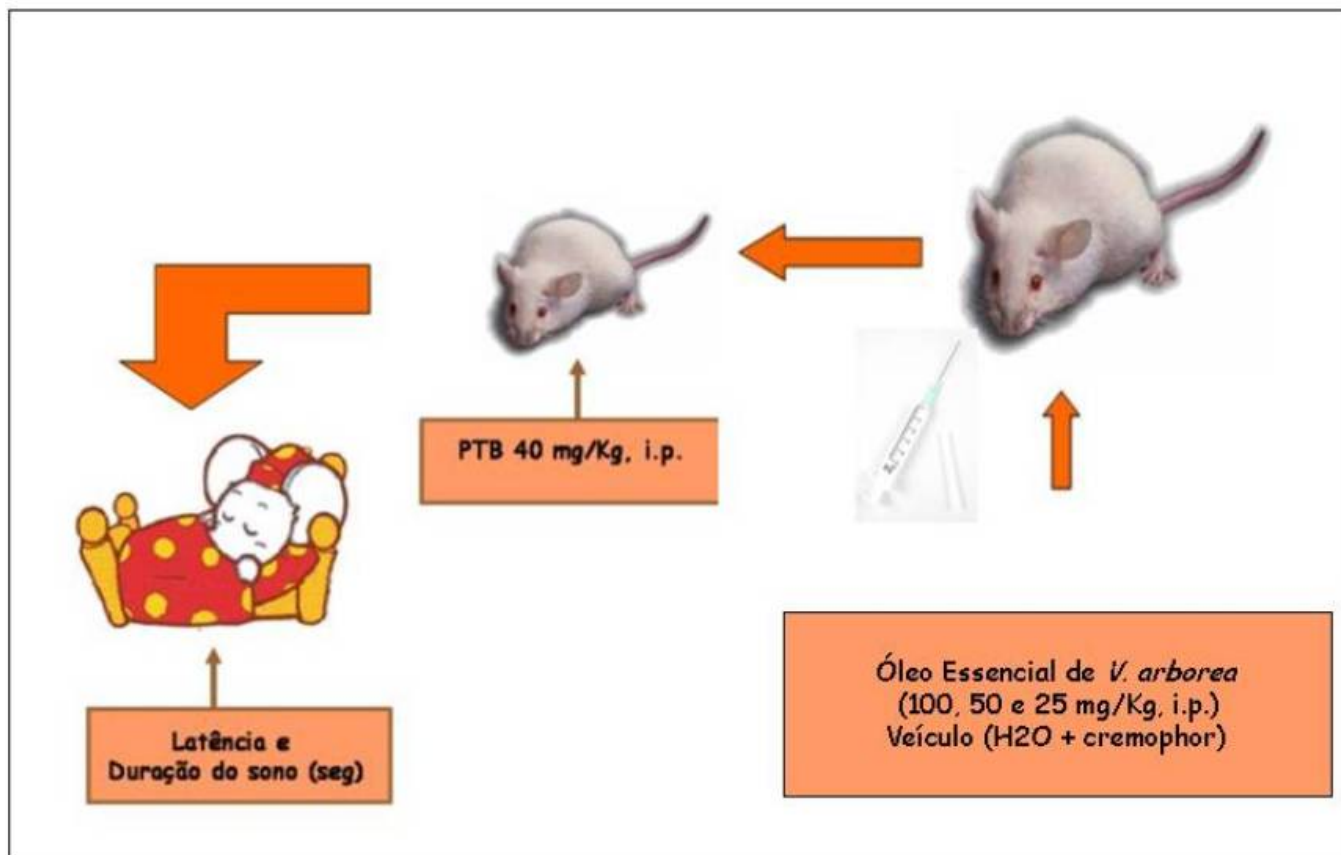
O tempo de sono foi calculado, em segundos, para cada animal da seguinte forma:

Tempo de sono = $T_1 - T_0$ onde,

T_0 = o tempo registrado no início do sono

T_1 = o tempo no qual o animal despertou

QUADRO 6. Esquema do teste do tempo de sono.



5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*” foi utilizada para análise dos testes antibacterianos pelo método de difusão de disco e dos testes farmacológicos e o t-test Student para verificação da interferência do óleo por contato gasoso. A estatística foi significativa quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação estrutural de VA1

O estudo dos componentes químicos voláteis foi realizado a partir de amostras do óleo obtido por arraste a vapor, do caule de *V. arborea*. O óleo essencial obtido foi analisado por meio do uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massas, comparação com espectros de massas em banco de dados combinada com determinação e correção dos índices de Kovats simulados (ALENCAR, *et al.*, 1990) e, por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2001).

Os componentes químicos identificados no óleo essencial foram: propanoato de etila (5,87%), etanoato de propila (9,00%), o-metil-eugenol (2,39%), óxido-bisabolol (2,31%) e α -bisabolol (80,43%), totalizando 100% na identificação do óleo essencial. O cromatograma do óleo analisado está mostrado na figura 5, pag. 74.

O composto denominado VA1 (F54-75) foi obtido a partir do tratamento cromatográfico do óleo essencial do lenho de *V. arborea* apresentando-se na forma de líquido, límpido e incolor, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 6, pag. 75) mostrou uma banda intensa e larga em 3424 cm^{-1} referente ao estiramento O-H de hidroxila; três bandas de intensidades médias em 1464 , 1231 e 1089 cm^{-1} relacionadas à deformações C-O de alcoóis; vibrações intensas em 1656 e 1650 correspondentes a deformações C=C; e ainda bandas esqueléticas em 2800 e 2940 cm^{-1} referentes a deformações de C-H

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 7, pag. 76 de VA1 apresentou quinze sinais. A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 8, pag. 77) permitiu verificar o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono. Assim, identificou-se a presença de três carbonos metínicos (CH), cinco carbonos metilênicos (CH_2) e quatro metílicos (CH_3). A diferença entre os sinais de carbono observado entre estes espectros revelou a existência de três carbonos não hidrogenados, sendo o sinal em $\delta 74,3$ correspondente a um carbono oxigenado.

A análise do espectro de RMN ^1H (Fig 9, pag. 78 e Fig.10, pag. 79) de VA1 mostrou a existência de sinais correspondentes a hidrogênios metílicos (bem como sinais em torno de $\delta 5,1$ e $5,0$ (sl, H-5), os quais são atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos insaturados sp^2 (Tabela 2, pag. 71).

Desta forma e baseado em análise comparativa com dados obtidos da literatura (SIMÕES, *et al.*, 2002), (Tabela 3, pag. 73), VA1 foi identificado como sendo o α -bisabolol, um álcool insaturado, com denominação química 1-metil-4 (1,5-dimetil-1-hidroxi-4(5)-hexenil)-1-ciclohexeno, sendo bastante empregado em produtos cosméticos, para profilaxia e cuidados da pele.

A abordagem fitoquímica foi realizada para caracterizar substâncias responsáveis pela atividade terapêutica do candeeiro, observada, de início, nos levantamentos etnobotânicos através de ensaios farmacológicos as quais esta planta foi submetida.

Tabela 2 – Dados de correlação de RMN ^1H e ^{13}C de acordo com análise do espectro DEPT 135°.

CH3	CH2	CH	C
C7 (22,82)	C3 (22,80)	C2 (120,09)	C1 (134,13)
C13 (17,12)	C5 (21,50)	C4 (42,48)	C8 (74,37)
C14 (25,17)	C6 (26,42)	C11 (124,15)	C12 (131,54)
C15 (22,64)	C9 (39,63)		
	C10 (21,50)		

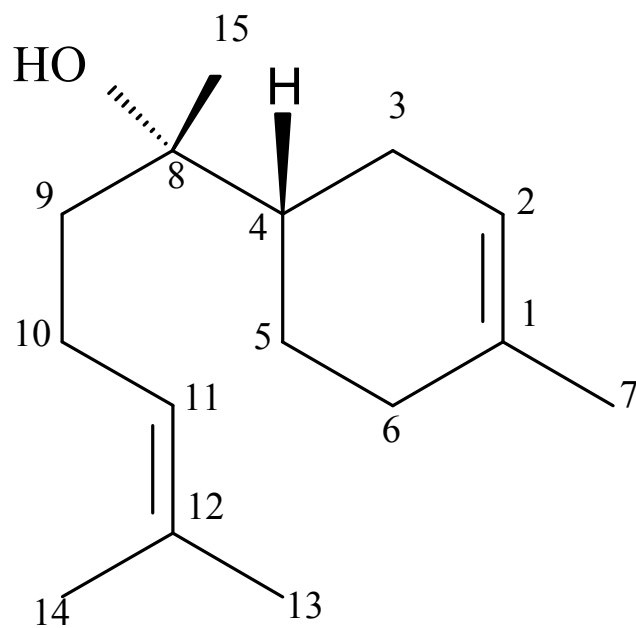


Figura 4 - Estrutura do α -bisabolol, componente majoritário presente no OEVA.

Tabela 3 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C VA1 (75 MHz, CDCl_3) com aqueles registrados na literatura para o α -bisabolol (HASHIDOKO, TAHARA & MIZUTANI, 1994).

C	α - bisabolol	VA1
1	133,80	134,13
2	121,30	120,09
3	22,61	22,80
4	43,30	42,48
5	20,80	21,50
6	25,91	26,42
7	22,86	22,82
8	73,50	74,37
9	40,62	39,63
10	21,97	21,50
11	125,52	124,15
12	131,11	131,54
13	17,50	17,12
14	25,83	25,17
15	22,43	22,64

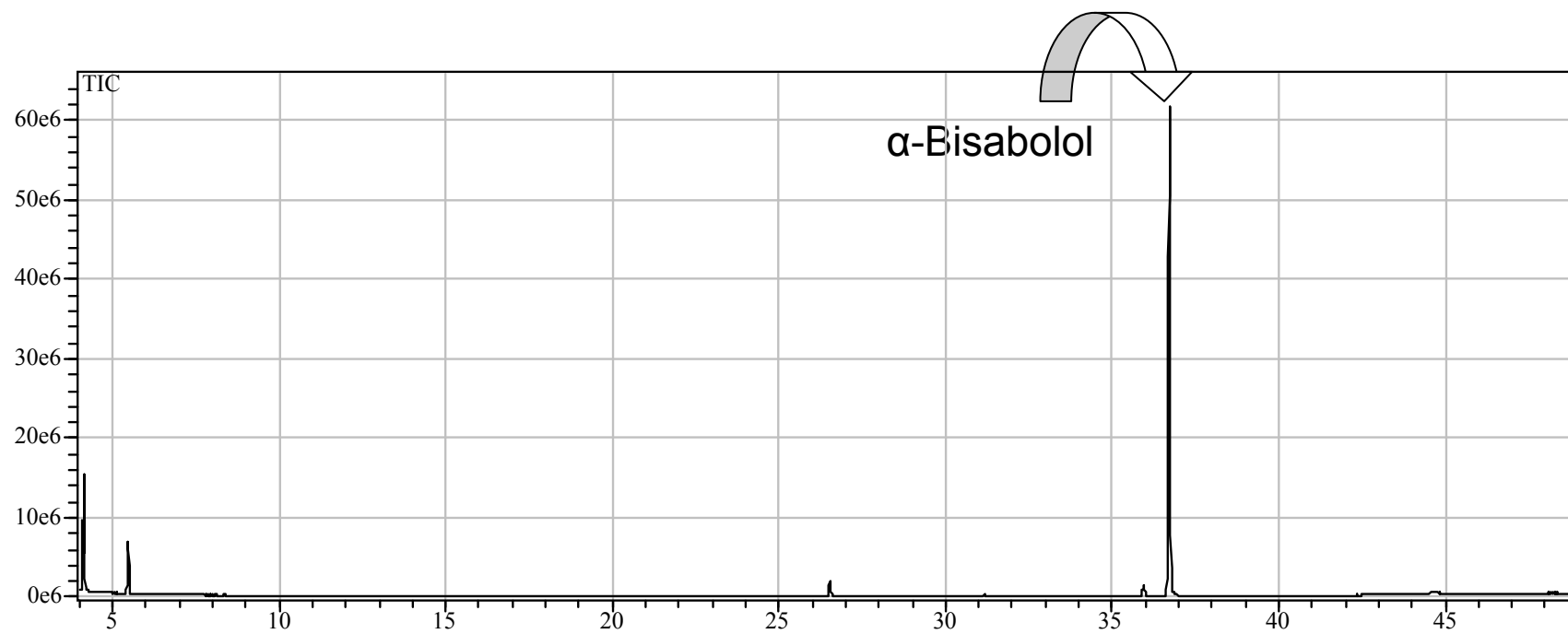


Figura 5 - Cromatograma do óleo essencial de *V. arborea* Baker.

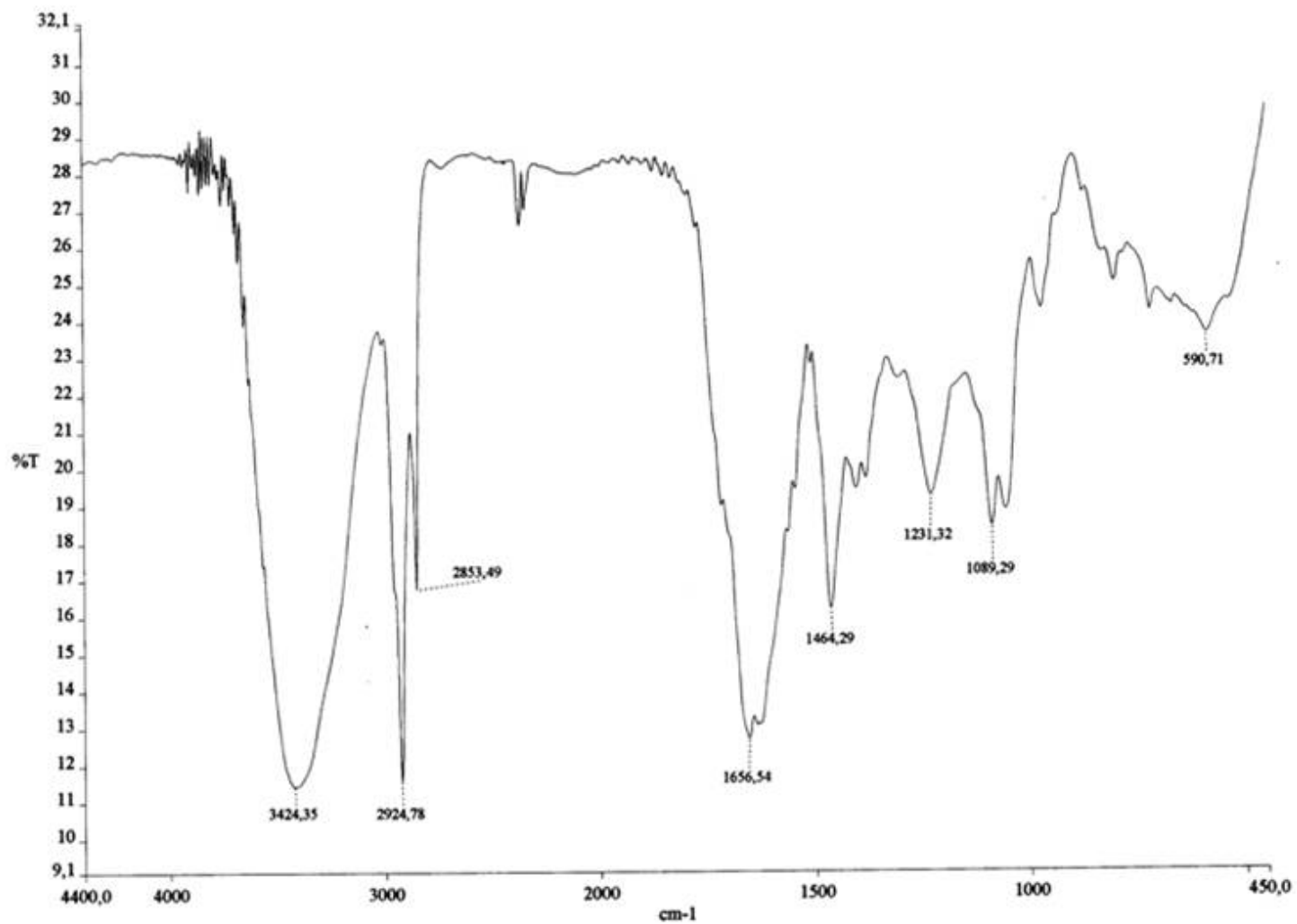


Figura 6 – Espectro de absorção na região do Infravermelho de VA1

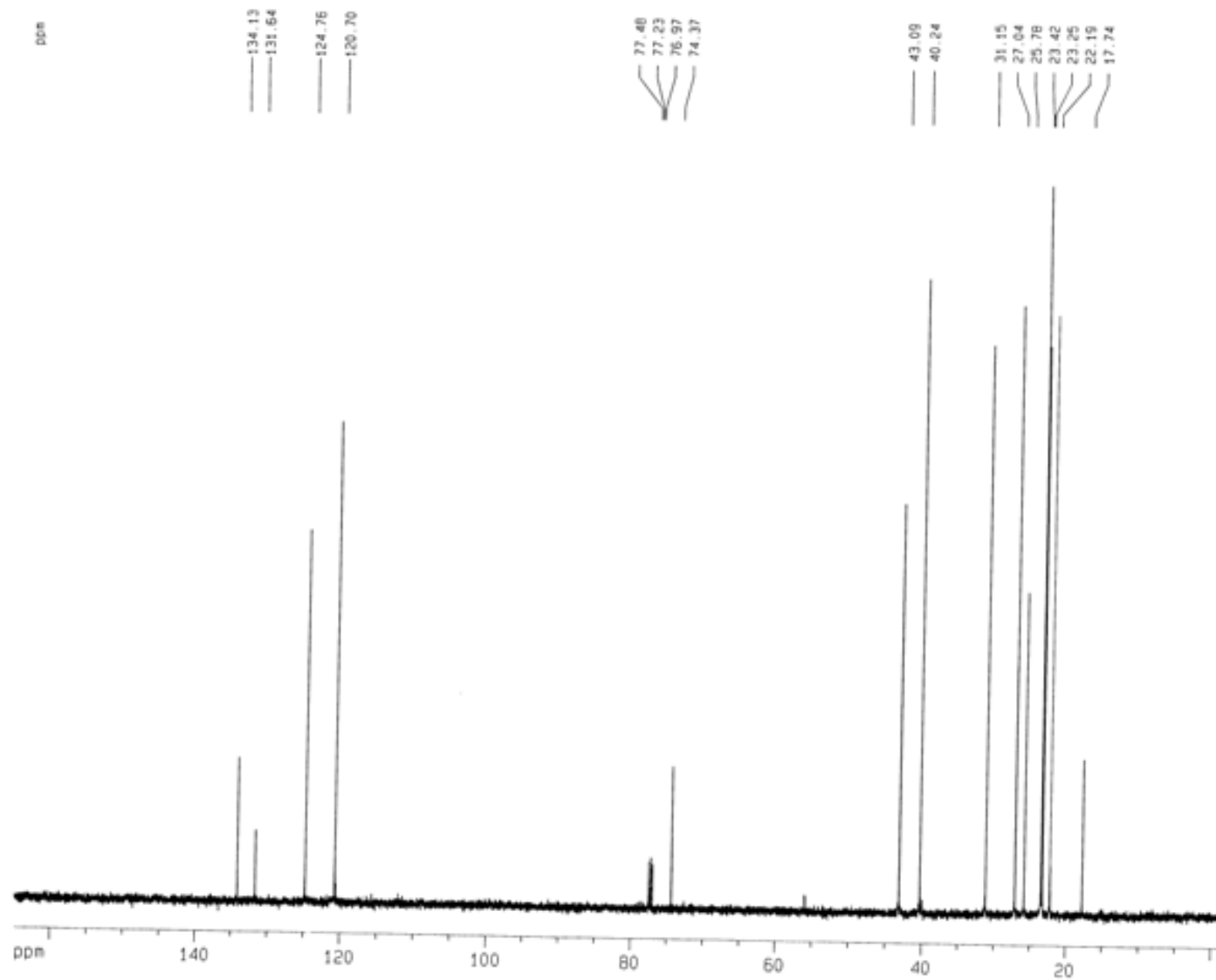


Figura 7– Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de VA1.

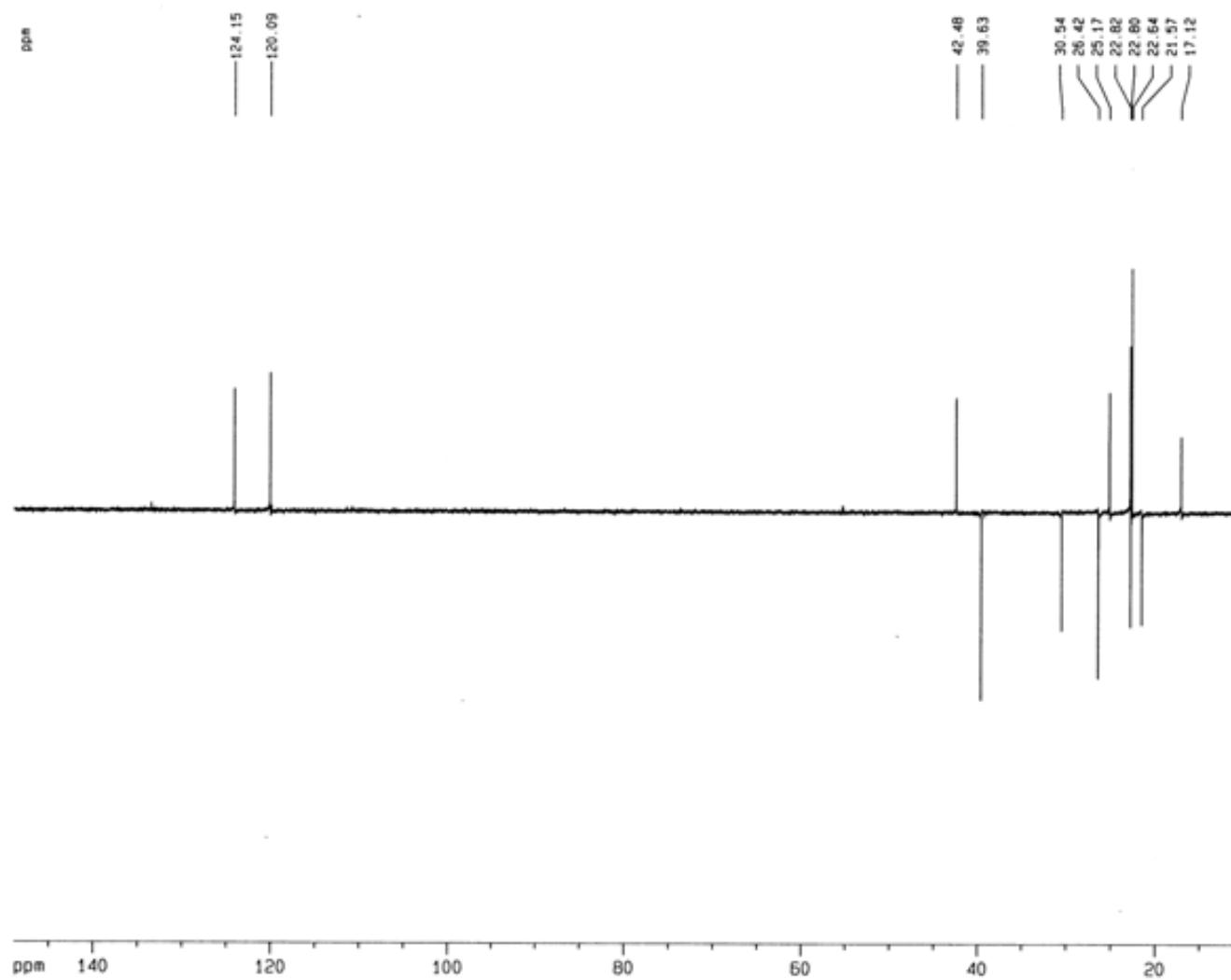


Figura 8 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT (75 MHz, CDCl_3) de VA1.

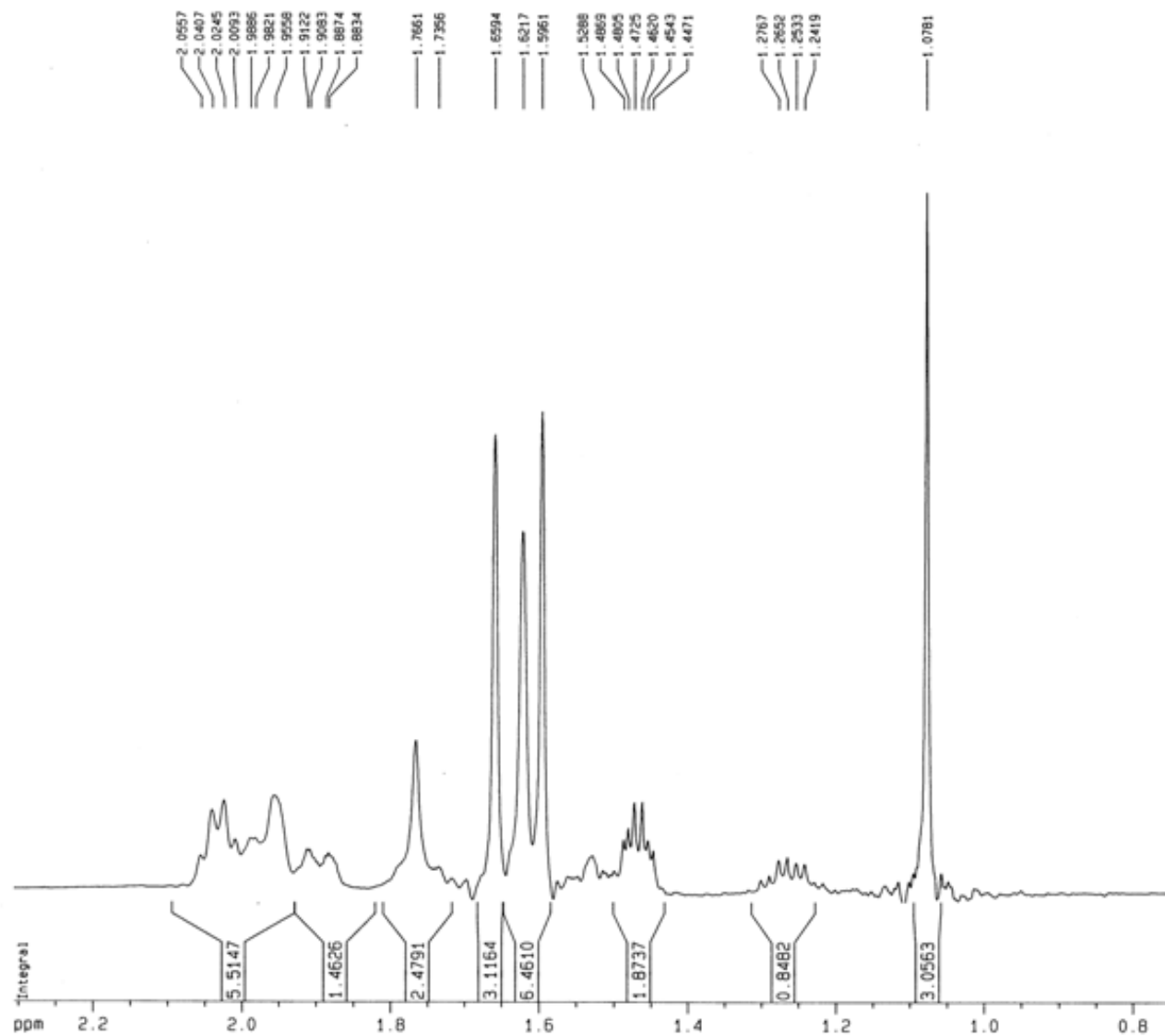


Figura 9 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VA1.

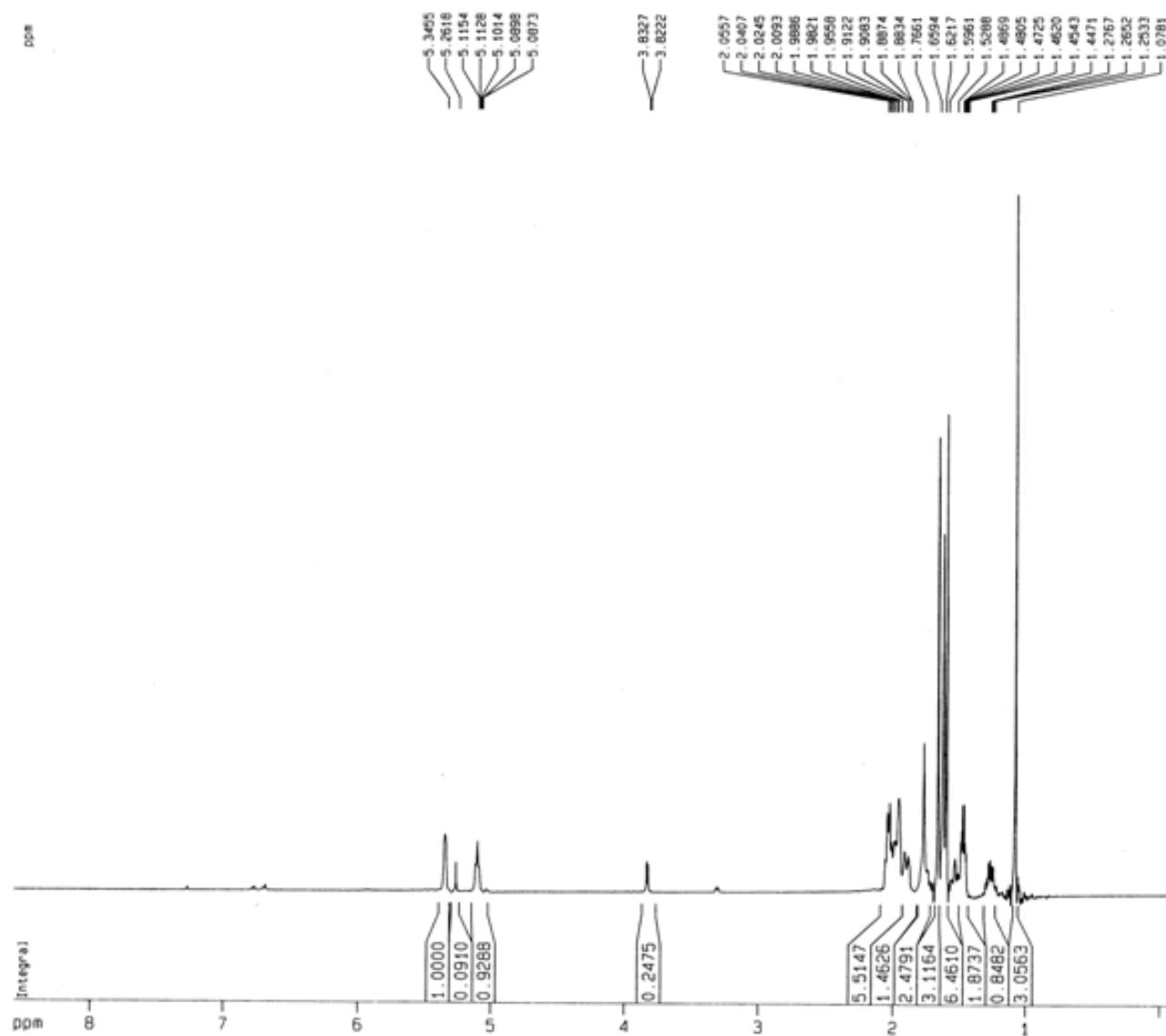


Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VA1 (expandido)

6.2. Atividade antioxidante

De acordo com Campos *et al.* (2003) uma amostra é considerada de capacidade antioxidante quando apresenta $CE_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. De acordo com o observado na Tabela 4 (pag. 81) o óleo essencial de *V. arborea* possui atividade antioxidante visto que o mesmo apresenta capacidade de seqüestrar radical em concentrações abaixo de $500 \mu\text{g/mL}$. Porém quando comparado com os controladores positivos Trolox e BHT, o mesmo demonstra possuir uma atividade antioxidante. Em compensação trata-se do primeiro relato de teste de atividade antioxidante realizado com o óleo essencial de *V. arborea*.

Tabela 4 - Resultado do teste da atividade antioxidante do óleo essencial de *V. arborea*, usando DPPH .

Concentração (mg/mL)				
Amostra	1,0	0,5	0,25	0,1
	% Antioxidante			
Trolox	96,96	93,47	92,68	89,56
BHT	86,11	73,89	69,97	60,21
Oleo	47,7	47,6	51,1	53,2

Os dados referem-se a cálculos realizados a partir das absorbâncias da solução de DPPH e das substâncias teste em espectrofotômetro UV (520 nm). Foram utilizadas quatro concentrações e utilizados como controles positivos o Trolox e o BHT.

6.3. Resultados da avaliação antibacteriana através do método de difusão de disco.

Após o tempo de incubação realizaram-se as leituras das placas e os halos de inibição foram mensurados. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos, relatados na Tabela 5 (pag. 84) e representados nas Figuras 11 e 12 (pág. 83 e 85) confirmam a ação antibacteriana do óleo essencial de *V. arborea*, corroborando com as informações sobre usos populares. Vale salientar que a atividade contra *S. aureus* foi confirmada por Sousa *et al.* (2008) em testes realizados com espécie do mesmo gênero. Porém não há relatos na literatura para a atividade contra as linhagens *P. vulgaris* e *S. flexineri*.



(A)



(B)

Figura 11. Representação fotográfica dos melhores resultados da ação antibacteriana sobre cepas de microrganismos testados com o óleo essencial de *V. arborea*.

Tabela 5. Valores das médias \pm E.P.M. dos halos de inibição do crescimento bacteriano em mm do OEVA através do método de difusão de disco (n = 3), utilizando análise de variância (**p<0,001) seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

Microorganismos	Concentrações do óleo (%)						Azitromicina	Cloranfenicol	DMSO
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	(15 μ g)	(30 μ g)	
<i>S. aureus</i> (ATCC 12692)	11.7 \pm 0.3***	10.3 \pm 0.3***	8.0 \pm 0.6***	7.5 \pm 0.5***	8.5 \pm 0.5***	ND	18.6 \pm 1.4***	16.7 \pm 0.6***	ND
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. vulgaris</i> (ATCC 13315)	9.5 \pm 0.5***	8.5 \pm 0.5***	6.5 \pm 0.5***	6.0 \pm 0.0***	7.5 \pm 0.5***	7.5 \pm 0.5***	10.0 \pm 2.0***	13.5 \pm 0.5***	ND
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14.5 \pm 0.7	8.0 \pm 0.0	ND
<i>S. flexineri</i> (ATCC 12022)	10.6 \pm 0.3***	7.4 \pm 0.5***	7.5 \pm 0.3***	7.0 \pm 0.0***	6.0 \pm 0.0***	ND	ND	16.5 \pm 0.5***	ND

ND: Não detectável; **DMSO:** Dimetil sulfóxido (controle negativo).

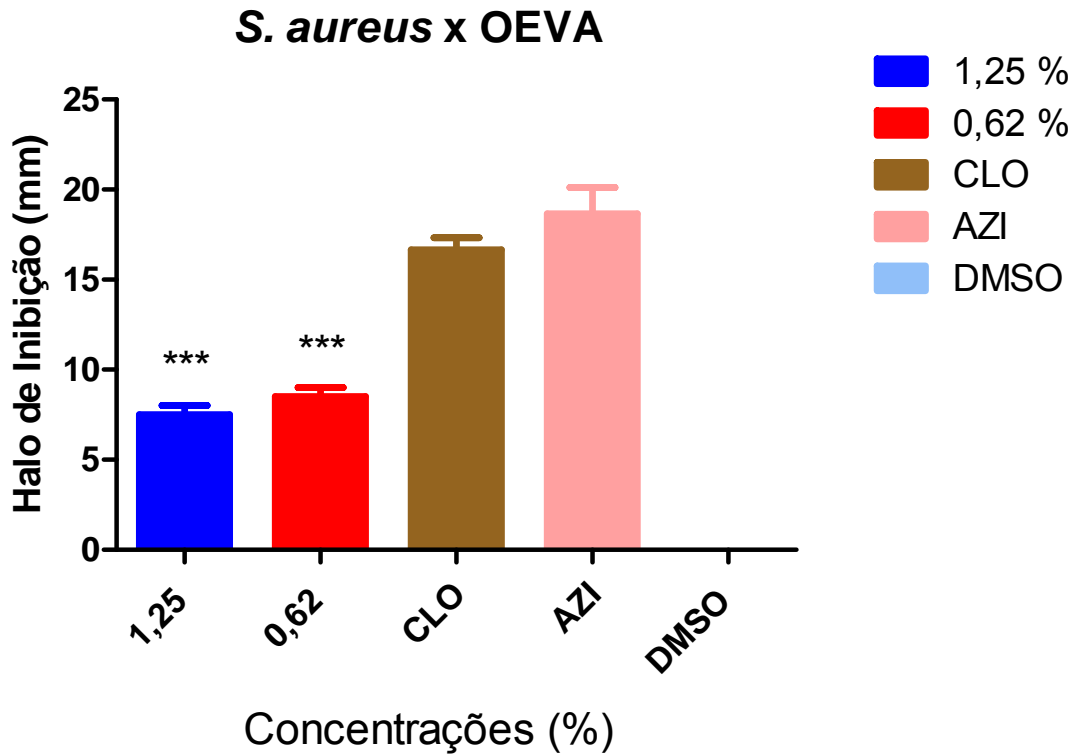


Figura 12 – Resultado do OEVA testado contra a bactéria *S. aureus* pelo método de difusão de disco. Os dados representam a média \pm E.P.M. dos halos de inibição (mm) das concentrações mais relevantes clinicamente, utilizando análise de variância (***) $p < 0,001$ seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

A concentração inibitória mínima para o teste de difusão de disco dá-se pela medição do halo de inibição sendo considerada aquela menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento de determinada bactéria testada.

Tabela 6. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *V. arborea*.

Microrganismos	CIM
	OEVA
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	≥ 20%
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	≤ 0,15%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	≥ 20%
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12692)	≤ 0,31%
<i>Shigella flexineri</i> (ATCC 12022)	≤ 0,31%

Observou-se que o óleo essencial de *V. arborea* (OEVA) apresentou inibição de crescimento para as bactérias *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Shigella flexineri* (ATCC 12022) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) com uma inibição considerável em praticamente todas as concentrações testadas e para as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) o óleo não mostrou nenhuma atividade.

6.4. Resultados da avaliação antibacteriana através do método de contato gasoso.

A Tabela 7, pág. 88 mostra dados da interferência do óleo essencial de *V. arborea* sobre a ação antibacteriana de antibióticos como gentamicina, tetraciclina e tobramicina. Considerando a comparação dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano nos ensaios com os antibióticos isolados e em associação com as substâncias testadas, pode-se observar, em algumas interações, a ocorrência de interferência do OEVA sobre o poder antibacteriano dos antibióticos. Nota-se, ainda, que todas as bactérias apresentam sensibilidade aos antibióticos ($p < 0,05$) estatisticamente significativa em relação ao controle.

A tetraciclina e tobramicina foram os antibióticos que tiveram a maior interferência do OEVA, sendo observada, em quase todas as interações, uma interferência sinérgica, exceto contra a linhagem *P. aeruginosa*, enquanto que a gentamicina mostrou um efeito antagônico contra a cepa *P. vulgaris*.

Tabela 7 - Valores das médias \pm E.P.M. dos halos de inibição do crescimento bacteriano (mm) do OEVA por meio de contato gasoso (n = 3) usando como estatística o teste-t, $p < 0,05$.

BACTÉRIAS	C +			C - (DMSO)			OEVA		
	GEN	TET	TOB	GEN	TET	TOB	GEN	TET	TOB
<i>S. aureus</i>	13.5 \pm 0.5	23.0 \pm 0.0	13.0 \pm 0.0	14.5 \pm 0.5	24.5 \pm 0.5	14.5 \pm 1.5	16.0 \pm 2.0	30.0 \pm 3.0	17.5 \pm 0.5
<i>P. aeruginosa</i>	17.5 \pm 0.5	12.5 \pm 0.5	16.5 \pm 0.5	16.5 \pm 0.5	12.0 \pm 0.0	16.5 \pm 0.0	19.0 \pm 2.0	11.5 \pm 0.5	13.5 \pm 0.5
<i>P. vulgaris</i>	22.0 \pm 0.0	19.5 \pm 0.5	21.5 \pm 0.5	23.0 \pm 1.0	19.5 \pm 0.5	20.5 \pm 0.5	21.5 \pm 0.5	26.5 \pm 0.5	26.5 \pm 2.5

GEN: Gentamicina; **TET:** Tetraciclina; **TOB:** Tobramicina; **C +:** Controle positivo (apenas os antibióticos); **DMSO:** Dimetil sulfoxido; **OEVA:** Óleo essencial de *V. arborea*.

6.5. Resultado do teste de Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético

De acordo com os resultados obtidos na contagem do número de contorções ocorridas nos animais testados observou-se que o óleo é capaz de diminuir significativamente o número de contorções abdominais provocadas pela injeção de ácido acético indicando um efeito antinociceptivo.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético baseia-se na aplicação de um estímulo químico de alta intensidade (ácido acético) e a resposta nociceptiva é de curta duração (KOSTER *et al.*, 1959). Esta resposta é bloqueada por muitas classes de drogas, como anti-histamínicos, antiinflamatórios não-esteroidais, hipotensores, estimulantes e depressores do SNC (TAKAHASHI & PAZ, 1987; YEH, 1985; PETTIBONE & MUELLER, 1989). Estudos posteriores postularam que o ácido acético age indiretamente por indução da liberação de mediadores endógenos que estimulam neurônios sensitivos nociceptivos (COLLIER *et al.*, 1968).

A indometacina é um agente antiinflamatório não-esteroidal (AINES) e um potente inibidor da cicloxigenase – COX. Dados clínicos indicam que certos AINES como a indometacina são eficazes no controle de alguns tipos de dor intensa, não relacionada a inflamação (RANG *et al.*, 2004).

Embora as contorções abdominais induzidas por ácido acético representem um modelo de nocicepção periférica (WEI *et al.*, 1986), este não é um modelo específico. Portanto, apesar do OEVA prevenir as contorções abdominais induzidas por ácido acético necessitou-se de outros modelos de nocicepção para reforçar tais resultados. Por conseguinte, foi realizado o teste de formalina.

Na figura 13 (pag. 90) referente ao teste de contorções abdominais uma relevância significativa (ANOVA) dos resultados do OEVA nas doses de 50 e 25 mg/Kg foi observada em relação ao controle. Afirmando, desta forma, uma possível atividade antiinflamatória.

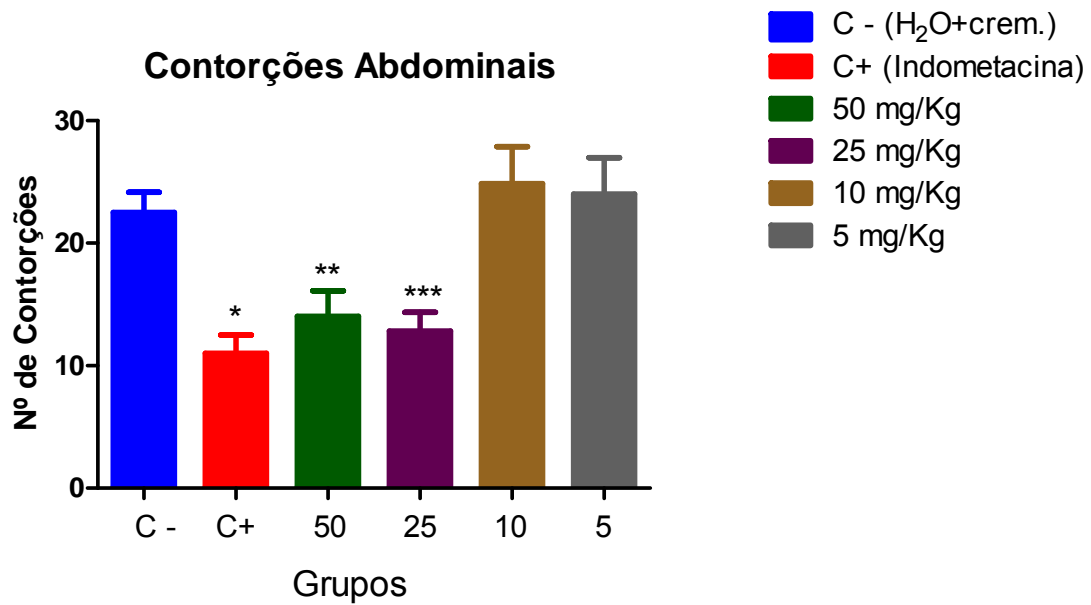


Figura 13 - Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizando camundongos machos Swiss adulto (n = 8). Os animais foram tratados com OEVA, água e cremophor (controle negativo), indometacina (controle positivo). Os dados representam a média ± E.P.M. do número de contorções ocorridas durante 20 minutos de observação. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

6.6. Resultado do teste de Formalina

O teste de formalina é diferente de alguns modelos de dor por permitir avaliar a resposta do animal a uma dor moderada e contínua causada pela injúria tecidual, bem como o papel de sistemas endógenos de regulação da dor, sendo considerado o modelo mais validado para dor referente a outros modelos com estímulo mecânico ou térmico (TJOLSEN *et al.*, 1992), permitindo não só o estudo de novas drogas analgésicas como também a elucidação de mecanismos de dor e analgesia. Drogas de ação central, como os narcóticos, podem inibir ambas as fases, enquanto que as drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, somente inibem a 2ª fase (HUNSKAAR & HOLE, 1987; ROSLAND *et al.*, 1990; TJOLSEN *et al.*, 1992; MALMBERG & YAKSH, 1993; JETT & MICHELSON, 1996).

De acordo com os resultados observados na figura 14 (pag. 92), podemos notar que durante a 1ª fase o OEVA apresenta significância, quando comparado ao controle negativo, para caráter antinociceptivo nas doses de 50 e 25 mg/Kg. E na 2ª fase o mesmo se apresenta ainda mais representativo em relação ao controle nas mesmas dosagens.

A segunda resposta de dor à injeção intraplantar de formalina apresenta participação efetiva de mediadores pró-inflamatórios (DAMAS & LIÉGEOIS, 1999). Os efeitos antinociceptivos do óleo foram observados em modelos que envolvem fortes componentes inflamatórios, desta forma, a existência de constituintes do óleo com capacidade de impedir a produção ou liberação de mediadores inflamatórios pode justificar a analgesia observada.

As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade a drogas analgésicas. (HUNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989; ABBOTT *et al.*, 1995; TJOLSEN *et al.*, 1992).

O resultado observado confirma sua ação antiinflamatória que pode ser do componente majoritário, α -bisabolol, como já relata alguns dados da literatura.

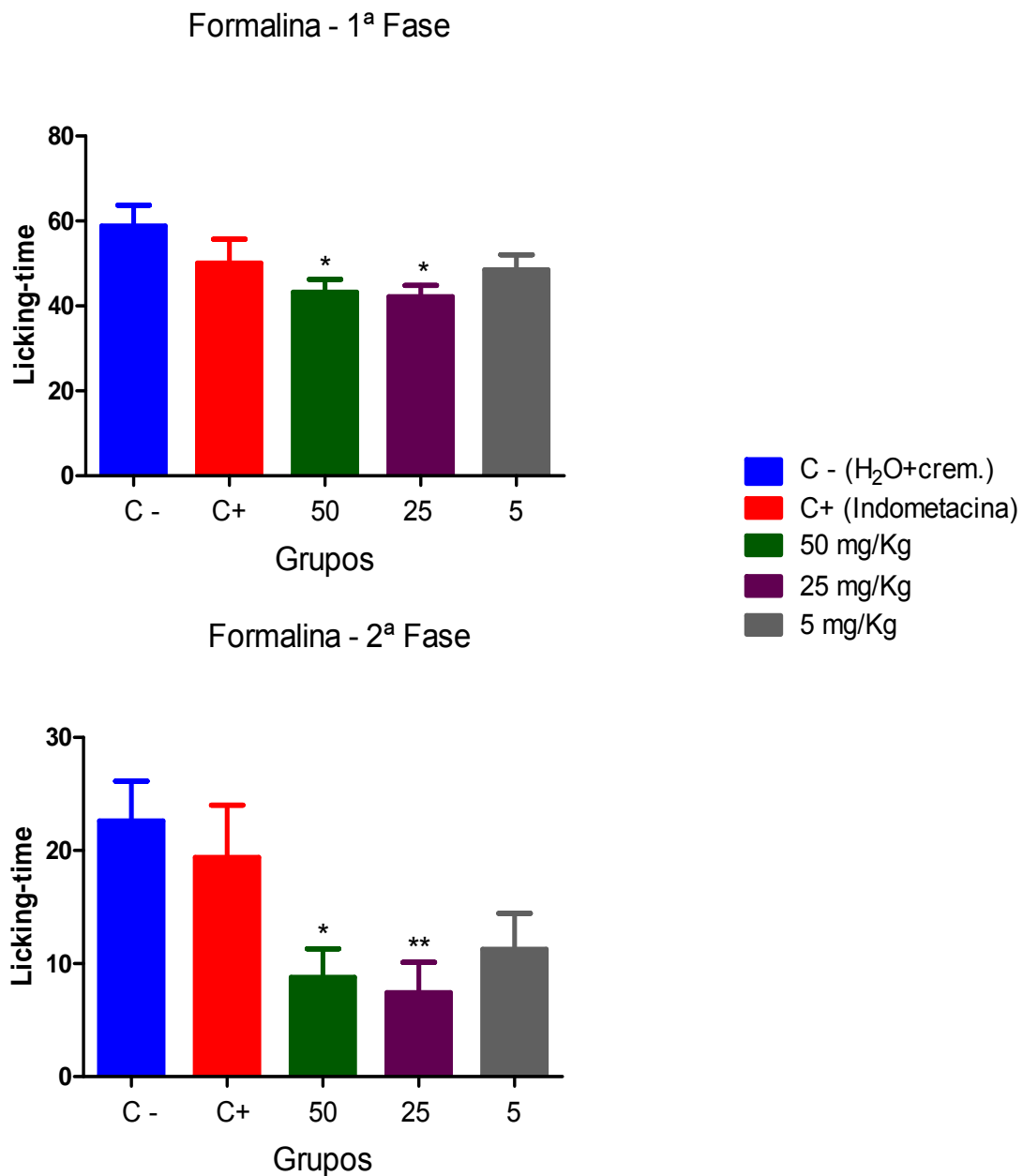


Figura 14 - Os animais (n = 8) foram tratados com OEVA, água e cremophor (controle negativo), indometacina (controle positivo). Os dados representam a média ± E.P.M. do *licking-time* computado em segundos durante os primeiros 5 minutos (1ª fase) e de 15 a 25 minutos (2ª fase) após a injeção de formalina. *p<0,05; **p<0,01, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

6.7. Resultado do teste de edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina

A resposta inflamatória aguda caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e no infiltrado celular, leva à formação de edema como resultado do extravasamento de fluido e proteínas e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório (ARYA & KUMAR, 2005; POSADAS *et al.*, 2004). Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos.

De acordo com os resultados o óleo essencial da *V. arborea*, administrado por via intraperitoneal, reduziu o edema provocado pela injeção intraplantar de carragenina, conforme indicado na figura 15, pag. 94. O OEVA diminuiu a capacidade da carragenina de induzir edema na pata dos camundongos em todos os tempos observados, com intensidade na 2^a, 3^a e 4^a hora de observação onde ocorre o pico da infamação, como vemos na Tabela 8 (anexo).

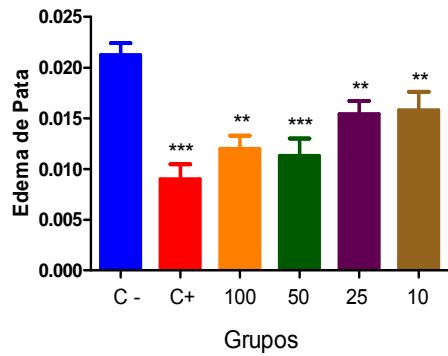
A interferência do óleo essencial neste modelo sugere que substâncias presentes no caule da *V. arborea* podem estar interferindo com o início da resposta inflamatória, apresentando assim atividade antiedematogênica em um processo inflamatório inespecífico, como a carragenina.

Observou-se ainda a duração da ação antiedematogênica do OEVA sobre a 4^a hora do edema. O efeito inibitório foi observado desde o tratamento quatro horas antes, até duas horas depois da carragenina. Isto indica que o(s) composto(s) presente(s) no OEVA responsável(is) por esse efeito possuem ação prolongada, sendo duas horas o tempo mínimo para serem eficazes.

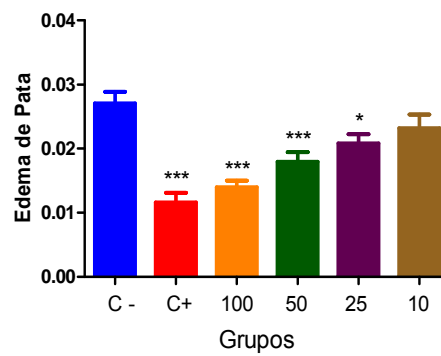
Baseado nos resultados observados neste estudo, o óleo essencial de *V. arborea* possui propriedades antinociceptiva e antiinflamatória também observadas por Silvério *et al.* (2008) em uma espécie do mesmo gênero.

Podendo o OEVA constituir alvo potencial para uso em terapias da dor e da inflamação. Os resultados confirmam seu uso na medicina popular, entretanto, novos estudos necessitam ser realizados para garantir o uso seguro pela população.

Edema de Pata induzido por carragenina (T2)



Edema de Pata induzido por carragenina (T3)



Edema de Pata induzido por carragenina (T4)

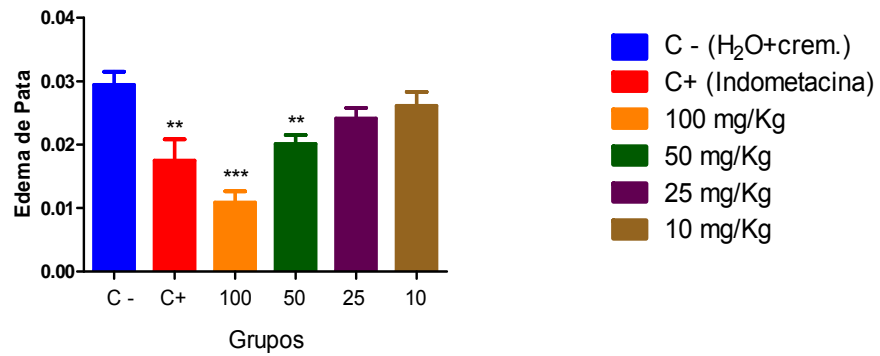


Figura 15 - Teste de edema de pata induzido por carragenina, utilizando camundongos machos Swiss adulto (n = 8). Os dados representam a média ± E.P.M. do aumento no volume da pata durante a 2^a, 3^a e 4^a hora após a injeção de carragenina. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

6.8. Resultado do teste de Campo aberto

O teste de campo aberto é utilizado como medida da emocionalidade em roedores (BROADHURST, 1958; BROADHURST, 1978; ALBONETTI & FARABOLLINI, 1984; ALBONETTI & FARABOLLINI, 1992), além de ser usado para estudar os efeitos ansiolíticos e outras classes de drogas sobre o comportamento em um novo ambiente. Desta forma, a locomoção, *rearing* e *grooming* em roedores observada no campo aberto são os parâmetros comportamentais mais utilizados para descrever influências da reação ao novo habitat ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1955; ARAKAWA & IKEDA, 1991; REX *et al.*, 1996).

A atividade de *rearing* também está relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica estimula um maior comportamento de *rearing* (SWANSON *et al.*, 1997). Em alguns estudos o *rearing* tem sido focalizado como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON & AHLENIUS, 1989), corroborando com a ação de agentes ansiolíticos diminuem o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT, 1994).

O óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* reduziu o número de *rearing* em todas as doses usadas. A dose de diazepam usada neste estudo também reduziu o número de *rearing*, como já era esperado. A redução de *rearing*, induzida pelo OEVA, pode também ser devido à redução da excitabilidade do SNC. Desta forma, a redução do *rearing* observada em camundongos tratados com OEVA, associado a uma redução da atividade locomotora no campo aberto sugere uma possível atividade depressora ou sedativa deste óleo, considerando que, o *rearing* está relacionado com os níveis de excitabilidade do SNC (CUNHA & MASUR, 1978). Perez *et al.* (1998) referem ao fato de que a diminuição da atividade locomotora espontânea é resultante de uma redução na excitabilidade do SNC e sedação (OZTURK *et al.*, 1996).

Os resultados apresentaram uma redução do *grooming*, em todas as doses do OEVA. Dados da literatura mostram que o aumento do *grooming* é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973) e alguns pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas, sedativas ou depressoras reduzem o *grooming* em campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; DUNN *et al.*, 1981; MOODY *et al.*, 1993).

No presente trabalho foi detectada uma redução da atividade locomotora em quase todas as doses estudadas. Foi observada também uma redução no comportamento de *rearing* e *grooming* como mostra a Tabela 9 (anexo). Vale salientar que uma redução

nestes parâmetros também foi observada em animais tratados com diazepam, que foi usado como droga de referência.

A Figura 16 (pag. 97) representa bem o efeito sedativo do OEVA sobre o número de cruzamentos em camundongos no teste de campo aberto. Em relação aos animais controle (média \pm E.P.M.), uma significativa redução do número de cruzamentos foi observado nos animais que receberam 100 e 50 mg/Kg do óleo essencial de *V. arborea* (média \pm E.P.M.; *** $p < 0,001$), no período de observação de 5 minutos.

Podemos acreditar que o efeito sedativo do OEVA é originário do α -bisabolol, visto que o mesmo efeito está presente no óleo essencial da camomila (POVH, 2001) que também apresenta o α -bisabolol como componente principal na sua composição. Entretanto, é necessária a realização de estudos posteriores para confirmação dos dados.

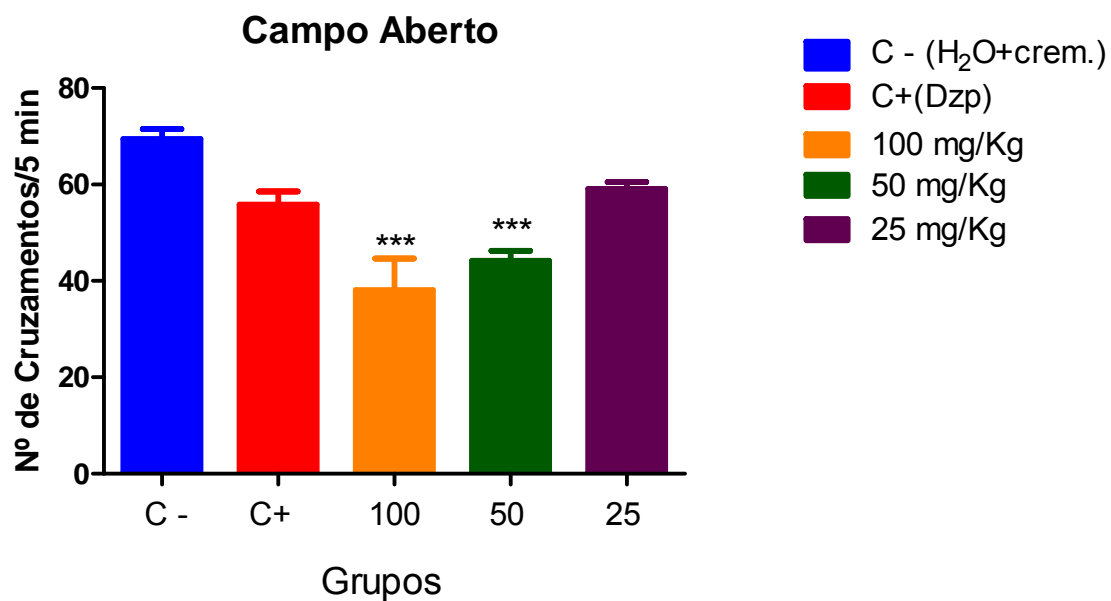


Figura 16 - Os animais (n = 6) foram tratados com OEVA, controles negativo (água e cremophor) e positivo (diazepam). Os dados representam a média ± E.P.M. do número de cruzamentos durante 5 minutos de observação. ***p<0,001, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “*posthoc*”.

6.9. Resultado do teste de Tempo de Sono Induzido por Barbitúrico

De acordo com a literatura, os benzodiazepínicos, tais como o diazepam, agem como ansiolítico (em baixas doses) e anticonvulsivante, produzindo também sedação e efeito relaxante muscular em doses altas (ONAIVI *et al.*, 1992; WOLFFGRAMM *et al.*, 1994). Com base nesta argumentação avaliamos os efeitos do OEVA no tempo de sono induzido por pentobarbital.

É conhecido que a diminuição na latência de sono e o aumento no tempo de sono são classicamente relatados por drogas depressoras do SNC (WILLIANSOON *et al.*, 1996).

Nossos resultados mostram que quanto à indução do sono/seg. não há diferença significativa entre as doses testadas e o controle (fig. 17, pag. 99). Já analisando a duração do sono/seg., conforme a Tabela 10 (anexo) podemos notar que houve um aumento significativo em relação ao controle demonstrando considerável efeito depressor, sedativo e hipnótico.

Vale ressaltar que não foi encontrado nenhum relato sobre estas atividades (sedativa e depressora do SNC) para nenhuma das espécies do gênero *Vanillosmopsis*, sendo desta forma um dado inédito para a literatura.

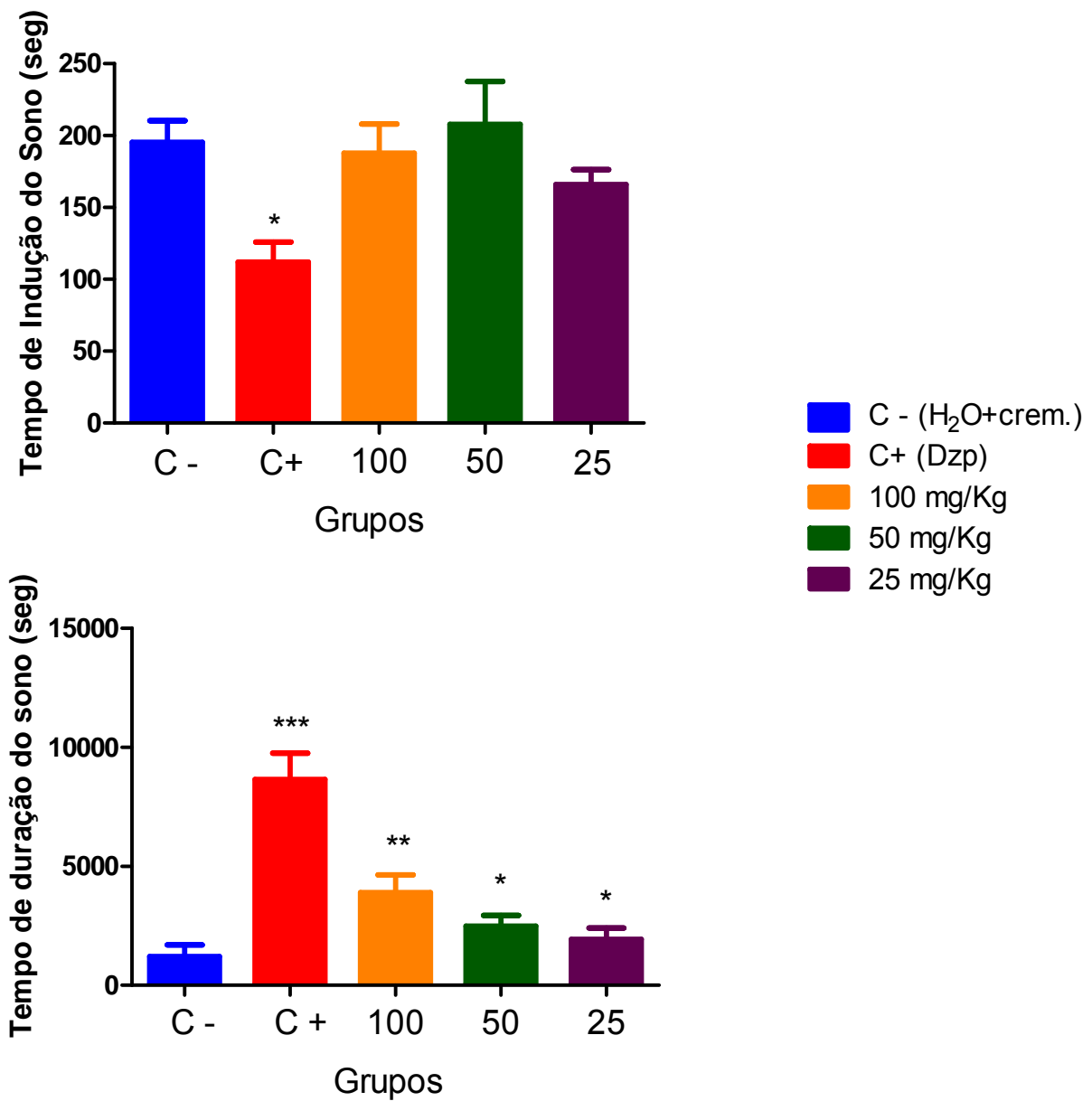


Figura 17 - Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de indução e duração do sono pelos grupos de animais ($n = 6$), que foi computado desde o início do sono até o retorno a posição de alerta. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “posthoc”.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A pesquisa com plantas medicinais envolve investigações da medicina tradicional e popular, isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, bem como investigações farmacológicas.

A investigação química do óleo essencial de *V. arborea* revelou a existência do α -bisabolol (80,43%) como composto majoritário.

Neste estudo foram pesquisadas algumas das atividades biológicas e farmacológicas. Através dos testes realizados foi possível verificar a atividade bacteriostática através de três métodos diferentes bem como o potencial antioxidante do OEVA, e ainda as atividades antiinflamatória, analgésica, ansiolítica, sedativa, depressora do Sistema Nervoso Central e hipnótica.

Para a atividade antioxidante o OEVA não mostrou resultado antioxidante significativo quando comparado com os testemunhos Trolox e BHT.

Para a atividade através da técnica de difusão de disco, o óleo essencial apresentou inibição de crescimento considerável para as bactérias *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) em quase todas as concentrações testadas. O OEVA mostrou também atividade contra a cepa *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e houve ainda inibição de crescimento em praticamente todas as concentrações testadas contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031).

Referente à técnica de contato gasoso, o OEVA mostrou uma atividade de sinergismo contra os antibióticos tetraciclina e tobramicina em quase todas as interações, exceto contra a linhagem *P. aeruginosa*, enquanto que a gentamicina mostrou um efeito antagônico contra a cepa *P. vulgaris*. Podendo, desta forma, observar a ocorrência de interferência do OEVA em algumas interações sobre o poder antibacteriano dos antibióticos.

De acordo com o levantamento bibliográfico não foi encontrado nenhum registro de trabalhos realizados com óleo essencial de *V. arborea* contra as atividades farmacológicas aqui testadas. Tendo como base os resultados obtidos pudemos observar a ação inibitória do óleo essencial de *V. arborea*, extraído do caule da planta, sobre o modelo de edema induzido por carragenina em camundongos, havendo diminuição do edema já após a segunda hora de tratamento. Foi verificada também a eficácia do óleo sobre a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, e também em relação ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e posteriormente o efeito

sedativo, e depressor apresentado pelo OEVA nos modelos de campo aberto e tempo de sono induzido por pentobarbital.

O estudo dos efeitos antinociceptivos e centrais do OEVA em vários modelos comportamentais permitiu concluir que o óleo possui um significativo potencial antinociceptivo, considerando o fato de que as doses mais altas (50 e 25 mg/Kg) foram efetivas na redução das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de formalina, sugerindo uma atividade antinociceptiva. A atividade analgésica também foi demonstrada no teste de formalina (1ª fase).

A literatura mostra que plantas com o α -bisabolol em sua composição, possui, entre suas indicações populares, o uso em quadros inflamatórios. Os estudos realizados neste trabalho com o óleo essencial da *Vanillosmopsis arborea* têm confirmado tal indicação.

Foi observada uma redução dos parâmetros analisados no teste do campo aberto (número de cruzamentos, *rearing* e *grooming*), que sugere um efeito sedativo obtido por doses maiores do OEVA que estão atuando no SNC, assim como os benzodiazepínicos que em doses baixas tem efeito ansiolítico e em doses altas causam sedação (DONALD *et al.*, 1981; STERU *et al.*, 1987). A diminuição da atividade locomotora, a potencialização do pentobarbital induzindo o sono, sugerem uma atividade depressora central (PEREZ *et al.*, 1998) do OEVA, e que a mesma pode atuar como uma droga neurosedativa cerebral (CAPASSO *et al.*, 1996).

Analisando os efeitos neurofarmacológicos do OEVA em camundongos, observa-se que a sua atividade sedativa pode ser atribuída ao α -bisabolol presente nesta planta em função do mesmo está presente no óleo essencial da camomila que é bastante utilizada na medicina popular como calmante natural. Entretanto, para afirmar com certeza o que está sendo dito seria necessário a realização de estudos posteriores utilizando o composto isolado.

Tendo em vista que o OEVA foi efetivo tanto no estudo da atividade antinociceptiva como em testes do SNC como campo aberto e tempo de sono, isso demonstra que, o efeito sedativo do óleo pode produzir uma antinocicepção. Os resultados deste trabalho reforçam a utilização popular da planta, não apenas como antiinflamatória, mas também como analgésica, sedativa e depressora.

E demonstram a necessidade de mais estudos para melhor compreensão de suas atividades farmacológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain** 60: p. 91-102, 1995.
- ADAMS, R. P., Identification of Essential Oils Ion Trap Mass Spectroscopy. San Diego: Academic Press Inc., 2001.
- AESCHBACH, R., LOÈ LIGER, J., SCOTT, B. C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLI-WELL, B., & ARUOMA, O. I. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chemical Toxicology**, v. 32, p. 31-36, 1994.
- ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects of social behavior and emotionality. **Behavioural Brain Research**, v. 62, p. 187-193, 1984.
- ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Behavioural responses to a single and repeated restraint in male and female rats. **Behavioural Processes**, v. 28, p. 97-110, 1992.
- ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., MATOS, F. J. et al. Kovats indices simulation essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.
- ALI, N. A. A.; WURSTER, M.; ARNOLD, N.; LINDEQUIST, U.; WESSJOHAN, L. Chemical Composition of the Essential Oil of *Teucrium yemense* Defflers. **Records of Natural Products**, v. 2, n. 2, p. 25-32, 2008.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; CHINO, I. B.; MITAKOU, S. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 811-815, 2001.

ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiology & Behavior**, v. 50, p. 189-194, 1991.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavioural**, v. 21, p. 205-235, 1973.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of látex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228 – 232, 2005.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, R. P.; DEMYTTENAERE, J. C. R. Sensory and Instrumental Evaluation of Catnip (*Nepeta cataria* L.) Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3840-3848, 2003.

BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., BIONDI, D. M., & RUBERTO, G. Chemical composition, antimicrobial and anti-oxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 618-627, 1998a.

BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., & RUBERTO, G. Antimicrobial and anti-oxidant properties of some commercial oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235-244, 1998b.

BARRA, A.; BALDOVINI, N.; LOISEAU, A. -M.; ALBINO, L.; LESECQ, C.; CUVELIER, L. L. Chemical analysis of French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation/extraction (SDE). **Food Chemistry**, v. 101, p. 1279-1284, 2007.

BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, A. L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABA ergic drugs on *grooming* behavior in the open field. **Pharmacology and Toxicology**, v. 74, p. 229-344, 1994.

BARTLEY, J. P.; JACOBS, A. L. Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 209-215, 2000.

BASILE, A.; SENATORE, F.; GARGANO, R.; SORBO, S.; PEZZO DEL, M.; LAVITOLA, A.; RITIENI, A.; BRUNO, M.; SPATUZZI, D.; RIGANO, D.; VUOTTO, M. L. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) greuter et burdet essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 240-248, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIES, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BOUSSAADA, O.; AMMAR, S.; SAIDANA, D.; CHRILAA, J.; CHRAIF, I.; DAAMI, M.; HELAL, A.N.; MIGHRI, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. **Microbiological Research**, v. 163, p. 87-95, 2008.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-1275, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 971, de 03 de maio de 2006, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC). Diário Oficial da União, 03 de maio de 2006.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rats – III – Strain differences. **Journal of Comparative Physiology**, v. 51, p. 55-59, 1958.

BROADHURST, P. L. Drugs and the inheritance of behavior: a survey of comparative psychopharmacogenetics. **New York: Plenum Press**, v. 2, p. 206, 1978.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium subsp. Millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.

CAPETANOS, C.; SAROGLU, V.; MARIN, P. D.; SIMIC, A.; SKAL TSA, H. D., Essential oil analysis of two endemic *Eryngium* species from Serbia. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 10, p. 961-965, 2007.

CARLINI, E. A. Pesquisa com plantas brasileiras usadas em medicina popular, em Medicamentos, drogas e saúde (Hucitec/Sobravime, ed.), São Paulo, p. 23-28, 1995.

CAVALCANTI, F. S.; NUNES, E. P. Reflorestamento de clareiras na Floresta Nacional do Araripe com *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 12 spl.: p. 94-96, 2002.

CAVALIERI, E., MARIOTTO, S., FABRIZI, C., PRATI, A. C., GOTTARDO, R., LEONE, S., BERRA, L. V., LAURO, G. M., CIAMPA, A. R. E SUZUKIA, H. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 315, p. 589-594, 2004

CHENG, M. J.; LEE, S. J.; CHANG, Y. Y.; WU, S. H.; TSAI, I. L.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. S. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 603-608, 2003.

CHENG, A. -C.; LIN, L. -Y.; YU, T. -H.; PENG, R. Y. Hypolipidemic and antioxidant activity of Mountain Celery (*Cryptotaenia japonica* Hassk) seed essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3997-4003, 2008.

CHERICONI, S.; FLAMINI, G.; ELISABETTA, C.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 423-429, 2004.

CHOI, H. S.; MIN, K. C. Aroma-active compounds of *Elsholtzia splendens* using AEDA and HS-SPME-GC-O dilution analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 58-64, 2008.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G.; HAROUTOUNIAN, S. A. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CHORIANOPOULOS, N.; EVERGETIS, E.; MALLOUCHOS, A.; KALPOUTZAKIS, E.; NYCHAS, G. -J.; HAROUTOUNIAN, S. A. Characterization of the essential oil volatile of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of harvesting time and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3139-3145, 2006.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 877-886, 2007.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, J. G. M.; MAGALHÃES, H. I. F.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PINHEIRO, G. M. Estudo fitoquímico de *Auxemma glazioviana* Taub. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 68-69, 2002.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 392 – 402, 1971.

CUNHA, J. M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, v. 16, p. 259-267, 1978.

CURADO, M. A.; OLIVEIRA, C. B. A.; JESUS, J. G.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2363-2369, 2006.

DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 359, p. 220 – 227, 1999.

DEANS, S. G., RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.

DEANS, S. G. Evaluation of antimicrobial activity of essential oil (volatile) oils. In H. F. Linskens, & J. F. Jackson, Modern methods of plant analysis. **Essential Oils and Waxes**, v. 12, p. 309-320, 1991.

DE ANDRADE, I. L.; BEZERRA, J. N. S.; LIMA, M. A. A.; DE FARIA, R. A. P. G.; LIMA, M. A. S.; ANDRADE-NETO, M. Chemical Composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5879-5881, 2004.

DUBUISSON, D; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain** 4: p. 161-174, 1977.

DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease *grooming* in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 605-608, 1981.

DURAL, H.; BAGCI, Y.; ERTUGRUL, K.; DEMIRELMA, H.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1417-1425, 2003.

EL-GHORAB, A.; SHAABAN, H. A.; EL-MASSRY, K. F.; SHIBAMOTO, T. Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of Juniper Berry (*Juniperus drupacea* L.) Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5021-5025, 2008.

FILIPPI, J. J.; LANFRANCHI, D. A.; PRADO, S.; BALDOVINI, N.; MEIERHENRICH, U. J. Composition, Enantiomeric Distribution, and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Achillea ligustica* All. from Corsica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6308-6313, 2006.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; CIONI, P. L. Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy). **Food Chemistry**, v. 107, p. 671-674, 2008.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Differences in the fragrances of pollen, leaves, and floral parts of Garland (*Chrysanthemum coronarium*) and composition of the essential oils from flowerheads and leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2267-2271, 2003.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life Sciences**, v. 78, p. 856-861, 2006.

GAUVIN, A.; RAVAOMANARIVO, H.; SMADJA, J. Comparative analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oils from bark and leaves of *Cedrelopsis grevei* Baill, an aromatic and medicinal plant from Madagascar. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 279-282, 2004.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2507-2515, 2008.

GÖK, S.; ÖNAL, A.; ÇINAR, M. G.; EVİNÇ, A. The antinociceptive effect of leukotriene D4 receptor antagonist, MK-571, in mice: possible involvement of opioidergic mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, p. 195 – 200, 1999.

GOTTLIEB, O. R., MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap., **Chemist Analyst**, v. 49, p. 114, 1960.

GUO, F.; LIANG, Y.; XU, C.; HUANG, L. Determination of the volatile chemical constituents of *Notoptergium incium* by gas chromatography–mass spectrometry and iterative or non-iterative chemometrics resolution methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 99-110, 2003.

HASHEMI, P.; ABOLGHASEMI, M. M.; FAKHARI, A. R.; EBRAHIMI, S. N.; AHMADI, S. Hydrodistillation–Solvent Microextraction and GC–MS Identification of Volatile Components of *Artemisia aucheri*. **Chromatographia**, v. 66, p. 283-286, 2007.

HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Six sesquiterpenoids from glandular trichome exudates of *Rosa rugosa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 325-329, 1994.

HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6314-6321, 2006.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Zeitschrift für Naturforschung**, 57c, p. 395-402, 2002.

HELANDER, I. M., ALAKOMI, H. L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOM, T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M., & VON WRIGHT, A. Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 243 – 249, 1987.

HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; DE LACRUZ, C., Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow, **Toxicology Letters**, v. 135, p. 103–110, 2002.

HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J. G.; GARCÍA, A. M.; MARTÍNEZ, A.; CABALLERO, J.; VIVAR DE, A. R.; LIRA, R. Composition and antibacterial activity of Essentials oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 551-554, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, F. E.; VIEIRA, C. P. Princípios ativos de plantas superiores. **São Carlos: Edufscar**, 2003. (Série de textos da escola de verão em química, v. IV).

HUGHES, R. N. Chlordiazepoxide- modified exploration in rats. **Psychopharmacology**, v. 24, p. 462-469, 1972.

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

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 565-573, 2001.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KÜRKÇÜOĞLU, M.; ARABACI, T.; KÜPELİ, E.; HÜSNÜ, K. C. B.; Biological activity and composition of the essential oils of *Achillea schischkinii* Sons. And *Achillea aleppica* DC. Subsp. *Aleppica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 170-173, 2006.

JAKOVLEV, V., VON SCHLICHTEGROLL, A. On the inflammation inhibitory effect of (-)-alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil, **Arzneimittelforschung**. v. 19, p. 615–616, 1969.

JAKOVLEV, V., ISAAC, O., THIEMER, K., KUNDE, R., Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides (author's transl.), **Planta Med.** v. 35, p. 125– 140, 1979.

JETT, M. F.; MICHELSON, S. The formalin test in rat: validation of an automated system. **Pain**, v. 64, p. 19-25, 1996.

JIANG, L.; KUBOTA, K. Differences in the volatile components and their odor characteristics of green and ripe fruits and dried pericarp of Japanese Pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4197-4203, 2004.

JIE, H.; TAO, S.; JUN, H.; SHUANGYANG, C.; XIAOQIANG, C.; GUOLIN, Z. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chemistry**, v. 103, p. 355-358, 2007.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SHAFI, M. P.; KANIAMPADY, M. M. Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India, **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 120-124, 2003.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **Journal Psychopharmacology**, v. 3, p. 32-35, 1989.

JONES, C. G.; GHISALBERTI, E. L.; PLUMMER, J. A.; BARBOUR, E. L. Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes; a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood, *Santalum album*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2463-2468, 2006.

KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; BENLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 129-133, 2005.

KALUEFF, A. V. *Grooming* and stress (in Russian). **Avix**, p. 148, 2002.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; VAN ZYL, R. L.; VAN VUUREN, S. F.; LOURENS, A. C. U.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; LINDSEY, K. L.; VAN STADEN, J.; STEENKAMP, P. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 382-390, 2005.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; FIGUEIREDO, A. C.; TILNEY, P. M.; VAN ZYL, R. L.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; VAN VUUREN, S. F. Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 102-108, 2007.

KIRIMER, N.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; DUMAN, H. Essential oils of *Sideritis* species of Turkey belonging to the section *Empedoclia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: Medicina Panamericana, 1993.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeding**, v. 18, p. 412-421, 1959.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; KESDEK, M.; KAYA, Y.; KILIC, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 360-368, 2008.

KOTHARI, S. K.; BHATTACHARYA, A. K.; RAMESH, S. Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 67-72, 2004.

KOVACEVIC, N. N.; SIMIC, M. D.; RISTIC, M. S. Essential oil of *Laurus nobilis* from Montenegro. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 4, p. 408-411, 2007.

KREIPL, A. T.; KÖNING, W. A. Sesquiterpenes from the east African sandalwood *Osyris tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2045-2049, 2004.

KRISTIAWAN, M.; SOBOLIK, V.; AL-HADDAD, M.; ALLAF, K. Effect of pressure-drop rate on the isolation of cananga oil using instantaneous controlled pressure-drop process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 66-75, 2008.

KRUK, M. R.; WESTPHAL, K. G.; VAN ERP, A. M.; VAN ASPEREN, J.; CAVE, B. J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in *grooming* and aggression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 163-177, 1998.

LETCHAMO, W.; WARD, W.; HEARD, B.; HEARD, D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3915-3919, 2004.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.

LIMA, G. R. Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos. 2006. Monografia (Especialização em gestão Pública da Assistência Farmacêutica). Faculdade de Ciências da Saúde de Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

LIMA, I. V. M.; SILVA, M. G. V. & CAVALCANTI, F. S. Estudo Químico de *Vanillosmopsis arboea* – Fonte Cearense de α -bisabolol. In: **XLVI Congresso Brasileiro de Química – 46° CBQ**, Salvador, Livro de Resumos, 2006.

LIS-BALCHIN, M., & DEANS, S, G, Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 82, p. 759-762, 1997.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, P. P.; Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

LOURENS, A.C.U.; REDDY, D.; BASER, K.H.C.; VILJOEN, A.M.; VAN VUUREN, S.F. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 253-258, 2004.

MACFARLAND, C. G. REEDER, W. G. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 34, p. 464-483, 1974.

MADSEN, H. L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 271-277, 1995.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. **Anesthesiology**, v. 79, p. 270-281, 1993.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. & DIAS, J. E. Buscando a saúde por meio das plantas medicinais, en Plantas medicinais (UFV, ed.), Viçosa, p. 17-55, 2000.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molineri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

MASTELIC, J.; POLITEO, O.; JERKOVIC, I.; RADOSEVIC, N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 1, p. 35-40, 2005.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778-786, 2007.

MATOS, M. E. O.; SOUSA, M. P.; MATOS, F. J. A.; and CRAVEIRO, A. A. Sesquiterpenes from *Vanillosmopsis arborea*. **Journal of Natural Products** v. 51, p. 780-782, 1988.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais brasileiras: um desafio para nossos químicos orgânicos. **Desafio**. v 3, p. 5-13, 1990.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Composition and some biological activities of the essential oils from an African pasture grass: *Elionurus elegans* Kunth. **Journal of Agricultural and Foods Chemistry**, v. 50, p. 4240-4243, 2002.

MICHAELAKIS, A.; THEOTOKATOS, S. A.; KOLIOPOULOS, G.; CHORIANOPOULOS, N. G. Essential Oils of *Satureja* Species: Insecticidal Effect on *Culex pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae). **Molecules**, v. 12, p. 2567-2578, 2007.

MONDELLO, L.; CASILLI, A.; TRANCHIDA, P. Q.; CICERO, L.; DUGO, P.; DUGO, G. Comparison of Fast and convencional GC análisis for *Citrus* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5602-5606, 2003.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat *grooming* behavior. In: COLBERN, D. L.; GISPEN, W. H (eds.). Neural mechanisms and biological significance of *grooming* behavior. **Annals of the New York academy of Sciences**, v. 525, p. 281-290, 1988.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat *grooming* behavior. **Annals of the New York academy of Sciences**, v. 90, p. 281-290, 1993.

NASCIMENTO, A. M. A.; BRANDÃO, M. G. L.; OLIVEIRA, G. B.; FORTES, I. C. P.; SOUZA, E. C. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β – bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, p.95-100, 2007.

NAIMI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195, 2004.

ONAIVI, E. S.; MAQUIRI, P. A.; TSAI, N. F.; DAVIES, M. F.; LOCUS, G. H. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 825-831, 1992.

OUSSOU, K. R.; KANKO, C.; GUESSEND, N.; YOLOU, S.; KOUKOUA, G.; DOSSO, M.; N'GUESSAN, Y. T.; FIGUEREDO, G.; CHALCHAT, J.C. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trios plantes aromatiques de Cote-d'Ivoire. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1081-1086, 2004.

ÖZEK, G.; ÖZEK, T.; ISCAN, G.; BASER, K. H. C.; HAMZAOGLU, E.; DURAN, A. Comparison of hydrodistillation and microdistillation methods for the analysis of fruit volatiles of *Prangos pabularia* Lindl., and evaluation of its antimicrobial activity. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 563-569, 2007.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K. H. C.; BERBEROGLU, H. Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PALÁ-PAÚL, J.; BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FONTANIELLA, B. Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a canary Islands endemic species, growing in Australia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 55-62, 2004.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉEZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; SANZ, J. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the volatile components of *Ageratina adenophora* Spreng., growing in the Canary Islands. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 327-331, 2002.

PAULI, A., α -bisabolol from Chamomile – A specific ergosterol biosynthesis inhibitor? **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 21-25, 2006.

PAVLOVIC, M.; PETROVIC, S.; RISTIC, M.; MAKSIMOVIC, Z.; KOVACEVIC, N. Essential oil of *Filipendula hexapetala*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 2, p. 228-229, 2007.

PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A. L.; GARCIA, L. D. M.; SOSSA, H. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PETTIBONE, D. J.; MULLER, G. P. Alpha adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. **Endocrinology**, v. 109, p. 798-802, 1989.

POLYANSKAYA, E. V.; KOROLYUNK, E. A.; TKACHEV, A. V. Composition of essential oil from *Artemisia glauca* from Western Siberia. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 5, p. 544-547, 2007.

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

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p. 245-256, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia, 5^a ed. **Elsevier Editora Ltda**, 2004.

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

REYNOLDS, J. E. F. Martindale – the extra pharmacopeia (31 st ed.) **London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain**, 1996.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. “Anxiolytic” action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M. C.; YOUNOS, C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F.; PELT, J. M. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschorascholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. **Planta Medica**, v. 57, p. 212-216, 1991.

- ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. **Viçosa: Editora UFC**, 2001.
- ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B. The formalin test in mice-effects of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235, 242, 1990.
- ROSSI, P. G.; BAO, L.; LUCIANI, A.; PANIGHI, J.; DESJOBERT, J. M.; COSTA, J.; CASANOVA, J.; BOLLA, J. M.; BERTI, L. (E)-Methylisoeugenol and Elemicin: Antibacterial Components of *Daucus carota* L. Essential Oil against *Campylobacter jejuni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7332-7336, 2007.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.
- SAFARALIE, A.; FATEMI, S.; SEFIDKON, F. Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran comparative analysis between supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1180, p. 159-164, 2008.
- SCHILCHER, H. Pharmakologie und Toxikologie in: Die Kamille, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany, 1987.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. Plantas medicinais, fitomedicamentos e fitoterapia, en Fitoterapia racional – um guia de fitoterapia para as ciências da saúde, **Mande, Ed.**, Barueri, p. 1-40, 2002.
- SHANE, G.G., WYLLIE, S.G., MARKHAM, J.L., LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 322–332, 1999.
- SHIBATA, M; OHKUBO, T; TAKAHASHI, H; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain** 38: p. 347-352, 1989.

SHUNYING, Z.; YANG, Y.; HU Aidong, Y.; YUE, Y.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 151-158, 2005.

SIEGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **Journal of Psychology**, v. 21, p. 227, 1946.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SILVÉRIO, M. S.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. V.; MIRANDA, M. A.; MATHEUS, F. C.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 430-435, 2008.

SIMÕES, C. M. O., SEBENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R., Farmacognosia – da planta ao medicamento, 4ª edição, **Ed. UFSC**, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacologia: da Planta ao Medicamento. **6ª Ed. Porto Alegre:UFRGS; Florianópolis:UFSC**, 2007.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 174-181, 2006.

SKAL TSA, H. D.; DEMETZOS, C.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry**, v. 64, p. 743-752, 2003.

SOKOVIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button

mushroom, *Agaricus bisporus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, p. 211-224, 2006.

SONG, G.; DENG, C.; WU, D.; HU, Y. Headspace Solid-phase Microextraction–Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis of the Essential Oils of Two Traditional Chinese Medicines, *Angelica pubescens* and *Angelica sinensis*. **Chromatographia**, v. 59, p. 343-349, 2004.

SONG, L.; DING, J.; TANG, C.; YIN, C. Compositions and Biological Activities of Essential Oils of *Kadsura longepedunculata* and *Schisandra sphenanthera*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, n. 2, p. 353-364, 2007.

SOUSA, O.V.; DUTRA, R. C.; YAMAMOTO, C. H.; PIMENTA, D. S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 2, p. 113-116, 2008.

SOUZA BRITO, A. R. M. & SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

STOUT, J. C.; WEISS, J. M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and anxiolytic manipulation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SULEIMENOV, Y. M.; ATAZHANOVA, G. A.; OZEK, T.; DEMIRCI, B.; KULYYASOV, A. T.; ADEKENOV, S. M.; BASER, K. H. C. Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 37, n. 5, p. 447-450, 2001.

SWANSON, C. J.; HEATH, S.; STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 933-945, 1997.

SZÖKE, E.; MÁDAY, E.; TYIHÁK, E.; KUZOVKINA, I. N.; LEMBERKOVICS, E. New terpenoids in cultivated and chamomile (in vivo and in vitro). **Journal of Chromatography B**, v. 800, p. 231-238, 2004.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; CROCKETT, S. L.; BASER, K. H. C.; WEDGE, D. E. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8430-8435, 2007.

TAKAHASKI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 5, p. 607-610, 1987.

TEPE, B., DONMEZ, E., UNLU, M., CANDAN, F., DAFERERA, D., VARDAR-UNLU, G., POLISSIOU, M., SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry** 84, 519-525, 2004.

THAKEOUW, P.; ANGELI, S.; WEIBBECKER, B.; SCHÜTZ, S. Antennal and behavioral responses of *cis* boleti to fungal odor of *Trametes gibbosa*. **Chemical Senses**, v. 33, p. 379-387, 2008.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HÜNSKAAR, S.; RASLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evolution of the method. **Pain** 51: p. 5-17, 1992.

TOGNOLINI, M.; BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; CHIAVARINI, M.; IMPICCIATORE, M. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**, v. 78, p. 1419-1432, 2006.

TOLEDO ACO *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, p. 7-13, 2003.

TORI, M.; WATANABE, A.; MATSUO, S.; OKAMOTO, Y.; TACHIKAWA, K.; TAKAOKA, S.; GONG, X.; KURODA, C.; HANAI, R. Diversity of *Ligularia kanaitzensis* in sesquiterpenoid composition and neutral DNA sequences. **Tetrahedron**, v. 64, p. 4486-4495, 2008.

TRABER, J.; SPENCER, D. G.; GLASER, T.; GISPEN, W. H. Actions of psychoactive drugs on ACTH - and novelty – induced behavior in the rat. In: COLBERN, D. L.; GISPEN, W. H. (eds.). Neural mechanisms and biological significance of *grooming* behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, p. 270-280, 1988.

ÜNLÜ, M.; DAFERERA, D.; DÖNMEZ, E.; POLISSIOU, M.; TEPE, B.; SÖKMEN, A. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 117-121, 2002.

URZÚA, A.; ITURRA, B.; SEBASTIÁN, B.; MUÑOZ, M. Chemical components from the surface of *Haplopappus bustillosianus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 794-796, 2007.

VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; CHINOU, I. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of three *Satureja* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 103, p. 319-324, 2007.

VAN ERP, A. M. M.; KRUK, M. P.; MEELIS, W.; WILLEKEN-BRAMER, D. Effects of environmental stressors on time course, variability and from of self – *grooming* in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 65, p. 47-55, 1994.

VAN TOL, R. W. H. M.; VISSER, J. H. Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 102, p. 49-64, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera*

multijuga Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VELASCO-NEGUERUELA, A.; PÉEZ-ALONSO, M. J.; PAZ DE, P. L. P.; PALÁ-PAÚL, J.; SANZ, J. A nalysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oil from the aerial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary Islands, Spain. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 241-244, 2003.

VIAN, M. A.; FERNANDEZ, X.; VISINONI, F.; CHEMAT, F. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 14-17, 2008.

VILLEGAS, L.F., MARCALO, A., MARTIN, J., FERNÁNDEZ, I.D., MALDONADO, H., VAISBERG, A.J., HAMMOND, G. B., (+)-epi-alpha-bisabolol [correction of bisabolol] is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1357– 1359, 2001.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 84, p. 185-191, 1985.

WANG, M., LI, J., RANGARAJAN, M., SHAO, Y., LAVOIE, E. J., HUANG, T. C., HO, C. T. Antioxidantive phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4869-4873, 1998.

WEI, E. T.; KIANG, J. G.; BUCHAN, P.; SMITH, T. W. Corticotropin – releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. **Journal of Pharmacology Experimental Theoretical**, v. 238, p. 783-787, 1986.

WENG, X. C., & WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeian*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 489-493, 2000.

WILLIANSO, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F. J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. **Wiley**, Chichester, p. 228, 1996.

WOLFFGRAMM, J.; MIKOLAICZY, K. C.; COPER, H. Acute and subchronic benzodiazepine-barbiturate-interactions on behavior and physiological response of the mouse. **Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology**, v. 349, p. 279-286, 1994.

WU, S.; KRINGS, U.; ZORN, H.; BERGER, R. G. Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer: Fr.) Fr. **Food Chemistry**, v. 92, p. 221-226, 2005.

YADAV, A. R.; CHAUHAN, A. S.; REKHA, M. N.; RAO, L. J. M.; RAMTEKE, R. S. Flavour quality of dehydrated lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]. **Food Chemistry**, v. 85, p. 59-62, 2004.

YANISHLIEVA, N. V., MARINOVA, E. M., GORDON, M. H., & RANEVA, V. G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, p. 59-66, 1999.

YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociceptive by tripelenamine in the rat. **Journal of Pharmacology Experimental Theoretical**, v. 235, p. 683-689, 1985.

ZHAO, J.; NAN, P.; ZHONG, Y. Chemical composition of the essential oils of *Clausena lansium* from Hainan Island, China. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 153-156, 2004.

ZIEGENBEIN, F. C.; HANSSEN, H.; KÖNING, W. A. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 202-211, 2006.

ANEXOS

Tabela 8 - Efeito do OEVA sobre edema de pata induzido por carragenina, utilizando camundongos machos Swiss adulto (n = 8). Os dados representam a média \pm E.P.M. do aumento no volume da pata durante a 2^a, 3^a e 4^a hora após a injeção de carragenina. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “posthoc”.

Grupos	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₂₄
C -	0.013 \pm 0.0011	0.021 \pm 0.0011	0.027 \pm 0.0018	0.029 \pm 0.0020	0.018 \pm 0.0026
C+ (10 mg/Kg)	0.007 \pm 0.0012	0.009 \pm 0.0015***	0.012 \pm 0.0014***	0.017 \pm 0.0033**	0.008 \pm 0.0012
100 mg/Kg	0.010 \pm 0.0012	0.012 \pm 0.0013**	0.014 \pm 0.0010***	0.010 \pm 0.0018***	0.007 \pm 0.0013
50 mg/Kg	0.006 \pm 0.0012**	0.011 \pm 0.0017***	0.018 \pm 0.0015***	0.020 \pm 0.0014**	0.011 \pm 0.0022
25 mg/Kg	0.010 \pm 0.0014	0.015 \pm 0.0013**	0.021 \pm 0.0014*	0.024 \pm 0.0017	0.013 \pm 0.0027
10 mg/Kg	0.010 \pm 0.0020	0.016 \pm 0.0018**	0.023 \pm 0.0021	0.026 \pm 0.0022	0.015 \pm 0.0029

C -: água e cremophor; C +: indometacina; **OEVA**: Óleo essencial de *V. arborea*; T₁-T₂₄: Tempos de medição do volume da pata.

Tabela 9 - Efeito do óleo essencial de *V. arborea* no teste do campo aberto em camundongos. Os animais (n = 6) foram tratados com OEVA, controles negativo e positivo nas doses indicadas. Os dados representam a média ± E.P.M. do número de cruzamentos durante 5 minutos de observação. *p<0,05; ***p<0,001 análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “posthoc”.

Grupo	Dose (mg/Kg, i.p.)	Nº de cruzamento (5 min)	“Rearing” (5 min)	“Grooming” (5 min)
C -		69.0 ± 2.08	24.0 ± 1.0	3.0 ± 0.2
C +	1	56.0 ± 2.7	11.0 ± 2.2***	2.0 ± 0.5
	100	38.0 ± 6.5***	10.0 ± 1.8***	2.0 ± 0.3
OEVA	50	44.0 ± 2.05***	15.0 ± 1.4***	2.0 ± 0.2
	25	59.0 ± 1.4	16.0 ± 1.1***	1.0 ± 0.2*

C -: água e cremophor; C +: diazepam; OEVA: Óleo essencial de *V. arborea*.

Tabela 10 - Efeito do OEVA sobre o tempo de indução e duração do sono induzido por Barbitúrico em camundongos. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de indução e duração do sono pelos grupos de animais ($n = 6$), que foi computado desde o início do sono até o retorno a posição de alerta. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls como teste “posthoc”.

Grupos	Dose (mg/Kg)	Tempo de indução do sono/seg.	Tempo de duração do sono/seg.
C -		195 \pm 15	1857 \pm 771
C +	1	112 \pm 14*	7820 \pm 1288***
	100	188 \pm 20.3	3587 \pm 915**
OEVA	50	208 \pm 30	2477 \pm 453*
	25	166 \pm 10.6	1931 \pm 470*

C -: água e cremophor; C +: diazepam; OEVA: Óleo essencial de *V. arborea*.