



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis martiusii*
BENTH.

Andreza Guedes Barbosa Ramos

CRATO – CE

2014

Andreza Guedes Barbosa Ramos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis martiusii* BENTH.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como objetivo de obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

CRATO – CE

2014

Ramos, Andreza Guedes Barbosa
R175a Avaliação da atividade anti-inflamatória
e antinociceptiva do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth/
Andreza Guedes Barbosa Ramos. – Crato-CE, 2014
98p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade
Regional do Cariri – URCA. Área de Concentração: Bioprospecção
de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos
Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose
Alencar de Menezes

1. Inflamação; 2. *Hyptis martiusii*; 3. Nocicepção;
- I. Título.

Andreza Guedes Barbosa Ramos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis martiusii*
BENTH.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como objetivo de obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Banca de defesa

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Orientador)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Rogério Saraiva de Aquino (Membro externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Roseli Barbosa (Membro interno)
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho (Suplente)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico aos meus pais, **Pedro Guedes Sobrinho** e **Sandra Barbosa Ramos Guedes**, a minha irmã, **Alana Guedes Barbosa Ramos** e em especial ao meu eterno “irmão”, **Thiago Saraiva Ramos** (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, o grande Pai, a quem dedico todo o meu viver. Criador soberano que sempre me carregou no colo. Obrigada por me ensinar a acreditar nos homens e no seu poder de mudança.

Aos meus pais, Sandra Barbosa Lima Ramos e Pedro Guedes Sobrinho, pais exemplares, amor gratuito nas horas mais difíceis. Mãe, a mulher que me tornei foi espelhada na tua garra diária, regando minha vida com honestidade e sabedoria. Pai, que bom poder sentir o seu amor sincero. Alana, minha irmã tão esperada, companheira e amiga, obrigada por me ensinar, do seu jeito particular, o quanto é magnífico o dom da paciência.

A toda minha família, tios e primos, em especial ao meu avô Joel Mota Ramos, que partiu acreditando no meu potencial. Sinto muitas saudades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pela oportunidade oferecida há cinco anos. Teus ensinamentos jamais serão esquecidos. Muito obrigada!

A Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf, uma grande amiga; obrigada por oferecer a mão e palavras sábias quando precisei. A convivência me deu a oportunidade de conhecer uma grande mulher. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, um grande amigo, sábio em cada palavra proferida. Obrigada pelo carinho!

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, coordenado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa, pela catalogação da exsicata e identificação botânica da espécie em estudo.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Prof. Alisson Pontes Pinheiro e Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular pelos conhecimentos transmitidos durante esses dois anos de muito crescimento.

À Luiz Jardelino de Lacerda Neto, pela dedicação e carinho durante todo esse tempo de convivência, e por sempre acreditar em mim. Eu também acredito em você.

Às minhas grandes amigas, Renata Alves Bezerra e Alaiane Abreu Nunes pela amizade sincera e gratuita. Vocês são um presente de Deus na minha vida.

Meu carinho a Cícera Datiane, Andressa de Alencar, Thalles Coutinho, Valterlúcio dos Santos, Severino Denício e Rodolpho de Nóbrega Figueiredo, sempre de coração aberto a me ajudar. Esse trabalho é nosso!

Aos amigos de laboratório, aqueles que passaram por minha vida e aos que se encontram presentes; dentre aqueles que hoje brilham por outros caminhos, Mariana Késsia, Gerlânia Leite e Rogério Saraiva, jamais esquecerei o apoio que vocês me deram quando da minha chegada no laboratório. A todos meu muito obrigada!

Às amigas Cinara Soares Vidal, Sharlene Maria Oliveira e Larissa Rolim, as famosas “pés”, obrigada pela amizade.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelo companheirismo e experiências compartilhadas; meu muito obrigada!

À URCA e aos funcionários desta IES por me acolherem e acompanharem meu crescimento profissional.

Aos meus alunos, motivo de ser da minha profissão. Obrigada pelo carinho dispensado.

Às secretárias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, pela solicitude.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização desse estudo, meus sinceros agradecimentos.

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil a tua direita, mas não chegarás a ti”.

Sl 91, 7

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis martiusii* BENTH.

Ramos, A. G. B.

RESUMO

O grande avanço científico nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visam a busca por novos compostos com atividade terapêutica e nesse contexto destaca-se a espécie *Hyptis martiusii* (Lamiaceae) com inúmeras atividades biológicas já comprovadas na literatura. O óleo essencial de *Hyptis martiusii* (OEHM) foi avaliado quanto à sua possível atividade anti-inflamatória e antinociceptiva nos modelos de inflamação tópica aguda e crônica, modelos de inflamação sistêmica e ensaios antinociceptivos. Foram utilizados camundongos *Swiss* (20-30g) e o óleo foi administrado nas doses de 50, 75 e 100mg/kg, sendo a última dose a mais efetiva em todos os ensaios. A análise química do óleo revelou o 1,8 – cineol (34,58) e o δ careno (21,58%), como os constituintes majoritários do óleo essencial. A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada pelo ensaio do edema de orelha, agudo e crônico, sem redução significativa do processo edematogênico ocasionado pelo agente irritante óleo de cróton em ambos os modelos. Já a atividade anti-inflamatória sistêmica foi avaliada pelo ensaio de edema de pata (induzido por carragenina, dextrana e histamina), peritonite, extravasamento vascular, e dosagem da mieloperoxidase. No ensaio de edema de pata induzido por diferentes agentes, o OEHM foi capaz de reduzir significativamente o processo edematogênico ocasionado pela carragenina, dextrana e histamina, sendo a dose de 100mg/kg a mais efetiva na redução do edema. No modelo de peritonite, o OEHM foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos totais e neutrófilos para cavidade peritoneal, sendo efetivo também na redução da permeabilidade vascular. Já no ensaio onde a enzima mieloperoxidase foi dosada, o OEHM não reduziu a atividade da referida enzima. Os resultados mostraram que OEHM demonstrou ter atividade antinociceptiva nos modelos da placa quente, contorções abdominais por ácido acético, formalina e hipernocicepção mecânica plantar. No modelo da placa quente, o OEHM nas doses de 75 e 100mg/kg se mostrou efetivo ao aumentar ao tempo de permanência do animal na placa aquecida. Já no ensaio das contorções induzidas por ácido acético, o OEHM em todas as doses testadas reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético. O pré-tratamento com OEHM na dose de 100mg/kg reduziu significativamente a nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela primeira e segunda fase respectivamente do teste de formalina e no teste de hipernocicepção mecânica o OEHM também se apresentou eficaz, aumentando o limiar de dor dos animais. A investigação do mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do OEHM revela uma possível participação dos receptores opioides, TRPV1 e α 2-noradrenérgicos. Em síntese, esses resultados indicam que o OEHM possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos (químicos e térmicos) de dor e modelos químicos de inflamação. Além disso, é provável que o OEHM esteja envolvido nos mecanismos de inibição ou liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na geração da dor e inflamação, podendo ainda atuar por uma resposta antinociceptiva a nível de sistema central.

Palavras-chave: Inflamação, *Hyptis martiusii*, nocicepção.

EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES
OF *Hyptis martiusii* BENTH. ESSENTIAL OIL

Ramos, A. G. B.

Abstract

Great scientific advances in chemical and pharmacological studies of medicinal plants, have been used to search for new compounds with therapeutic activity, and in this context highlights the *Hyptis martiusii* (Lamiaceae) species with plenty of biological activities proved in the literature. The essential oil of *Hyptis martiusii* (OEHM) was evaluated for its possible anti - inflammatory and antinociceptive activity in models of acute and chronic topical inflammation, systemic inflammation models and antinociceptive tests. Swiss mice (20 - 30g) were used and the oil was administered at doses of 50, 75 and 100mg/kg , the last one was the most effective dose in all assay. Chemical analysis revealed the oil 1,8 - cineole (34,58%) and δ -carene (21.58%) as majoritarian constituents of essential oils. Topical anti-inflammatory activity was evaluated by testing the ear edema, acute and chronic, with no significant reduction in edematogenic process caused by croton oil irritant in both models. In addition the systemic anti - inflammatory activity was evaluated by testing paw edema (induced by carrageenan, dextran and histamine), peritonitis, vascular leakage, and determination of myeloperoxidase activity. In the trial of paw edema induced by different agents, OEHM was able to significantly reduce the edematogenic process caused by carrageenan, dextran and histamine, and the dose of 100mg/kg was the most effective in reducing edema. In peritonitis model, OEHM was able to reduce the influx of total leukocytes and neutrophils into the peritoneal cavity also being effective in reducing vascular permeability. The test in which the enzyme myeloperoxidase was measured, the OEHM did not reduce the activity of that enzyme. The results showed that OEHM demonstrated to have antinociceptive activity in models of hot plate, abdominal writhing by acetic acid, formalin and hypernociception mechanical planting. In the model of the hot plate, the OEHM at doses of 75 and 100mg/kg was effective to increase the permanence time of the animal on hot plate. In the test of writhing induced by acetic acid, the OEHM at all doses tested decreased the nociceptive response induced by acetic acid significantly. Pretreatment with OEHM at a dose of 100mg/kg significantly reduced nociception and neurogenic inflammation induced by the first and second phases respectively of the formalin test, and in the test of mechanical hypernociception, OEHM also performed effectively, increasing the threshold of the pain of the animals. The investigation of the mechanisms involved in the antinociceptive activity of OEHM reveals a possible involvement of opioids, TRPV1 and α 2 - noradrenergic receptors. In summary, these results indicate that OEHM has anti- inflammatory and antinociceptive activity in models (chemical and thermal) of pain and inflammation chemical models. Furthermore, it is likely that the OEHM is involved in the inhibition mechanism or release of pro- inflammatory mediators involved in inflammation and pain generation, and may operate by an antinociceptive response at the level of the central system.

Keywords: Inflammation, *Hyptis martiusii*, nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	27
Figura 2 - Via ascendente da dor.....	34
Figura 3 - Excicata de <i>Hyptis martiusii</i>	41
Figura 4 - Efeito do tratamento tópico de OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre influência da aplicação única de óleo de cróton após 6h.	53
Figura 5 - Efeito do tratamento tópico de OEHM 100mg/kg sobre influência da aplicação múltipla de óleo de cróton após 9 dias.	55
Figura 6 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina 1% em camundongos.....	57
Figura 7 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o edema induzido por dextrana 1% em camundongos.....	59
Figura 8 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o edema induzido por histamina em camundongos.....	60
Figura 9 - Efeito da administração de OEHM 100mg/kg sobre a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina medida pela concentração de leucócitos no fluido peritoneal.	61
Figura 10 - Efeito da administração de OEHM 100mg/kg sobre a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina medida pela concentração de neutrófilos no fluido peritoneal.	62
Figura 11 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans no lavado peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.	64
Figura 12 Efeito do OEHM 100mg/kg sobre a atividade da mieloperoxidase na inflamação induzida por carragenina.	65
Figura 13 Efeito do OEHM na atividade exploratória de camundongos no campo aberto.....	67
Figura 14 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o tempo de lambertura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina.	69
Figura 15 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o estímulo nociceptivo térmico induzido em camundongos.....	71

Figura 16 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	73
Figura 17 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina	75
Figura 18 – Efeito antinociceptivo do OEHM 100mg/kg no modelo de nocicepção visceral induzida pelo óleo de mostarda em camundongos	77
Figura 19 - Estudo do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg	78
Figura 20 - Estudo do envolvimento do receptor TRPV1 no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg	80
Figura 21 - Estudo do envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiussi* Benth. ...52

LISTAS DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de edema	43
Equação 2 - Cálculo para efeito inibitório médio.....	43

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS.

IL -1- interleucina

AA - ácido araquidônico

AINES - antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância)

CEUA- Comissão de Experimentação e Uso de Animais

CG – cromatografia gasosa

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX 2- cicloxigenase-2

COX- cicloxigenase

EPM – erro padrão da média

EIM – efeito inibitório médio

GABA- ácido gama- aminobutírico

i.p. – intraperitoneal

IK – constante de Kovacs

LOX – lipoxigenase

MPO – mieloperoxidase

n – número

NIH - *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde)

NMDA - N-metil-D-aspartato

OEHM – óleo essencial de *Hyptis martiusii*

p/v – peso por volume

PBS - *phosphate buffered saline* (tampão fosfato – salino)

PGE2 – prostaglandina E tipo 2

PKC – proteína quinase C

rpm – rotações por minuto

s.c. - subcutâneo

SCP – substância cinzenta periaquedutal

TNF- fator de necrose tumoral

TPA - acetato de tetradecainol-forbol

Tr – tempo de retenção

TRPV– *transient receptor potential vanilloid* (receptor de capsaicina)

TRPV1 - *transient receptor potential vanilloid* (receptor de capsaicina tipo 1)

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1	Introdução	22
1.1	Referencial teórico	23
1.1.1	Plantas medicinais	23
1.1.2	Óleos essenciais	24
1.1.3	Familia Lamiaceae – Gênero Hyptis	25
1.1.4	Hyptis martiusii BENTH.	26
1.1.5	Inflamação	28
1.1.6	Nocicepção e Dor	30
1.2	Justificativa	36
2	Objetivos	38
2.1	Geral	38
2.2	Específicos	38
3	Materiais e métodos	40
3.1	Exigências Legais: Aspectos Éticos da Pesquisa	40
3.2	Material Botânico	40
3.3	Extração do óleo essencial	41
3.4	Análise química do óleo essencial das folhas de Hyptis martiusii Benth.	41
3.5	Animais	42
3.6	Atividade Anti-inflamatória Tópica	42
3.6.1	Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton	42
3.6.2	Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	42
3.6.3	Quantificação do edema e do efeito inibitório médio	43
3.7	Atividade Anti-inflamatória Sistêmica	44
3.7.1	Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina ou dextrana	44
3.7.2	Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de histamina	44
3.7.3	Peritonite	44
3.7.4	Permeabilidade vascular por extravasamento de Azul de Evans	45
3.7.5	Dosagem da Mieloperoxidase	45
3.8	Avaliação da atividade locomotora pelo campo aberto ou “open field”	45
3.9	Atividade antinociceptiva	46
3.9.1	Teste da formalina	46
3.9.2	Teste da placa quente ou “Hot-plate”	46
3.9.3	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	46

3.9.4	Teste de hipernocicepção mecânica plantar.....	47
3.9.5	Nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda.....	47
3.9.6	Mecanismos de ação para nocicepção	48
3.10	Análise Estatística.....	48
4	Resultados e discussão.....	51
4.1	Análise química	51
4.2	Atividade anti-inflamatória tópica	53
4.2.1	Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	53
4.2.2	Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	54
4.3	Atividade anti-inflamatória sistêmica.....	56
4.3.1	Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	56
4.3.2	Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de dextrana e histamina.....	58
4.3.3	Peritonite	61
4.3.4	Permeabilidade vascular por extravasamento de Azul de Evans.....	63
4.3.5	Dosagem da Mieloperoxidase	65
4.4	Avaliação da atividade locomotora pelo campo aberto (“open field”).....	66
4.5	Atividade antinociceptiva	68
4.5.1	Teste da Formalina.....	68
4.5.2	Teste da Placa Quente ou Hot Plate	71
4.5.3	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	72
4.5.4	Hipernocicepção Mecânica Plantar.....	75
4.5.5	Nocicepção visceral induzida pelo óleo de mostarda	76
4.5.6	Mecanismos de ação para atividade antinociceptiva visceral.....	78
5	Conclusão	85
6	Referências	87

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia vem crescendo notadamente, constituindo-se como fonte de terapia medicinal, a partir do grande avanço científico nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando à busca por novos compostos com atividade terapêutica. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de estudo de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de ensaios pré-clínicos com animais (HAVSTEEN, 1983) tendo essas substâncias, grandes possibilidades de se tornarem importantes agentes terapêuticos.

Dentro dessa perspectiva e considerando que o Brasil possui uma extensa e diversificada flora, chegando a deter um terço da flora mundial (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001) é significativo o número cada vez maior de grupos de pesquisa que tem contribuído para o desenvolvimento da química e da farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas.

Em um contexto local, a região do Cariri, está localizada ao Sul do Estado do Ceará, tem sua geografia marcada pela Chapada do Araripe, com uma área de proteção ambiental e uma floresta nacional, essa última compreendendo uma cobertura vegetal que envolve áreas de cerrado, mata úmida, cerradão, caatinga e carrasco (DA SILVA AUGUSTO e GÓES, 2007).

Em meio a essa biodiversidade local é evidente o grande número de estudos etnofarmacológicos, sendo possível encontrar o uso de plantas nativas com finalidade de cura e tratamento de enfermidades humanas. Dentre as espécies vegetais utilizadas pelas comunidades da Chapada do Araripe, destaca-se a cidreira-brava (*Hyptis martiusii* BENTH), espécie pertencente ao gênero *Hyptis* e família Lamiaceae. Atividades antitumorais, citotóxicas e inseticidas (COSTA-LOTUFO et al., 2004; COSTA et al., 2005), antimicrobiana (COUTINHO et al., 2008) e antiulcerogênica (CALDAS et al., 2011) já foram relatadas na literatura, no entanto, observa-se que estudos acerca de um possível potencial anti-inflamatório e antinociceptivo são ainda incipientes, com poucos relatos na literatura.

A etnofarmacologia sugere que partes dessa espécie, como folhas e raízes, possuem constituintes com princípios ativos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos com possíveis atividades anti-inflamatórias e analgésicas.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais teve início há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar patologias, como uma forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (SOUSA et al., 2008). As plantas medicinais são de grande importância para a saúde de toda população mundial e apesar dos grandes avanços da medicina moderna nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas, estimando-se que 25-30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos, são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; JUNIOR e MELLO, 2008).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL et al., 2002).

O grande avanço da ciência, envolvendo estudos químicos e farmacológicos, cujas matérias primas são as plantas medicinais, visam à obtenção de compostos inéditos com propriedades terapêuticas. Novos compostos, com importante atividade farmacológica, são descobertos e relatados na literatura todos os dias. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica (FARNSWORTH e SOEJARTO, 1991).

De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, a botânica, a farmacologia e a fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002)

A etnobotânica como ciência que busca conhecer e resgatar a visão tradicional botânica, principalmente no âmbito da flora, traz perspectivas metodológicas, bem como estratégias utilizadas por comunidades e suas relações com os recursos biológicos (DE OLIVEIRA e DA SILVA, 2007) A etnobotânica é citada na literatura como sendo um dos caminhos alternativos que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais (PRANCE, 1991). Baseado nesse pressuposto, a busca por novos fármacos é incessante e progressiva.

1.1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIANI et al., 2000). Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário de plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (SILVA et al.; GONÇALVES et al., 2003). Os elementos voláteis dos óleos essenciais podem ser encontrados em diferentes órgãos anatômicos e sua composição pode variar de acordo com sua localização em uma mesma espécie. Vários fatores são responsáveis por interferir na composição do óleo essencial em uma mesma espécie vegetal como a época da coleta, ano, hora do dia, condições climáticas e do solo, localização geográfica, ciclo vegetativo da espécie e modo de obtenção do óleo (DORMAN e DEANS, 2000).

Os óleos essenciais são extraídos de plantas através de técnicas de arraste a vapor, na grande maioria das vezes, como também pela prensagem do pericarpo de frutos (BIZZO, HOVELL e REZENDE, 2009). A maior parte dos óleos essenciais consiste numa mistura complexa de princípios ativos que variam na sua composição química. Cerca de 20 - 60 componentes em concentrações muito diferentes podem ser encontrados em óleos essenciais, bem como a presença de dois ou três destes constituintes em concentrações relativamente elevadas. Em geral tais componentes determinam as propriedades biológicas do óleo (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenóides são os constituintes preponderantes nos óleos essenciais, sendo os mais frequentes os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos. Grandes variações nas composições dos óleos essenciais têm sido observadas, dependendo da origem da planta, do estágio de desenvolvimento e da parte usada para a destilação do óleo (SIMOES, 2001).

Os óleos essenciais, muitas vezes são responsáveis pela fragrância das espécies vegetais. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules (TISSERAND e BALACS, 1995). Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como, por exemplo, o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; SILVA-SANTOS et al., 2006).

Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Ênfase tem sido dada às propriedades antimicrobiana, antitumoral e inseticida de compostos voláteis, além de sua ação sobre o sistema nervoso central (RODRIGUEZ, HEALEY e MEHTA, 1984).

As moléculas dos constituintes ativos dos óleos essenciais têm agido como modelo para que por meio de mudanças de grupamentos moleculares e análise de relação entre estrutura química e ação farmacológica, manipulem-se novos fármacos com maior eficácia e seletividade. Com a propagação da ciência e da tecnologia, as plantas medicinais estão tendo seu valor terapêutico estudado e comprovado, ao ponto que sua recomendação torna-se cada vez mais constante por profissionais de saúde (LOPEZ et al., 2005).

1.1.3 Família Lamiaceae – Gênero *Hyptis*

A família Lamiaceae está distribuída em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (PORTE e GODOY, 2001). Esta família inclui cerca de 250 gêneros, nos quais se distribuem 6970 espécies, incluindo ervas, arbusto ou árvores (JUDD et al., 1999) e além da importância do ponto de vista medicinal, esta família também é fonte de espécies com grande valor como condimentos, alimentos e na indústria de perfumes e cosméticos (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). No Brasil ocorrem 26 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005).

Essa família é constituída por espécies de caules geralmente quadrados em corte transversal. As folhas são geralmente opostas espiraladas, simples, algumas vezes lobuladas ou dessecadas, pinadas ou palmadas, bordas lisas a serradas; estípulas ausentes (JUDD et al., 1999). A constituição química dos indivíduos da família Lamiaceae é bastante diversificada, com a presença de compostos como flavanóides, lactonas, lignanas, derivados fenólicos e alguns ácidos graxos.

As espécies da família Lamiaceae, pela riqueza em óleos essenciais, têm sido amplamente investigadas sob o ponto de vista agrônomo e químico, não somente com intuito de maximizar seu conteúdo em óleo essencial, mas também devido à variação dos constituintes importantes desses óleos (MARTINS et al., 1998). Óleos essenciais obtidos de várias espécies do gênero *Hyptis* apresentam em sua composição compostos terpenóicos, responsáveis por algumas das suas atividades biológicas, como a citotóxica (FALCÃO e MENEZES, 2003).

O gênero *Hyptis* é considerado de grande importância econômica devido à presença de óleo essencial (FALCÃO e MENEZES, 2003), utilizados na medicina popular como terapia alternativa, com algumas propriedades farmacológicas desses óleos já descritas, como atividade antiulcerogênica (CALDAS et al., 2011) anti-séptico (PEREDA-MIRANDA et al., 1993), inseticida (ARAÚJO et al., 2003), antibacteriana (SOUZA et al., 2003), antifúngico (OLIVEIRA et al., 2004) e antinociceptivo (MENEZES et al., 2007).

Compostos químicos como (ISOBE et al., 2006), triterpenos (FALCÃO e MENEZES, 2003), diterpenos (OHSAKI et al., 2005) e sesquiterpenos (FACEY et al., 2005), com atividades antimicrobiana (CHUKWUJEKWU et al., 2005; ISOBE et al., 2006), inseticida (COSTA et al., 2005), analgésica (OKIEMY-ANDISSA et al., 2004; SILVA et al., 2006), e efeito antidepressivo (BUENO et al., 2006) foram isolados em espécies do gênero *Hyptis*.

1.1.4 *Hyptis martiusii* BENTH.

Dentre as muitas espécies do gênero *Hyptis*, *Hyptis martiusii* Benth é um pequeno arbusto, comumente encontrado no norte, sudeste e nordeste do Brasil (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002) popularmente conhecida por “cidreira brava” ou “cidreira do mato”. No nordeste cresce em abundância, encontrando-se amplamente disseminada no Sul do Ceará, na Chapada do Araripe (SILVEIRA e PESSOA, 2005) e no estado do Pernambuco aonde sua ocorrência vai desde a zona da mata à zona de caatinga (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002).

Na literatura, esta espécie está descrita como um arbusto ereto e ramoso, de 1,6-2,3 metros de altura, com flores brancas e delicadas (SILVEIRA e PESSOA, 2005). Pesquisas etnofarmacológicas indicam que as partes da planta utilizadas na medicina popular são as folhas e as raízes (AGRA et al., 2008). Na região Nordeste do Brasil, as folhas de *Hyptis martiusii* (Figura 1) são utilizadas para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal (AGRA et al., 2008). A atividade antiulcerogênica (CALDAS et al., 2011), antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e inseticida (COSTA-LOTUFO et al., 2004; COSTA et al., 2005; COUTINHO et al., 2008) foram identificadas em estudos realizados com a espécie *Hyptis martiusii*, evidenciando o potencial biológico dessa espécie em questão.

Figura 1 – Foto da *Hyptis martiusii* Benth



Foto da *Hyptis martiusii* destacando ramos e flores. FONTE: www.plantes-rizieres-guyane.cirad.fr. Acesso em: 02/11/2013.

A espécie em questão é uma importante fonte de óleo essencial cuja composição é constituída por mono e sesquiterpenos, e tem como componentes majoritários o 1,8-cineol (24,3%), δ -3-careno (22,5%), biciclogermacreno (6,3%) e o β -cariofileno (6,2%); enquanto nas inflorescências tem como componentes o δ -3-careno (13,5%), viridifloreno (8,3%), β -cariofileno (6,6%), α -pineno (5,8%) e germacreno B (5,21%) (ARAÚJO et al., 2003).

Ainda nos estudos de ARAÚJO et al. (2003), o potencial inseticida do óleo essencial de *Hyptis martiusii* e do composto isolado 1,8-cineol foi comprovado, e atividade inseticida contra *Aedes aegypti* confirmada por COSTA et al. (2005). CAVALCANTI et al. (2008) demonstrou em seus estudos realizados com raízes de *Hyptis martiusii* o efeito genotóxico dessa espécie, que induziu mutações cromossômicas em células de fibroblastos pulmonares de camundongos.

Em estudos realizados por COUTINHO et al. (2008), o extrato etanólico das folhas de *Hyptis martiusii* apresentou atividade antibacteriana *in vitro* comprovada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como também foi comprovado um sinergismo entre o extrato e aminoglicosídeos como clorpromazina e canamicina, com propriedades de modificar a atividade antibiótica, alternativa no combate a multirresistência (COUTINHO et al., 2009).

CALDAS et al. (2011) ao avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Hyptis martiusii* em modelos de lesão da mucosa gástrica em roedores comprovou uma importante atividade gastroprotetora do óleo ao aumentar os fatores de defesa da mucosa gástrica, incentivando o desenvolvimento de novas pesquisas sobre diferentes modelos de inflamação e seus respectivos mecanismos de ação.

1.1.5 Inflamação

A inflamação, denominada *phlogosis* pelos gregos e *inflammatio* em latim, é um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo animal à invasão por micro-organismos patogênicos, cujos sinais cardinais se constituem por calor, rubor, edema e dor, descritos na era clássica por Aulus Celsius. Um quinto sinal, perda da função foi acrescentado por Rudolf Virchow. No século XVIII, Jonh Hunter verificou a dilatação dos vasos sanguíneos e Julius Cohnhein associou inflamação à emigração de leucócitos através das paredes da microvasculatura. No final do século XIX, Eli Metchnikoff enfatizou o papel da fagocitose no processo inflamatório, enquanto a importância dos mediadores químicos foi descrito posteriormente por Thomas Lewis em 1927 (MURPHY, ANDERSEN e EBELIN, 2002).

No sentido geral, a inflamação é definida como uma resposta de defesa de um tecido vivo vascularizado a um estímulo nocivo (micro-organismos, toxinas, células necróticas, etc.), podendo também estar associado a doenças infecciosas, imunológicas, vasculares ou trauma (LARSEN e HENSON, 1983). Os tecidos inflamados podem responder a estímulos nocivos, tais como patógenos, células lesionadas e injúrias químicas, térmicas ou mecânicas, através da produção de diferentes mediadores bioativos, os quais interagem com diversos tipos celulares e moleculares para amplificar a reação flogística (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A resposta de um processo inflamatório envolve uma série de eventos, vasculares e celulares, e pode ser classificado como agudo ou crônico, dependendo da

persistência da lesão e sinais clínicos. Uma resposta inflamatória aguda (de curta duração), apresenta dois componentes, uma resposta inata (ou não-adaptativa), que corresponde a um conjunto de mecanismos de defesa imediata do próprio organismo capaz de reconhecer e destruir o agente agressor; e uma resposta imunológica adaptativa (adquirida ou específica), que é somente desencadeada após um patógeno ter sido reconhecido pelo sistema inato. A resposta adaptativa é constituída por um conjunto de respostas específicas contra o patógeno e também torna a imunidade inata mais eficiente, graças ao sistema de memória (mediados por linfócitos) (HENSON, 2005).

A resposta imediata ou aguda ocorre em curto prazo e geralmente resulta em cura, envolvendo fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos sinais flogísticos característicos da inflamação. Esse processo agudo envolve dois componentes principais, as alterações vasculares e os eventos celulares, levando ao aumento da permeabilidade vascular, com acúmulo de líquidos no espaço intersticial, promovendo o edema e, o aumento do fluxo sanguíneo causado pela vasodilatação que leva ao surgimento dos sinais de calor e rubor. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são estimulados principalmente por mediadores químicos como a histamina. Os eventos celulares envolvem o recrutamento de leucócitos, principalmente os neutrófilos, envolvendo a participação de selectinas, integrinas e citocinas como as quimiocinas. Esses neutrófilos migram até o local da lesão e os processos de fagocitose e destruição do agente nocivo se seguem. A inflamação aguda pode evoluir para resolução, pode se cronificar ou resultar em cicatrização (KUMAR, 2011).

Inúmeros são os mediadores envolvidos no processo inflamatório, podendo ser produzidos por células como os macrófagos teciduais, células endoteliais e leucócitos. Dentre esses mediadores, destacam-se as aminas vasoativas como a bradicinina, histamina, serotonina, responsáveis pela vasodilatação; os metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos (esses antagonizados pelas lipoxinas); as citocinas como o TNF, IL-1 e quimiocinas, envolvidas no recrutamento dos leucócitos; as espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Outros mediadores envolvidos em vários aspectos da reação inflamatória são derivados de proteínas plasmáticas, como o sistema complemento, que quando ativado tem como função a quimiotaxia dos leucócitos, fagocitose; proteínas da coagulação que a partir da ativação do fator XII ativa a coagulação e o sistema fibrinolítico; e as cininas, mediando a reação vascular e a dor (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; KUMAR, 2011).

A etapa final do processo inflamatório visa à reparação da estrutura tecidual lesada, com a regeneração de células parenquimatosas nativas, e/ou a formação de fibroblastos, que vão repor as substâncias intercelulares na região, além de nova vascularização (CORMACK, 1991).

A reação inflamatória é, portanto, um mecanismo que objetiva a proteção do organismo contra um agente invasor, peça chave no combate de infecções, cicatrização de feridas e reparo tecidual. Em contrapartida, o processo inflamatório pode ser em potencial, nocivo, ocasionando dor, reações de hipersensibilidade, entre outros, trazendo sofrimento ao paciente (ROBBINS et al., 2001). Nessa perspectiva, busca-se por novos fármacos que minimizem os efeitos nocivos da inflamação, trazendo melhores respostas no tratamento de pacientes. Dentre os fármacos mais utilizados na terapêutica dos processos inflamatórios, os mais frequentemente indicados são os anti-inflamatórios não-esteróides, conhecidos como AINES, e os corticosteroides.

1.1.6 Nociceção e Dor

1.1.6.1 Aspectos Gerais

A dor é uma realidade intrínseca à natureza das espécies de animais superiores e uma experiência universal para qual não existe uma definição satisfatória. O interesse sobre a natureza e significado da dor é muito antigo e muitas pesquisas estão voltadas no sentido de esclarecer dúvidas sobre as questões que envolvem a realidade da dor (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999). A dor é uma sensação cujo papel fisiológico é de grande importância para o nosso organismo, funcionando como um sintoma clínico de alerta para a detecção de ameaças à integridade física do organismo (CHAPMAN e GAVRIN, 1999), protegendo e preservando o funcionamento normal dos sistemas corporais.

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor – IASP, como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial (MELZACK et al., 1994; ALMEIDA, ROIZENBLATT e TUFIK, 2004; BARROT, 2012) e envolve as mais diferentes sensações dolorosas, e estas vão se diferenciar quanto à intensidade, à duração (tempo) e quanto à sua distribuição espacial.

A dor pode ser classificada, temporalmente, em dor aguda, transitória (ativação de nociceptores tanto da pele, quanto de outros tecidos, ocorrendo na ausência de dano tecidual; provável função de proteção ao indivíduo contra esses danos) (CARR e

GOUDAS, 1999) e dor crônica (dor que ultrapassa em duração a lesão tecidual precipitante). A dor aguda é desencadeada após uma lesão substancial de algum tecido, com ativação dos nociceptores mesmo após a retirada do estímulo nocivo original (LOESER e MELZACK, 1999). Na dor aguda, os nociceptores são facilmente estimulados devido a uma alteração no padrão de resposta desses receptores; geralmente esse tipo de dor é de curta duração.

Quando a dor persiste mesmo após a recuperação dos tecidos, passa a ser considerada como crônica e ocorre devido a uma lesão ou patologia podendo ser perpetuada por outros fatores daqueles que originaram a dor propriamente dita, podendo permanecer por meses ou até anos (LOESER e MELZACK, 1999). A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação a sua persistência, alterações adaptativas e dificuldade de tratamento (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999).

A dor também pode ser classificada quanto à sua origem ou fisiopatologia como nociceptiva (quando ocorre ativação excessiva dos nociceptores, cujas terminações se localizam na pele, vísceras e outros órgãos); neurogênica (resultante do processamento somatossensorial anormal, a nível periférico ou central) e em psicogênica (dor de origem psicológica e que não possui fator somático identificável) (MILLAN, 1999). Outras manifestações que podem ocorrer em indivíduos que experimentam episódios de dor é a hiperalgesia, a alodínea e a hiperestesia. A hiperalgesia se caracteriza como uma reação exacerbada a um estímulo doloroso; a alodínea como dor em resposta a um estímulo não doloroso; e a hiperestesia corresponde a uma sensibilidade anormal a um estímulo sensorial (DRAY, 1995).

A dor de origem inflamatória resulta da sensibilização dos neurônios sensoriais primários (FERREIRA, 1972). O processo inflamatório e a dor exercem uma função fisiológica de grande importância para o organismo, funcionando como um sinalizador da necessidade de reparo a um dano tecidual ou como um alerta de um perigo iminente, presente no meio que nos cerca. Alterações associadas ao processo inflamatório geralmente resultam em sensibilização periférica, com modificações nos padrões dos mediadores químicos que atuam na fibra nervosa (WOOLF e SALTER, 2000). Além da sensibilização periférica, existem fortes indícios que a dor inflamatória pode ser dependente de um processo que ocorre na medula espinal, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal, aumentando a capacidade de resposta a dor (SOUZA et al., 2013).

1.1.6.2 Vias neuronais envolvidas na percepção da dor

O processo de sensação dolorosa se inicia quando um estímulo mecânico, térmico ou químico, geralmente nocivo ou potencialmente nocivo é detectado por sensores primários periféricos, os nociceptores. Os nociceptores são fibras nervosas periféricas, extremamente heterogêneas, diferindo quanto aos tipos de neurotransmissores que contêm, os receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (STUCKY, GOLD e ZHANG, 2001).

Os nociceptores podem ser divididos em duas classes principais: a primeira constituída pelas fibras C não-mielinizadas, com baixa capacidade de condução; e a segunda classe, as fibras A δ mielinizadas, de diâmetro médio e que conduzem o impulso nervoso com maior facilidade. Essas fibras aferentes mielinizadas diferem consideravelmente das fibras A β de grande diâmetro, de condução rápida que responde à estimulação mecânica inócua (BASBAUM et al., 2009).

A fibra nervosa aferente primária detecta estímulos ambientais (de natureza térmica, mecânica ou química) e transduz essa informação na linguagem do sistema nervoso, ou seja, corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Os potenciais de ação gerados são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (CHENG e JI, 2008). Nos seres humanos o corno dorsal da medula espinhal é organizado em lâminas com anatomia diferente e eletrofisiologicamente distintas. Por exemplo, nociceptores A δ projetam-se para as lâminas I e V, enquanto que as fibras C projetam-se para lâminas mais superficiais I e II (BASBAUM et al., 2009). A sinapse entre os neurônios primários e os de segunda ordem acontecem predominantemente na lâmina II da medula espinhal.

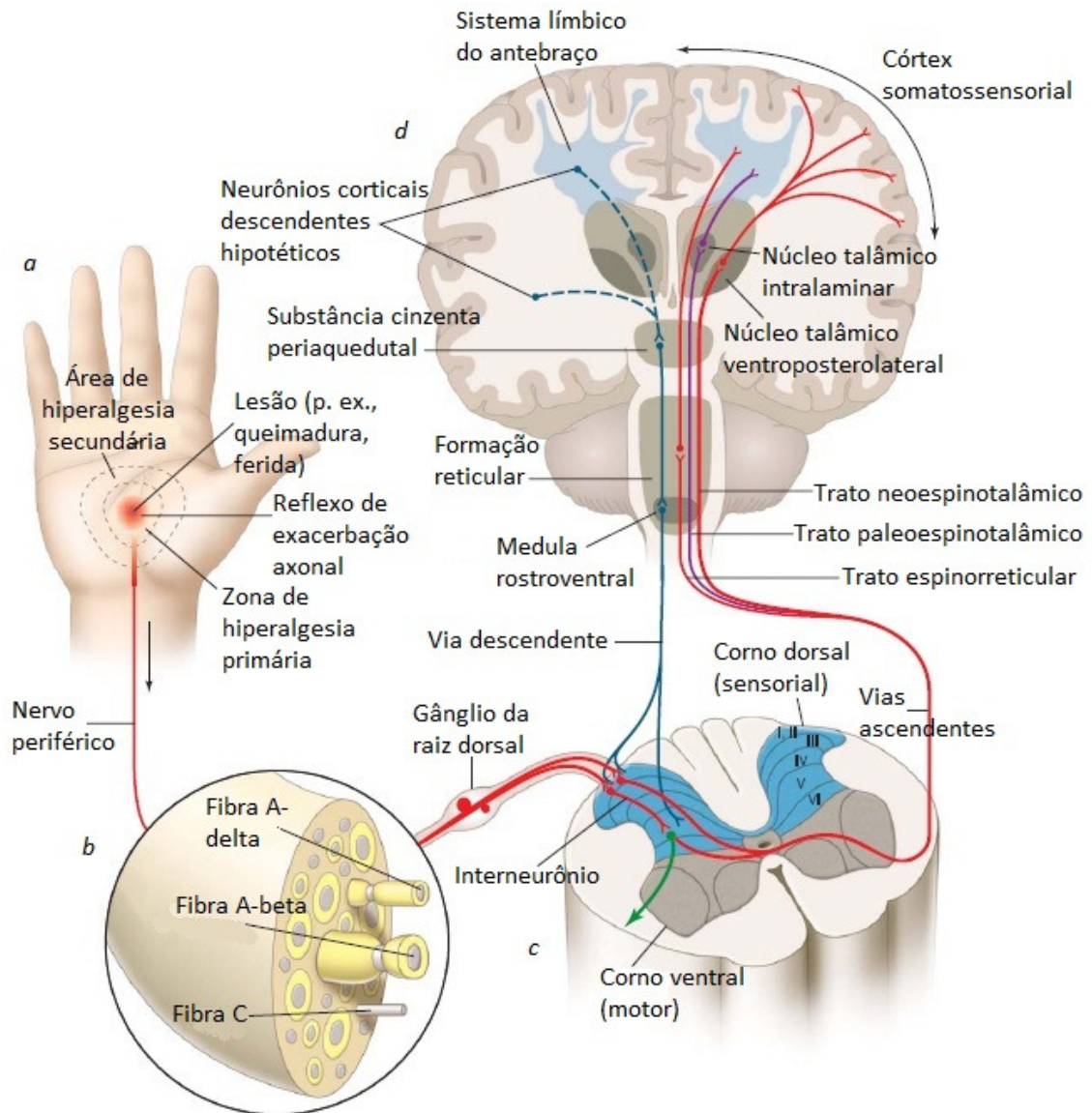
As fibras nociceptivas aferentes chegam ao corno dorsal da medula espinhal e transmitem o sinal originado na periferia através da liberação de neurotransmissores específicos que estão associados com a dor. Um dos neurotransmissores mais importantes é o glutamato, que pode interagir com receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), a substância P que interage com receptores da família das taquicininas, acoplados a proteína G (VANDERAH, 2007), e o receptor TRPV do tipo vanilóide, que favorece a transmissão sináptica glutamatérgica na substância cinzenta.

Com isso, os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal e ascendem para o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais para o tálamo. Os axônios dos neurônios de segunda ordem constituem os feixes aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos a estruturas do tronco cerebral e diencefalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal (SCP), hipotálamo, entre outros (ALMEIDA, ROIZENBLATT e TUFIK, 2004).

No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo acontece ou emitem axônios ao giro cingulado onde se encontra o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998). Essa transmissão da dor supracitada representa a via clássica da dor, existindo outras vias possíveis.

As principais vias ascendentes nociceptivas (Figura 2) são as vias espinotalâmicas ventrais (dividida em tratos neoespinotalâmico e espinocervicotalâmico e o sistema pós-sináptico da coluna dorsal) e dorsais (composta dos tratos paleoespinotalâmico, paleotrigeminotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e o sistema ascendente multissináptico proprioespinal). As vias e núcleos pertencentes às vias espinotalâmicas ventrais estão envolvidas com o aspecto sensitivo-discriminativo da dor, enquanto a via espinotalâmica dorsal estaria relacionada a aspecto afetivo-motivacional da dor (MELZACK et al., 1994; MILLAN, 2002)..

Figura 2 - Via ascendente e descendentes da dor



Processamento sensorial no corno dorsal da medula espinal. (a) A estimulação das fibras C pela lesão intradérmica produz dor espontânea e hiperalgesia primária. Uma área de hiperalgesia secundária fora da área da lesão primária é produzida pela ativação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) junto ao sistema nervoso central (SNC). (b) Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinal. (c) O corno dorsal da medula espinal constitui o primeiro centro de retransmissão sensorial junto ao SNC. Os sinais nociceptores que chegam são submetidos a uma considerável modulação antes da deflagração dos sinais ascendentes. (d) Quando há ativação de áreas localizadas no tálamo e no córtex cerebral, as projeções secundárias ao nível do trato espinotalâmico, trato da coluna dorsal e outras vias nociceptoras levam à percepção consciente da dor. FONTE: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicines/5249/dor_cronica_%E2%80%93anne_louise_oaklander.htm Acesso em 20/01/2014.

As vias descendentes da dor, originadas nas estruturas cerebrais como tronco cerebral, hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe e substância cinzenta periaquedutal, tem um importante papel modulador e de integração das mensagens

nociceptivas no corno dorsal da medula (VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes da dor modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios do corno dorsal, interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 2002). A modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, e sistemas de neurotransmissores dentre os quais podem ser mencionados os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, glutamatérgico, além dos canabinóides endógenos, entre outras substâncias (MILLAN, 2002).

Observando os mecanismos envolvidos na transmissão do estímulo doloroso, pode-se afirmar que a dor não é uma sensação uniforme, a qualidade da dor e o deflagrar das respostas de proteção são determinados por muitos fatores dentro da medula espinhal e estruturas cerebrais, envolvidas na integração e modificação da resposta nociceptiva (DICKENSON, 1997).

Muitos mecanismos de sensibilização central já foram estabelecidos e o conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu um importante entendimento acerca dos mecanismos de ação de diversos neurotransmissores e drogas envolvidas no processo doloroso, com o envolvimento também de mediadores, canais iônicos, segundos e terceiros mensageiros, cujo conhecimento de suas naturezas pode conduzir à descoberta de novos fármacos com propriedades analgésicas distintas das que existem atualmente (GRUBB, 1998; MOGIL e GRISEL, 1998; MILLAN, 2002).

A dor interfere na capacidade produtiva do ser humano e pode afetar a qualidade de vida do ser humano de maneira transitória ou permanente. Dentre as estratégias farmacológicas para o tratamento da dor, visando minimizar as sensações desagradáveis por ela provocadas, as principais classes de fármacos utilizados são os analgésicos opióides, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), os corticosteroides e ainda, os anticonvulsivantes e antidepressivos. O manejo farmacológico da dor traz por muitas vezes, efeitos colaterais indesejáveis, problemática essa que desperta o interesse na descoberta de novas drogas que possam vir a oferecer menos efeitos colaterais, incentivando o incremento em novas pesquisas.

1.2 Justificativa

Considerando os aspectos já abordados acerca da família Lamiaceae, bem como os estudos já publicados na literatura acerca da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de outras espécies do gênero *Hyptis*, associado a dados etnofarmacológicos, etnobotânicos, e à alta prevalência de doenças inflamatórias e distúrbios da dor, além do crescente interesse da indústria farmacêutica na descoberta de novas drogas, torna válido a investigação do potencial anti-inflamatório, bem como antinociceptivo da espécie *Hyptis martiusii* BENTH. Vale ressaltar que é fundamental a investigação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades biológicas avaliadas.

A utilização de óleos, extratos e/ou substâncias isoladas de plantas medicinais, cujo estudo e comprovação podem levar a descoberta de novos fármacos, com menores custos e melhor eficácia terapêutica, podem ser determinantes na melhoria da qualidade de vida de pacientes com doenças inflamatórias crônicas e distúrbios da dor.

O desenvolvimento de novos protótipos farmacológicos a partir de produtos naturais pode resultar em um impacto econômico significativo no meio social, além de possibilitar conhecimentos inéditos em relação ao potencial farmacológico da espécie *Hyptis martiusii*, contribuindo com informações que possam ser utilizadas na validação científica sobre o uso com eficácia e segurança da cidreira brava na fitoterapia popular, salientando a importância da sua conservação.

2.OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar o potencial anti-inflamatório e analgésico do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth (OEHM).

2.2 Específicos

- Verificar a composição química do OEHM por cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CG-MS);
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do OEHM por via tópica (ação local) através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (agudo e crônico);
- Estudar o efeito do OEHM sobre a atividade anti-inflamatória sistêmica através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, dextrana e histamina, bem como pelo modelo de peritonite e extravasamento vascular;
- Realizar a dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO);
- Avaliar a atividade antidepressiva/ansiolítica pelo ensaio do campo aberto;
- Elucidar a atuação do OEHM em modelos de nocicepção induzida por quente (Hot Plate), analgesímetro digital (Von Frey), ácido acético, formalina e dor visceral por óleo de mostarda;
- Investigar possíveis mecanismos de ação antinociceptiva para o OEHM como o envolvimento do sistema opióide, dos receptores TRPV1 e do sistema α 2-noradrenérgicos.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Exigências Legais: Aspectos Éticos da Pesquisa

A pesquisa seguiu rigorosamente em conformidade e foi conduzida em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: animais (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996; Lei Federal Nº 11.794/2008; Conselho Nacional de Controle de Experimentação – CONCEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) (MACHADO et al., 2004; SILVA, 2010). Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA, para avaliação dos protocolos experimentais, sendo aprovado sob o número 18/2012.2.

3.2 Material Botânico

A coleta do material vegetal (folhas) de *Hyptis martiusii* Benth. (cidreira brava), foi realizada na área de cerrado da Chapada do Araripe (Fazenda Barreiro Grande, Crato-Ce, 7° 21' 50'' S; 39° 28' 39''W; altitude: 930m) no mês de maio de 2012. Uma exsicata do espécime vegetal (Figura 3) foi depositada no Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima – HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob número de registro 8394. Sendo identificada e classificada pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoal da Silva.

Figura 3 - Exsicata de *Hyptis martiusii*



Demonstrando folhas e flores. FONTE: Guedes, ARB (Autora)

3.3 Extração do óleo essencial

As folhas (frescas) coletadas (3.950g) foram submetidas à destilação por arraste com vapor d'água em aparelho tipo Clevenger. De início o material foi pesado individualmente e em seguida inserido separadamente em balões de vidro, a estes, acrescentada água destilada e submetidos a aquecimento por 02 horas. Ao término desse período, o óleo essencial coletado foi tratado com sulfato de sódio anidro para eliminação da umidade residual e depositado em frasco âmbar, sendo mantido em refrigerador para posterior análise.

3.4 Análise química do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth

A análise do óleo foi realizada utilizando o aparelho Shimadzu GC MS - série QP2010 (GC / sistema MS), coluna capilar Rtx-5MS (30 mx 0,25 mm, 0,25 mm de espessura de filme), gás hélio como transportador a 1,5 ml / min, temperatura do injetor 250 ° C; temperatura do detector 290 ° C, temperatura da coluna 60 ° C - 180 ° C a 5 ° C / min, em seguida, 180 ° - 280 ° C a 10 ° C / min (10 min). A velocidade de digitalização foi de 0,5 scan / seg de m / z 40 e 350, relação Split (1:200). O volume injetado foi de 1 mL de [25 µL (óleo

essencial) / 5 μ L CHCl₃] (1: 200), cujo tempo de corte do solvente = 2,5 min. O espectrômetro de massas foi operado com 70 eV de energia de ionização e a identificação dos componentes individuais foi baseada na sua fragmentação de espectro de massa baseado na biblioteca espectral NIST Mass 08, índices de retenção, e comparação com os dados publicados.

3.5 Animais

Para a efetivação dos testes *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), albinos, cepa *Swiss* de ambos os sexos, com massa corpórea delimitada entre 20-30g, escolhidos randomicamente. Estes foram mantidos acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre $22 \pm 3^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h e com livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

3.6 Atividade Anti-inflamatória Tópica

3.6.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

Grupos de camundongos *Swiss* (n=6) tiveram as orelhas direitas pré-tratadas topicamente com salina 0,9%, dexametasona 4mg/ml ou doses 50, 75 e 100 mg/kg do OEHM (aplicações de 20 μ L: 10 μ l face externa e 10 μ l face interna das orelhas), esperando 15 minutos para absorção. Após 1h aplicou-se 20 μ l do agente flogístico óleo de cróton 5% (v/v) em acetona nas orelhas direitas e 20 μ l do veículo acetona nas orelhas esquerdas. Decorridas 6h, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical para posterior retirada das orelhas, cortadas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (TUBARO et al., 1986).

3.6.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Para realização desse estudo crônico, camundongos *Swiss* (n=6) foram submetidos à aplicação tópica de óleo de cróton 5% (v/v) diluído em acetona nas orelhas direitas e 20 μ L do veículo acetona nas orelhas esquerdas em dias alternados durante nove dias. No quinto dia de experimentação, os animais receberam tratamento (via tópica - 20 μ l) com salina 0,9%, dexametasona 4mg/ml e OEHM na concentração de 100mg/kg completando o ciclo de nove dias de experimentação. Esse tratamento foi realizado duas vezes em períodos distintos (manhã e tarde). Ambas as orelhas tiveram mensurações diárias com uso de

paquímetro digital durante todo o período do teste. Após os nove dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas orelhas retiradas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (STANLEY et al., 1991).

3.6.3 Quantificação do edema e do efeito inibitório médio

Os discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas direitas (tratamento com o agente flogístico) e das esquerdas (tradadas com o veículo), foram os objetos de quantificação do percentual de inflamação em cada animal analisado. Estes tiveram individualmente sua massa medida por meio da balança analítica. O edema de orelha, evidenciado em percentual de acréscimo na massa da orelha, foi calculado pela a fórmula:

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de edema

$$\text{Percentual de edema (\%)} = \frac{\text{MOD} - \text{MOE}}{\text{MOE}} \times 100$$

Sendo:

MOD = massa (em gramas) do disco da orelha direita

MOE = massa (em gramas) do disco da orelha esquerda.

O efeito inibitório médio da inflamação (**EIM**, em %) de cada tratamento, foi calculado pela fórmula:

Equação 2 - Cálculo para efeito inibitório médio

$$\text{EIM(\%)} = \frac{\text{MPEcont} - \text{MPEtrat}}{\text{MPEcont}} \times 100$$

Sendo:

MPEcont (em %) = média do percentual de edema do grupo controle submetido ao tratamento com solução salina.

MPEtrat (em %) = média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento o OEHM ou droga padrão.

3.7 Atividade Anti-inflamatória Sistêmica

3.7.1 Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina ou dextrana

Grupos de 6 animais, de ambos os sexos, tiveram o volume inicial (V_i) da pata posterior direita avaliado por pletismometria. Logo em seguida, os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo salina, 10 mg/kg (grupo controle negativo); indometacina 10 mg/kg (controle positivo no edema induzido por carragenina); prometazina 6mg/kg (controle positivo do edema induzido por dextrana) ou OEHM nas concentrações de 50, 75 e 100mg/kg no edema induzido por carragenina e concentração de 100mg/kg no edema induzido por dextrana. Após 1h, os animais receberam carragenina 1% (p/v) ou dextrana 1% (20 μ l/pata) na pata posterior direita e veículo na pata esquerda. O volume da pata traseira direita de cada animal foi registrado após 1, 2, 3, 4 e 5h da injeção do agente flogístico (carragenina/dextrana). A expressão dos resultados foi obtida pela diferença entre o volume final e o volume inicial da pata de cada tempo, calculados na fórmula: $V_e = V_f - V_i$, sendo: V_e = volume do edema (em mL), V_f = volume final e V_i = volume inicial (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962).

3.7.2 Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de histamina

Grupos de 6 animais, de ambos os sexos, tiveram o volume inicial (V_i) da pata posterior direita avaliado por pletismometria. Logo em seguida, os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo salina 10 mg/kg (grupo controle negativo) e OEHM na concentração de 100mg/kg. Após 1h, os animais receberam histamina (20 μ l/pata) na pata posterior direita e veículo na pata esquerda. O volume da pata traseira direita de cada animal foi registrado após 1, 2, 3 e 4h da injeção do agente flogístico. A expressão dos resultados foi obtida pela diferença entre o volume final e o volume inicial da pata de cada tempo, calculados na fórmula: $V_e = V_f - V_i$, sendo: V_e = volume do edema (em ml), V_f = volume final e V_i = volume inicial (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962).

3.7.3 Peritonite

Grupos de 6 animais foram tratados com solução salina 10 mg/kg, dexametasona 5 mg/kg e OEHM 100mg/kg, todos por via oral. Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de carragenina. Após 4 horas, a

migração de leucócitos para a cavidade peritoneal foi avaliada. Para isso, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo injetada na cavidade peritoneal 3ml de PBS heparinizado (LAPA, 2003). Após leve massagem no abdome, uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Türk para contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer.

3.7.4 Permeabilidade vascular por extravasamento de Azul de Evans

Os animais foram divididos em grupo de 6 animais, sendo tratados com salina 10mg/kg e OEHM 100mg/kg ambos via oral, sendo que um grupo não recebeu nenhum tratamento, o grupo naive. Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de carragenina, com exceção do grupo que não recebeu nenhum tratamento. Em seguida, foi administrado 1ml de Azul de Evans pela veia caudal e após 4h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e administrado 3 ml de solução tampão de PBS e o fluido peritoneal coletado. Em seguida executou-se centrifugação das amostras por 2 minutos a 3500 rpm, para posterior leitura do sobrenadante por espectroscopia com filtro de 520nm.

3.7.5 Dosagem da Mieloperoxidase

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras colhidas previamente foram descongeladas e centrifugadas a 4.500 rpm, durante 12 minutos a uma temperatura de 4° C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por BRADLEY, CHRISTENSEN e ROTHSTEIN (1982) utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22° C. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro à 600nm. Os resultados foram expressos como UMPO/µl de lavado.

3.8 Avaliação da atividade locomotora pelo campo aberto ou “open field”

Essa investigação foi utilizada para investigar uma possível ação estimulante ou depressora do OEHM sobre o sistema nervoso central dos animais. A

avaliação foi realizada por meio da metodologia de SIEGEL (1946) e validada por ARCHER (1973). Foram utilizados 6 animais por grupo, tratados previamente com solução salina 100mg/kg, OEHM 100mg/kg, ambos por via oral e diazepam 5mg/kg (i.p.). Os animais foram colocados 30 minutos após os tratamentos, em um campo aberto confeccionado em acrílico, dividido em 9 campos previamente demarcados e foram observados por 5 minutos, sendo avaliado o número total de cruzamentos efetuados pelos animais nos campos demarcados.

3.9 Atividade antinociceptiva

3.9.1 Teste da formalina

Camundongos (n= 6) foram submetidos a uma injeção de 20 µl de formalina 2,5% na pata direita (espaço sub-plantar) sendo logo após a aplicação da formalina, colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho, com a finalidade de facilitar a observação. O tempo transcorrido (em segundos) que o animal lambeu a pata durante as fases inicial (0-5 min) e tardia (15-30 min.) foi registrado (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). Uma hora antes da aplicação da formalina, OEHM nas concentrações de 50, 75 e 100 mg/kg, solução salina 10mg/kg e indometacina 10mg/kg foram administrados por via oral.

3.9.2 Teste da placa quente ou “Hot-plate”

Para a efetivação deste ensaio, os animais foram colocados individualmente em uma placa quente de temperatura constante (52-54°C). Após a obtenção de dois valores basais (com intervalos de 30 minutos) os camundongos foram tratados, por via oral, solução salina 10mg/kg, OEHM na concentração de 100, 75 e 50mg/kg ou morfina 6 mg/kg (i.p). A resposta foi seguidamente avaliada após 30, 60 e 90 min da administração das drogas. O tempo máximo de contato do animal com a placa quente foi mantido em 15 s (tempo de corte) para evitar lesões nas patas (LAPA, 2003).

3.9.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os grupos de camundongos foram pré-tratados por via oral com solução salina 10mg/kg, indometacina 10mg/kg e OEHM 100mg/kg, todos via oral. Após 1h, estes receberam injeção intraperitoneal de ácido acético (6%) (LAPA, 2003) diluído em salina. Após a administração do ácido acético, os animais foram colocados sob funis de vidro

individuais transparentes e durante 30 minutos, o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente. A atividade antinociceptiva pode ser verificada através da comparação do número de contorções abdominais quantificadas entre os grupos controle e o tratado com o óleo essencial.

3.9.4 Teste de hipernocicepção mecânica plantar

Os animais foram tratados durante 7 dias com solução salina 10mg/kg e OEHM 100mg/kg, ambos via oral, e com indometacina 10mg/kg, 45 minutos antes da administração intraplantar de carragenina 2% (p/v) que aconteceu no sétimo dia do experimento. A intensidade de hipernocicepção foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento. A estimulação mecânica foi exercida na região plantar das patas traseiras. O aparelho (Eletronic Von-Frey Anesthesiometer) registra a pressão em gramas suficiente para provocar uma reação descrita como uma flexão da pata seguida por um “*flinch*” após a retirada da pata em contato com o aparelho (CUNHA et al., 2004).

Os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparentes (9 x 7 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. A hipernocicepção mecânica plantar (grau de sensibilidade ao estímulo mecânico) foi avaliada antes (tempo zero) e a cada hora até a 5^o hora da injeção de carragenina.

3.9.5 Nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda

Foram utilizados grupos de 6 animais tratados com solução salina 10mg/kg e OEHM 100mg/kg, ambos por via oral, 1 h antes de receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 µl/animal) por via intracolônica através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Para este procedimento foi introduzido 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção do óleo de mostarda sendo utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais) foi contado por 20 minutos imediatamente após a instilação de óleo de mostarda.

3.9.6 Mecanismos de ação para nocicepção

Para determinação dos mecanismos de ação nociceptiva foram utilizados camundongos em grupos de 6 animais tratados com solução salina 10mg/kg, OEHM 100mg/kg (ambos via oral) 1,5 h antes, ou morfina (5 mg/kg, s.c.) para mecanismo tipo opióides, ou clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) para mecanismos envolvendo o sistema adrenérgico ou capsazepina (3 mg/kg, s.c.) para mecanismos envolvendo o receptor da capsaicina (TRPV1), todos administrados 1 h antes de receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 µl/animal) por via intracolônica através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Para este procedimento foi introduzido 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção do óleo de mostarda sendo utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração.

O papel do sistema opióide foi avaliado pela administração de naloxona (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes da morfina (5 mg/kg, s.c.) ou concomitantemente OEHM 100mg/kg. Após 30 min da administração da morfina e 1,5 h após a administração do óleo essencial, os animais receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 µl/animal) por via intracolônica.

O papel do sistema adrenérgico foi avaliado pela administração de ioimbina (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes da clonidina (0,1 mg/kg, s.c.) ou concomitantemente com o OEHM 100mg/kg. Após 30 min da administração da clonidina e 1,5 h após a administração do óleo essencial, os animais receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 µl/animal) por via intracolônica.

O envolvimento do receptor TRPV1 foi avaliado pela administração de capsazepina (3 mg/kg, s.c.) concomitantemente com o OEHM 100mg/kg. Após 1,5 h da administração do óleo essencial, os animais receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 µl/animal) por via intracolônica.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais) foi contado por 20 minutos imediatamente após a instilação de óleo de mostarda.

3.10 Análise Estatística

Os resultados das análises efetuadas foram analisados tomando como base à média e seu correspondente erro padrão da media (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi

ANOVA com teste *post hoc* Newman Keuls para ANOVA de uma via e Bonferroni para ANOVA de duas vias, utilizando o software Prism for Windows (*GraphPad* Software). Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise química

O rendimento do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* foi de 0,34%. A análise por CG-MS identificou 18 constituintes, representando 87,63% do OEHM, identificando a existência de mono e sesquiterpenos. Os componentes principais do óleo foram identificados como 1,8 – cineol (34,58), δ careno (21,58%), cânfora (5,17%), limoneno (4,94%), germacreno B (3,39%). A tabela 1 mostra os constituintes identificados, composição percentual e seu índice de retenção (RI).

A caracterização fitoquímica do óleo essencial das folhas frescas de *Hyptis martiusii* demonstrou a presença de mono e sesquiterpenos. Outras espécies da família Lamiaceae, quando passadas pelo mesmo método de obtenção do óleo apresentam em sua composição química, componentes semelhantes aos identificados na espécie do estudo em questão. MENICHINI et al. (2009) em estudos da composição fitoquímica dos óleos de quatro espécies de *Teucrium* (Lamiaceae) identificou uma grande riqueza de sesquiterpenos em todas as amostras, como α -cadineno, óxido de cariofileno, α -pineno, linalol, compostos esses também encontrados no óleo de *Hyptis martiusii*. Outra espécie da família Lamiaceae, *Satureja hortensis*, tem seu óleo essencial rico em compostos como α -pineno e β -pineno (HAJHASHEMI, ZOLFAGHARI e YOUSEFI, 2011), assim como OEHM.

REBELO et al. (2009) em estudo com a espécie do gênero *Hyptis*, *Hyptis crenata*, identificou no óleo essencial obtido das folhas da espécie como componentes marjoritários, o α -pineno, 1,8 – cineol, β -pineno, cânfora, limoneno e γ -terpineno, sendo o 1,8-cineol o segundo composto mais encontrado no óleo da espécie (17,6%).

Estudos demonstram que a composição química do OEHM apresenta como constituintes marjoritários o 1,8 – cineol e δ careno quando utilizado o mesmo método de obtenção do óleo (COSTA et al., 2005). Em estudos anteriores, CALDAS et al. (2011) relatou que a composição química do óleo obtido das folhas da mesma espécie, apresentou dentre os compostos marjoritários o 1,8 – cineol e δ careno, constituintes esses, também presentes de forma significativa no óleo essencial do estudo em questão, podendo ser os responsáveis pelas atividades biológicas desse produto natural, isolados ou de forma sinérgica com outros constituintes.

Tabela 1 - Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiussi* Benth.

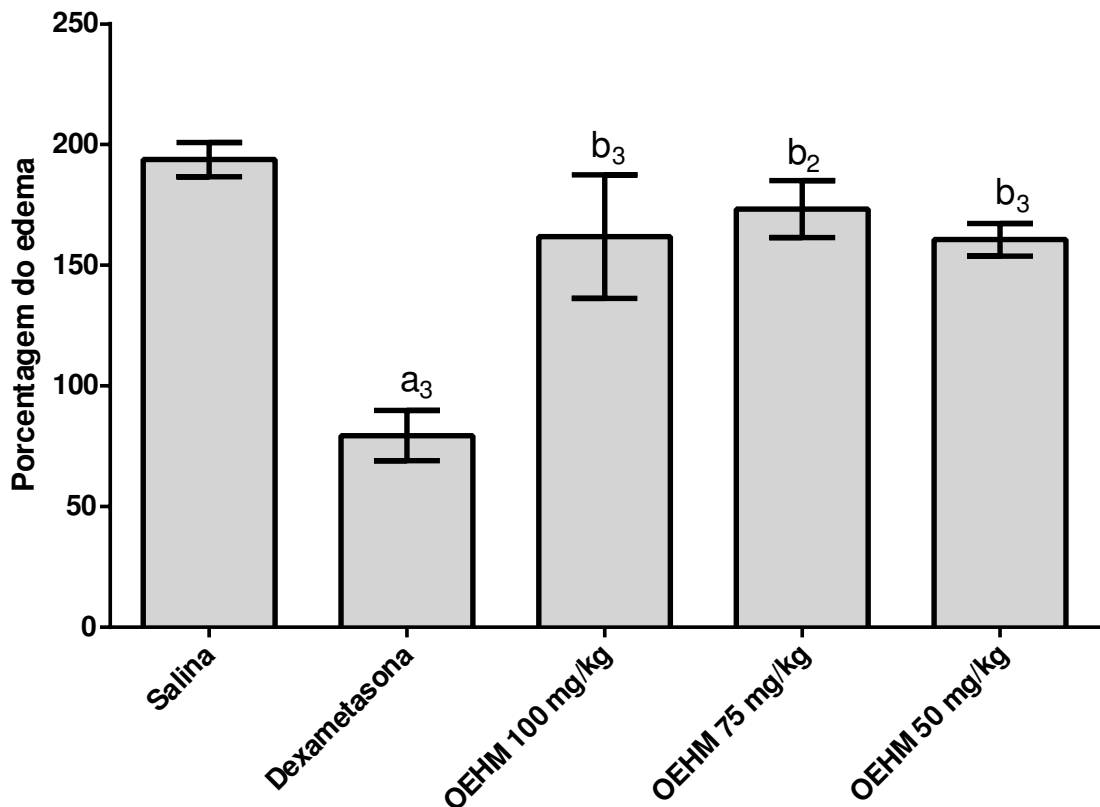
Componentes	Tr(min) ^a	IK ^b	(%)
α -pineno	3.58	935	2.98
canfeno	3.79	961	0.44
β -pineno	4.17	982	1.73
β -mirceno	4.24	993	1.33
α -felandreno	4.54	1007	0.74
δ -careno	4.65	1021	21.58
<i>o</i> -cimeno	4.86	1028	2.22
limoneno	4.94	1033	4.94
1,8-cineol	5.05	1038	34.58
γ -terpineno	5.47	1058	0.73
linalol	6.23	1099	0.57
cânfora	7.40	1088	5.17
1-terpinen-4-ol	8.09	1142	0.63
α -terpineol	8.40	1190	0.36
(E)-cariofileno	14.16	1422	2.97
germacreno B	16.08	1534	3.39
δ -cadineno	16.68	1542	0.71
óxido de cariofileno	18.29	1585	2.56
Total			87.63

4.2 Atividade anti-inflamatória tópica

4.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

O uso tópico do OEHM nas concentrações de 50, 75 e 100mg/kg não inibiram significativamente ($160,5 \pm 6,8\%$, $173,3 \pm 11,8\%$, $161,8 \pm 25,6\%$ respectivamente) o edema induzido pelo óleo de cróton quando comparado com o grupo salina (Figura 4). A dexametasona reduziu significativamente o edema causado pelo óleo de cróton ($79,41 \pm 10,4\%$) quando comparado com a salina.

Figura 4 - Efeito do tratamento tópico de OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre influência da aplicação única de óleo de cróton após 6h.



Os resultados foram expressos com os valores médios da porcentagem de edema. a₃ = p < 0,001 vs salina; b₂ = p < 0,01 vs dexametasona; b₃ = p < 0,001 vs dexametasona; ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

A aplicação tópica com óleo de cróton é um método que permite avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais com possível atividade tópica ou sistêmica. O principal agente irritante que compõe o óleo de cróton é o acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), cuja ação é exercida por produtos da cicloxigenase, histamina, serotonina, entre outros mediadores (SARAIVA et al., 2011). A resposta inflamatória

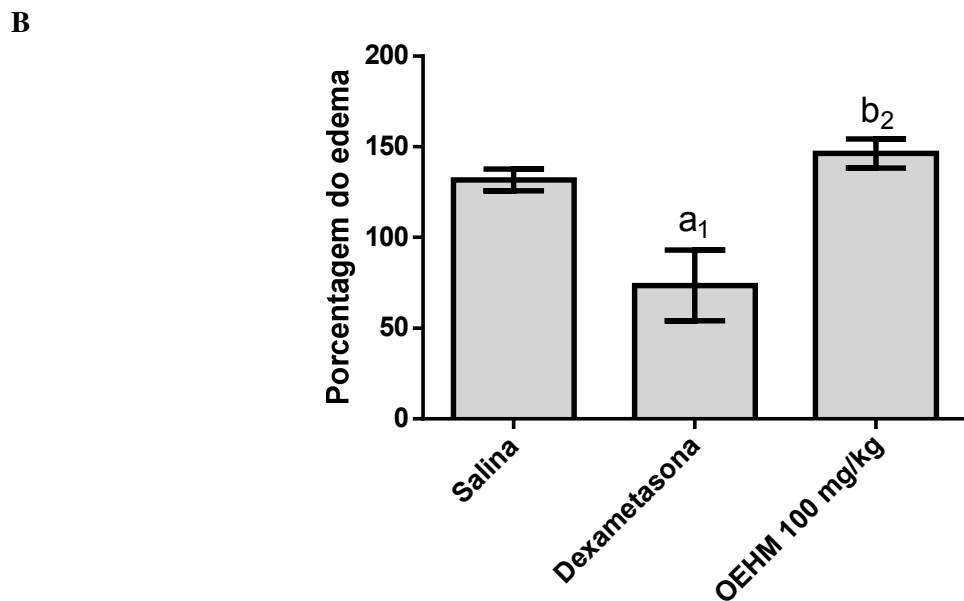
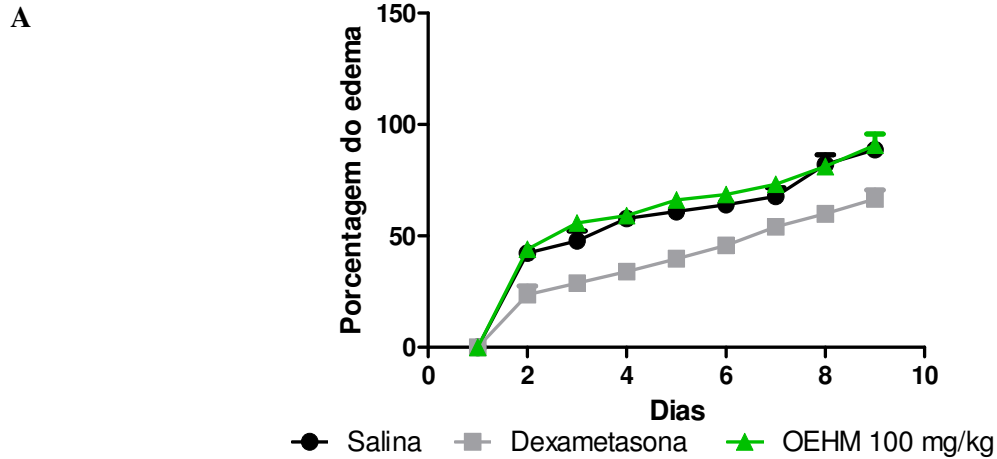
induzida pelo TPA consiste na ativação direta da proteína quinase C (PKC), que em sequencia ativa a fosfolipase A2, induz a expressão da COX-2 e ativação da LOX, que por sua vez ativa a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios (MURAKAWA et al., 2006).

A aplicação tópica de óleo de cróton induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizado por edema, infiltração de neutrófilos, produção de prostaglandinas, leucotrienos e aumento da permeabilidade vascular. O edema se deve inicialmente a histamina e serotonina, seguido pela síntese de prostaglandinas e leucotrienos, atividade inflamatória essa dependente do ácido araquidônico. Logo, inibidores da fosfolipase A2, das vias da cicloxigenases e lipoxigenases, a exemplo da dexametasona, são efetivos na supressão do edema de orelha (ZHANG et al., 2007). O OEHM não apresentou atividade anti-inflamatória tópica nas concentrações utilizadas, indicando que esse óleo pode não inibir a ativação da fosfolipase A2, vias das COX, LOX ou liberação de mediadores inflamatórios.

4.2.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

No modelo de aplicação múltipla de óleo de cróton, a aplicação repetida de óleo de cróton em orelhas de camundongos promove uma resposta inflamatória crônica. A figura 5 (A e B) demonstra que após o estabelecimento do processo inflamatório crônico a partir da aplicação múltipla de óleo de cróton, o tratamento crônico com OEHM na concentração de 100mg/kg também não foi capaz de reverter o edema ($59,9 \pm 8,8\%$) como no modelo de aplicação única de óleo de cróton. Já o tratamento crônico com dexametasona, fármaco de referência, foi capaz de inibir o edema de forma significativa ($39,2 \pm 6,8\%$) quando comparado com o grupo salina.

Figura 5 - Efeito do tratamento tópico de OEHM 100mg/kg sobre influência da aplicação múltipla de óleo de cróton após 9 dias.



A) Gráfico referente à espessura das orelhas dos camundongos sobre aplicação múltipla em dias alternados de óleo de cróton. B) Percentual médio referente à massa final (peso em gramas) das orelhas de camundongos. a₁ = p < 0,05 vs salina; b₂ = p < 0,01 vs dexametasona. ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

Nesse modelo, o aumento da atividade enzimática da fosfolipase A2 pela ativação persistente da PCK pelo TPA leva ao aumento dos metabólitos do ácido araquidônico, como leucotrienos e prostaglandinas (GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008). O aumento desses metabólitos parece ser determinante para o início do processo inflamatório nos tecidos após aplicação do TPA e, portanto, uma característica desse ensaio é uma resposta inflamatória persistente, ocasionada pela liberação de mediadores inflamatórios

como eicosanoides e citocinas (MURAKAWA et al., 2006). A atividade anti-inflamatória de compostos ativos sobre a ação do TPA ocorre pela capacidade de inibir a cascata do ácido araquidônico, interferindo diretamente na ativação da PCK, como os anti-inflamatórios da classe dos corticoides, importantes inibidores da fosfolipase A2, COX e LOX. O OEHM não apresentou uma redução significativa do edema nos modelos agudo e crônico.

O uso de plantas medicinais e seus subprodutos na dermatologia podem colocar o paciente muitas vezes em risco, já que pode desencadear fitodermatoses decorrentes do mecanismo de irritação, (OLIVEIRA et al., 2006) e muitos casos de dermatites e reações alérgicas são causadas por tratamentos que envolvem o uso de óleos essenciais concentrados (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Um exemplo de espécie vegetal que se encaixa nesse contexto é o óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*, que em determinadas concentrações podem ocasionar dermatites por contato (FAZOLIN et al., 2007), assim como o óleo essencial de *Lippia sidoides* e seu constituinte isolado, o timol, que apresentaram efeito pró-inflamatório no modelo tópico crônico (VERAS et al., 2012).

Nesse sentido, a ausência de potencial anti-inflamatório do OEHM quando aplicado topicamente, poderia estar relacionada a essa característica peculiar dos óleos essenciais de se apresentarem como irritantes em determinadas concentrações, bem como pela baixa biodisponibilidade promovida por essa via de administração.

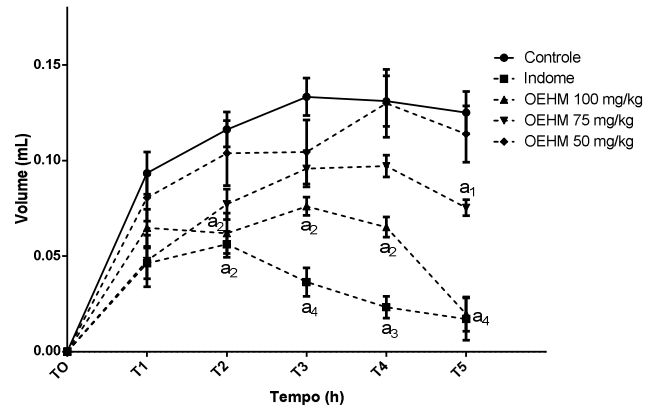
4.3 Atividade anti-inflamatória sistêmica

4.3.1 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina

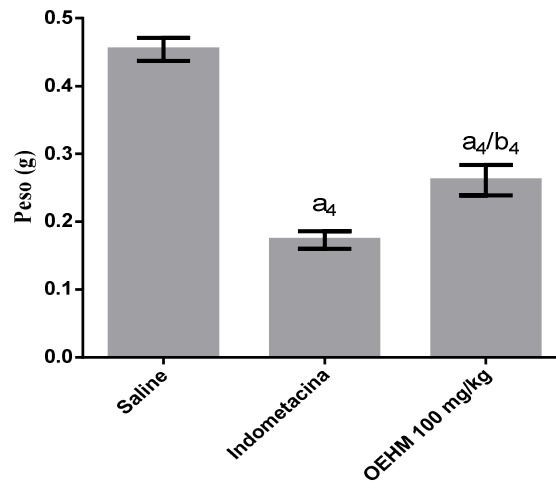
A administração de OEHM na dose de 50 e 75mg/kg v.o não foram capazes de reduzir o edema induzido pela carragenina 1% quando comparados com o grupo salina que apresentou pico edematogênico na 3ª hora do experimento ($0,134 \pm 0,009$ mL). Já o óleo na dose de 100mg/kg, foi capaz de reduzir o edema em de forma significativa a partir da segunda hora do experimento, apresentando maior significância 5ª hora ($0,065 \pm 0,02$ mL) em relação ao controle. A indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, foi eficaz em reduzir o edema ($0,037 \pm 0,016$ mL) provocado pela carragenina 1% a partir da segunda hora de avaliação do edema, sendo essa redução progressiva até a quinta hora (Figura 6) também em comparação com o grupo salina.

Figura 6 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina 1% em camundongos.

A



B



A) Resultado do valor médio do volume das patas no momento de aplicação e a cada hora até 5ª hora. a₁= p < 0,05 vs salina; a₂=p<0,01 vs salina; a₃=p<0,001 vs salina; a₄=p<0,0001 vs salina. ANOVA, Teste de Bonferroni. B) Percentual médio referente à massa final (peso em gramas) das patas de camundongos. a₄ = p < 0,0001 vs salina; b₄ = p<0,0001 vs indometacina. ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

A resposta inflamatória produzida pela carragenina é caracterizada por um perfil multifásico, envolvendo a liberação de vários mediadores responsáveis pela resposta inflamatória (FANTONE e WARD, 1982; POSADAS et al., 2004). O primeiro momento é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular promovida por mediadores como histamina, serotonina e bradicinina (VINEGAR et al., 1987). Esse aumento da permeabilidade vascular é mediado em um momento posterior pela atuação de cininas e o pico máximo do edema é caracterizado pela ação das prostaglandinas (DI ROSA, GIROUD e WILLOUGHBY, 1971).

No modelo de edema de pata, a indometacina, fármaco utilizado como pré-tratamento, aboliu de forma significativa o edema, validando o ensaio. O OEHM na dose de 100mg/kg foi efetivo na redução do edema no pico de ação da carragenina, um forte indicativo que o óleo possa inibir diferentes aspectos que estariam envolvidos no processo inflamatório, como a liberação de mediadores como a histamina, que irá interferir na produção de metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas, responsáveis pelo ponto máximo do edema provocado pela carragenina.

Estudos realizados com o óleo essencial da espécie *Rosmarinus officinalis* L., família Lamiaceae, avaliando a atividade anti-inflamatória por meio do modelo de edema de pata, encontrou uma redução significativa no edema produzido pela carragenina. Nesse mesmo estudo, a análise fitoquímica do óleo identificou, dentre os componentes químicos o 1,8-cineol (TAKAKI et al., 2008). Outra espécie pertencente à família Lamiaceae, *Satureja hortensis*, apresentou atividade anti-inflamatória significativa frente ao modelo em questão, cujo óleo essencial se apresentou rico em constituintes como γ -terpineno, α -pineno e β -pineno (HAJHASHEMI, ZOLFAGHARI e YOUSEFI, 2011). Os constituintes químicos citados nos estudos estão presentes no OEHM, podendo explicar em parte o potencial do óleo em reduzir o edema induzido pela carragenina.

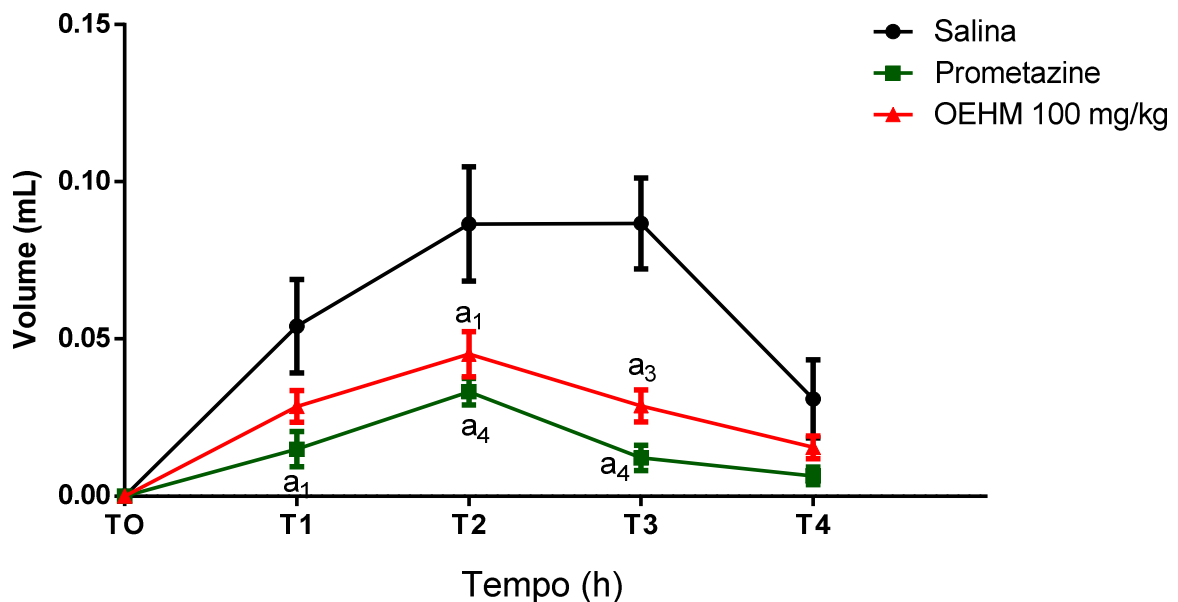
SANTOS e RAO (2000) utilizaram o composto 1,8-cineol de forma isolada visando comprovar sua atividade anti-inflamatória, e realizando o modelo de edema de pata, encontraram uma redução significativa do edema provocado pela carragenina em todas as doses testadas do 1,8-cineol, constituinte esse encontrado de forma majoritária no óleo em estudo. Estudos de JUERGENS, STÖBER e VETTER (1998) demonstram que o 1,8-cineol tem um importante potencial em inibir citocinas e produtos da cascata do ácido araquidônico quando testados em monócitos de sangue humano *in vitro*. Vale ressaltar que as citocinas são importantes mediadores do processo inflamatório, responsáveis pela liberação de histamina (ROBBINS et al., 2001).

4.3.2 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de dextrana e histamina

A administração do OEHM 100mg/kg reduziu o edema induzido por dextrana 1% em todos os tempos de avaliação do ensaio quando comparados com o grupo salina, reduzindo o edema de forma significativa na 3ª hora do experimento ($0,028 \pm 0,022$ mL). A prometazina, um anti-histamínico H1 do grupo das fenotiazinas, foi capaz de inibir o

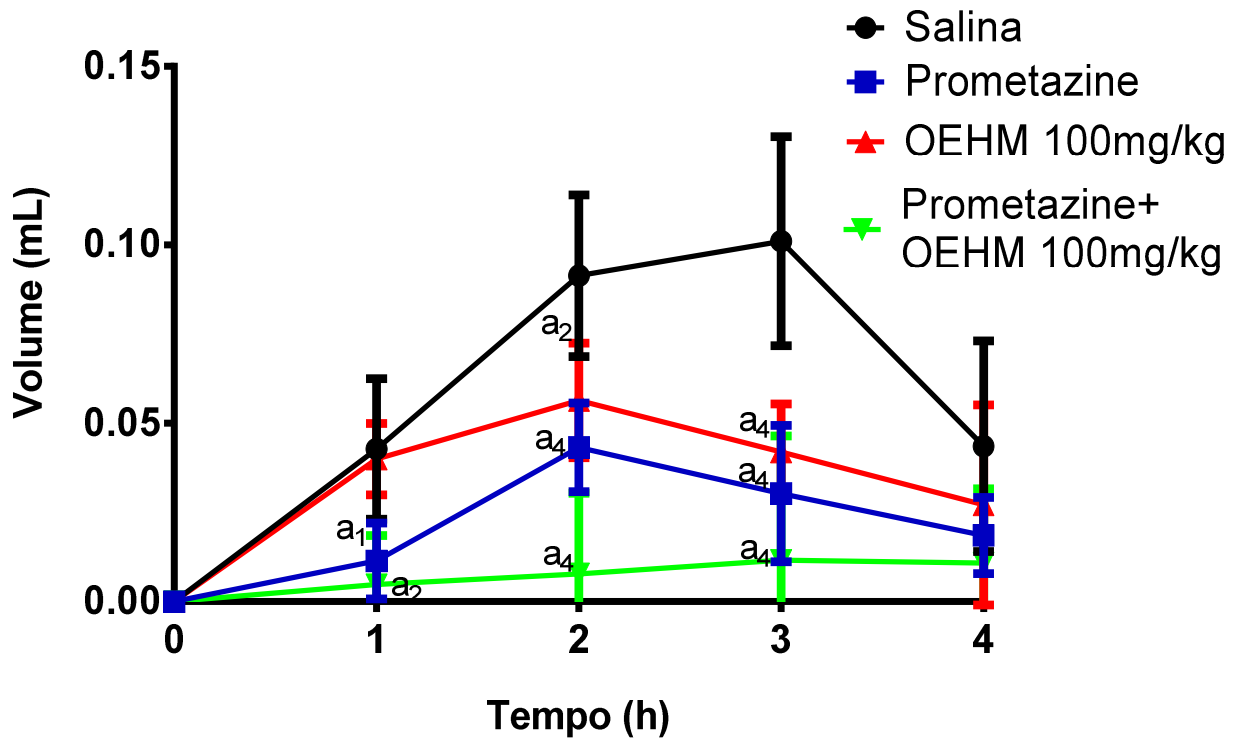
edema a partir da primeira hora de avaliação, apresentando maior significância nas 2ª e 3ª hora ($0,033 \pm 0,016\text{mL}$; $0,012 \pm 0,022\text{mL}$ respectivamente) (Figura 7). Já no modelo do edema de pata por histamina, administração da mesma dose do óleo também foi capaz de reduzir o edema ($0,041 \pm 0,019\text{mL}$) provocado pela administração de histamina de forma significativa a partir da primeira hora de avaliação do edema (Figura 8) quando comparado com o grupo que recebeu apenas solução salina ($0,010 \pm 0,019\text{mL}$). Já o grupo que recebeu apenas prometazina, teve o edema reduzido em $0,030 \pm 0,019\text{mL}$ e o grupo que recebeu prometazina e OEHM 100mg/kg teve uma redução de $0,011 \pm 0,017\text{mL}$.

Figura 7 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o edema induzido por dextrana 1% em camundongos.



Os resultados representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) de 6 animais. $a_1 = p < 0,05$ vs salina; $a_3 = p < 0,001$ vs salina; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina; ANOVA, Teste de Bonferroni.

Figura 8 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o edema induzido por histamina em camundongos



Os resultados representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) de 6 animais. $a_1 = p < 0,05$ vs salina; $a_2 = p < 0,01$ vs salina; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. ANOVA, Teste de Bonferroni.

A dextrana, agente utilizado para indução do edema na pata de camundongos é um polissacarídeo que provoca a liberação de histamina e serotonina dos mastócitos durante a formação do edema (ANDRADE et al., 2007) interagindo com seus respectivos receptores no endotélio de pequenos vasos. O OEHM reduziu o edema de forma significativa com ambos agentes indutores, dextrana e histamina, sugerindo que o óleo possa interferir pela ação direta sobre os receptores histamínicos (ROOME et al., 2008). É fundamental destacar que a histamina tem um forte efeito ativador sobre a fosfolipase A2, essa última responsável pela formação de prostaglandinas (MENEZES-DE-LIMA et al., 2006). Esses resultados também corroboram com os achados do ensaio com indução do edema pela carragenina, cujos mecanismos também podem envolver a liberação de histamina.

BRAVIM (2008) em seus estudos com o óleo essencial de *Hyptis crenata* encontrou resultados semelhantes no ensaio de edema induzido por dextrana, cujo óleo também foi capaz de reduzir o edema em todos os tempos de avaliação do teste. Ainda nesse mesmo estudo, o composto marjoritário do óleo de *Hyptis crenata* foi identificado como 1,8 – cineol (34%), componente esse também presente no OEHM em quantidade semelhantes

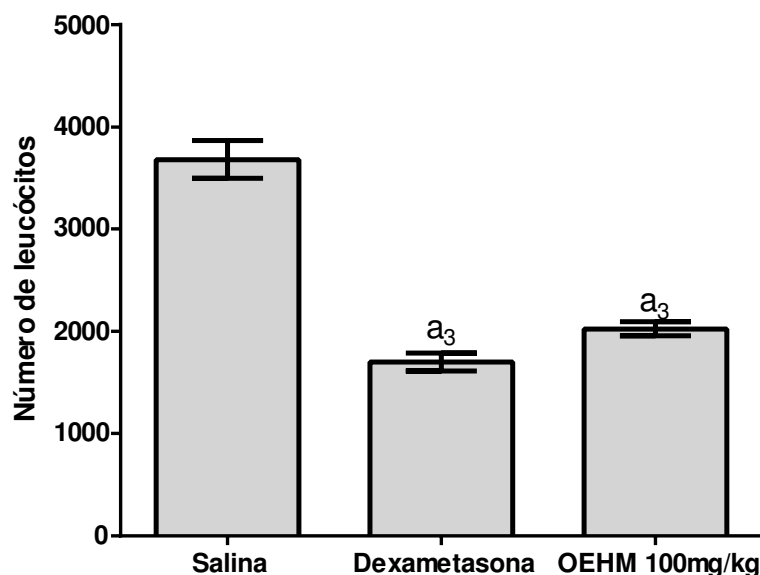
(34,58%), podendo ser o composto responsável pela possível atividade antiedematogênica nos ensaios que envolveram a liberação de histamina.

JUERGENS et al. (2003) em seus estudos com o 1,8-cineol no tratamento da asma brônquica, encontrou evidências de uma sugestiva atividade anti-inflamatória desse monoterpeno, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo, que envolvem uma possível inibição da histamina, mediador esse responsável pela broncoconstrição presente na asma brônquica.

4.3.3 Peritonite

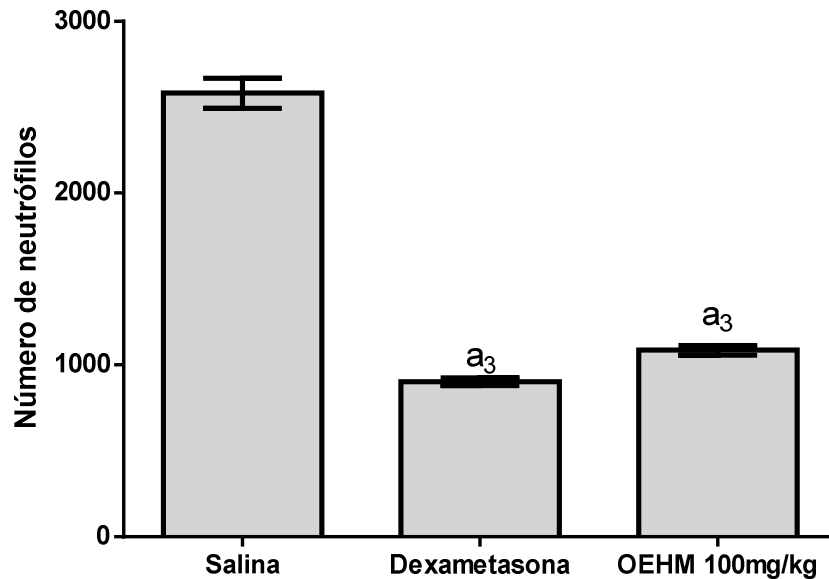
Neste ensaio, a peritonite foi induzida pela administração intraperitoneal de carragenina. Quando os animais foram tratados com o OEHM 100mg/kg ou dexametasona 5mg/kg, houve uma diminuição significativa no número total de leucócitos ($2025 \pm 69,5$ e $1700 \pm 87,6$ respectivamente) (Figura 9) bem como do número de neutrófilos ($1086 \pm 27,7$ e $904 \pm 22,8$ respectivamente) (Figura 10) quando comparados com o grupo salina. Esses achados demonstram uma inibição das células envolvidas no processo inflamatório promovido pela carragenina.

Figura 9 - Efeito da administração de OEHM 100mg/kg sobre a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina medida pela concentração de leucócitos no fluido peritoneal.



Os resultados representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) de 6 animais. $a_3 = p < 0,001$ vs salina. ANOVA, Teste de Student Newman Keuls.

Figura 10 - Efeito da administração de OEHM 100mg/kg sobre a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina medida pela concentração de neutrófilos no fluido peritoneal.



Os resultados representam a média ± E.P.M. (erro padrão da média) de 6 animais. $a_3 = p < 0,001$ vs salina. ANOVA, Teste de Student Newman Keuls.

A carragenina é uma agente indutor do processo inflamatório, que na cavidade peritoneal de camundongos induz a migração de neutrófilos (SOUZA et al., 1988) além de induzir a expressão da óxido nítrico sintetase e COX-2, com liberação aumentada de óxido nítrico e prostaglandinas (KAWAMURA et al., 2000). A migração celular é um evento que acontece durante o processo da peritonite causado por mediadores celulares e inflamatórios como neutrófilos e prostaglandina E2 respectivamente (PAULINO et al., 2008).

A administração de carragenina resultou na formação de um infiltrado de células expressivo e nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com dexametasona e OEHM foram capazes de gerar uma diminuição significativa no número total de leucócitos quando comparados com o controle do teste que recebeu apenas solução salina.

A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, que ocorre durante o processo de peritonite, pode ser inibida por mecanismos que estejam envolvidos na inibição da produção de elementos quimiotáticos ou inibição das moléculas de adesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os resultados obtidos neste ensaio no permitem sugerir que o OEHM inibe a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal provavelmente através da redução da vasodilatação dos capilares da membrana peritoneal, que pode ser ocasionada por mediadores como prostaglandinas E2 (PAULINO et al., 2008).

Rosmarinus officinalis, uma espécie da família Lamiaceae que apresenta em sua composição química o 1,8-cineol, apresentou uma importante atividade anti-inflamatória ao inibir significativamente a migração leucocitária no modelo experimental de pleurisia induzida pela administração de carragenina (TAKAKI et al., 2008). Terpenos como o 1,8-cineol, encontrado em várias espécies da família Lamiaceae, exibem uma importante atividade anti-inflamatória (HAJHASHEMI, GHANNADI e SHARIF, 2003), com estudos que demonstram que o 1,8-cineol se apresenta como um potente inibidor da produção de citocinas e de produtos do ácido araquidônico (JUERGENS, STÖBER e VETTER, 1998; JUERGENS et al., 2003).

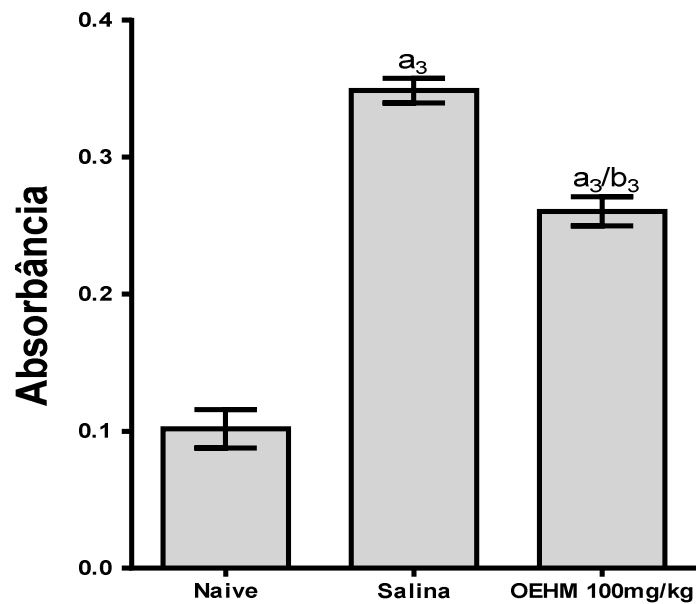
No modelo de artrite induzida por zymosan, YAMADA et al. (2013) ao trabalhar com outra espécie da família Lamiaceae, a *Ocimum americanum* L., espécie vegetal cuja caracterização fitoquímica revelou dentre seus constituintes o linalol e o 1,8-cineol, encontrou como resultado uma inibição da migração leucocitária para a cavidade sinovial. O zymosan, assim como a carragenina, também está associado ao recrutamento de neutrófilos e produção de prostaglandinas.

Ainda nos estudos de BRAVIM (2008), o óleo essencial de *Hyptis crenata* inibiu de forma significativa a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite; CALDAS et al. (2011) em pesquisa realizada com a espécie *Hyptis martiusii* Benth comprovou a atividade antiulcerogênica do OEHM em diferentes doses, que se apresentou efetivo no tratamento de úlceras pépticas induzidas por diferentes agentes, uma importante atividade anti-inflamatória. Todos esses estudos corroboram com nossos resultados acerca de uma possível atividade anti-inflamatória, sugerindo fortemente que o componente 1,8 – cineol possa ser responsável pela atividade biológica apresentada pelo óleo essencial da espécie em avaliação, já que esse constituinte se apresentou em quantidades significativas em todos os estudos supracitados.

4.3.4 Permeabilidade vascular por extravasamento de Azul de Evans

O tratamento com OEHM 100mg/kg administrado 1h antes da indução do processo inflamatório com carragenina 1% na cavidade peritoneal de camundongos, reduziu de forma significativa o aumento da permeabilidade vascular ($0,26 \pm 0,01\text{UA}$) quando comparado com o grupo naive ($0,10 \pm 0,01\text{UA}$) e salina ($0,34 \pm 0,009\text{UA}$) (Figura 11). O grupo naive, não recebeu nenhuma forma de tratamento ou indução do processo inflamatório.

Figura 11 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans no lavado peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o extravasamento de azul de Evans. $a_3 = p < 0,001$ vs naive; $b_3 = p < 0,001$ vs salina. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

O azul de Evans é um corante, que quando injetado por via intravenosa, tem forte afinidade pela albumina, permitindo o seu uso como método para avaliação da permeabilidade vascular (JANCAR et al., 1988) uma vez que sendo o endotélio lesado, maior será a concentração de albumina no lavado peritoneal.

Durante o processo inflamatório agudo ocorre a liberação de mediadores como a histamina e serotonina, importantes na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A prostaglandina E2 é também um importante mediador liberado durante o processo inflamatório, como potente vasodilatador de músculo liso presente em vasos. Esse mediador provoca vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo para o local da inflamação, aumentando a permeabilidade vascular, que resultará em extravasamento de fluidos.

Ainda nos estudos com *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), FARIA et al. (2011) ao desenvolver o mesmo modelo, encontrou uma inibição significativa do processo de permeabilidade vascular, atribuindo ao componente majoritário do referido óleo, o 1,8-cineol, a responsabilidade por essa atividade.

Os resultados obtidos sugerem que o OEHM tem ação inibindo a permeabilidade vascular, corroborando com os dados já apresentados no presente estudo,

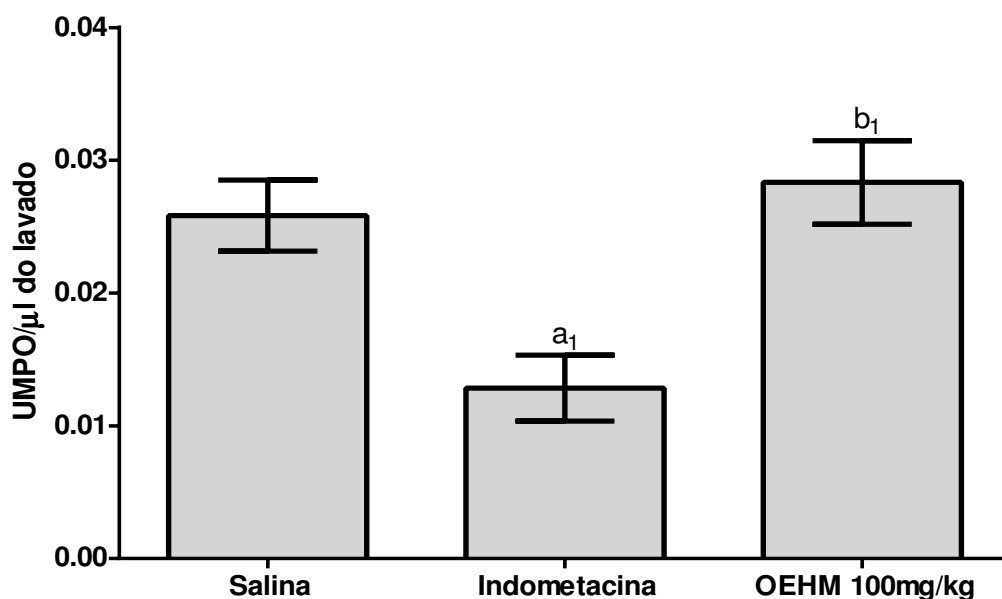
onde o OEHM foi capaz de inibir a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal provavelmente através da redução da vasodilatação dos capilares da membrana peritoneal, bem como inibindo a formação de edema induzidos por agentes como carragenina, dextrana e histamina no modelo de edema de pata.

4.3.5 Dosagem da Mieloperoxidase

O tratamento com OEHM 100mg/kg, comparado com o grupo salina não foi capaz de inibir de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) após a 4^o hora de inflamação induzida pela carragenina (Figura 12).

Na fisiopatologia do processo inflamatório linfócitos e monócitos são importantes contribuintes, gerando citocinas pró-inflamatórias, macrófagos teciduais e neutrófilos. Macrófagos e neutrófilos possuem um papel complexo nos locais onde há lesão tecidual, com destaque para a ação da enzima mieloperoxidase (MPO). Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e macrófagos teciduais, sendo prontamente liberadas como contribuição para defesa imune inata do organismo (NAGHAVI et al., 2003)

Figura 12 Efeito do OEHM 100mg/kg sobre a atividade da mieloperoxidase na inflamação induzida por carragenina.



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para a unidade de MPO/ μ l do lavado. a₁ = p<0,05 vs salina; b₁ = p<0,05 vs indometacina . ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

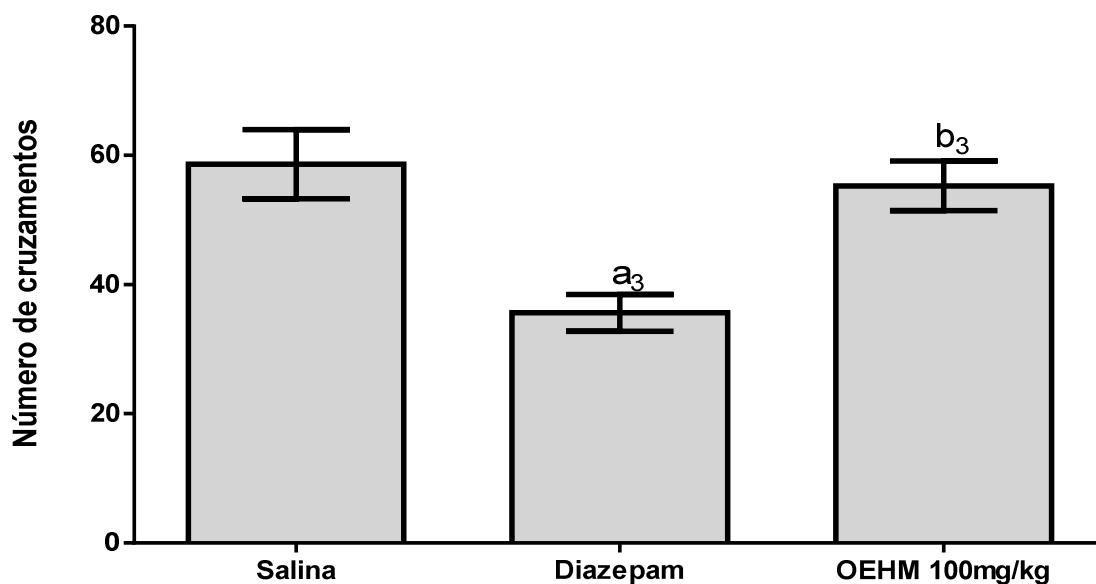
No modelo em questão, a ação da MPO não foi reduzida, mesmo com uma diminuição significativa na migração de leucócitos promovida pelo OEHM no modelo de peritonite. Isso poderia ser explicado pela presença de outras células, também envolvidas no processo inflamatório, como os macrófagos teciduais, importantes fonte de MPO, que não foram inibidos pela ação do OEHM.

No processo inflamatório envolvido na formação de placas ateroscleróticas SUGIYAMA et al. (2001) demonstraram em placas ateroscleróticas de pacientes com morte súbita uma maior expressão de MPO nos locais de ruptura das placas, sendo demonstrada a associação da expressão de MPO nos macrófagos por técnicas de imunohistoquímica.

4.4 Avaliação da atividade locomotora pelo campo aberto (“open field”)

A atividade exploratória foi avaliada observando-se o número de cruzamentos realizados pelos animais no campo aberto durante 5 minutos de exposição. O grupo que recebeu o OEHM 100mg/kg não apresentou alteração ($55,25 \pm 1,35$) no número de cruzamentos quando comparados com o grupo que recebeu apenas solução salina ($58,63 \pm 1,88$). O grupo de animais que recebeu diazepam na dose de 5mg/kg apresentou uma redução significativa ($35,63 \pm 0,99$) do número de cruzamentos na caixa de atividade, quando comparados com os grupos salina e OEHM (Figura 13).

Figura 13 Efeito do OEHM na atividade exploratória de camundongos no campo aberto



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para 6 animais. a₃= p<0,001 vs salina; b₃ = p<0,001 vs diazepam . ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

Quando avaliamos parâmetros nociceptivos se faz necessário atentar para fármacos que possuem a capacidade de reduzir a atividade do sistema nervoso central podendo causar um resultado falso positivo nas medidas nociceptivas, como lambadura e retirada de pata, locomoção, capacidade exploratória do animal, entre outras. Como confirmação para o efeito antinociceptivo dessas substâncias, são utilizados modelos experimentais como o teste de campo aberto. No teste de campo aberto ou “*open field*” a atividade exploratória do animal pode sofrer interferência de fármacos com ação depressora sobre o sistema nervoso central ou relaxantes musculares (ARCHER, 1973), mascarando uma possível atividade antinociceptiva da substância a ser testada.

No modelo do estudo em questão, a ausência de atividade do OEHM sobre a atividade exploratória dos animais no campo aberto é um importante indicativo de que o óleo não causa efeito depressor do sistema nervoso. Isto fortalece a hipótese da atividade antinociceptiva ser independente do efeito central.

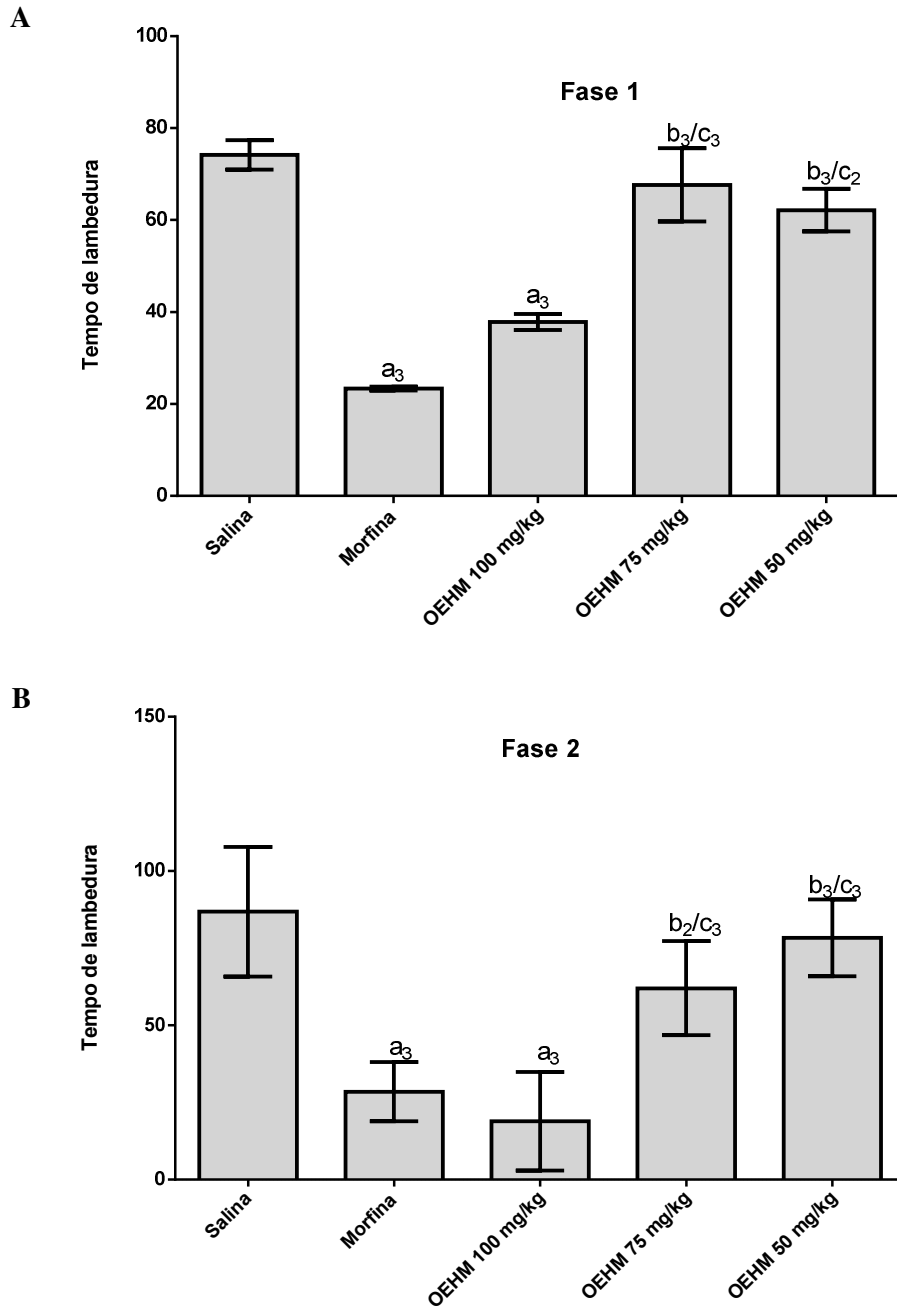
SANTOS e RAO (2000) em estudos realizados com o composto isolado 1,8-cineol, constituinte esse predominante no OEHM, encontrou em seus resultados uma diminuição da capacidade locomotora dos animais que receberam como tratamento o terpeno isolado em doses superiores a 400mg/kg. Isto corrobora com os resultados apresentados, já que, não foi observado efeito sedativo na dose do OEHM (100mg/kg) utilizada no presente modelo.

4.5 Atividade antinociceptiva

4.5.1 Teste da Formalina

A figura 14 mostra que a administração do OEHM 100mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de lambedura da pata injetada com formalina ($37,83 \pm 1,72s$) durante a primeira fase do teste (0-5 minutos) em relação ao grupo salina ($74,17 \pm 3,18s$). Em relação à segunda fase (15-30 minutos), o óleo na mesma dose também foi capaz de promover uma redução significativa do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata ($18,83 \pm 6,52s$) quando em relação ao grupo que recebeu como tratamento apenas solução salina ($86,83 \pm 8,57s$). A morfina, um importante analgésico opióide, foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambedura da pata em ambas as fases do teste (1º fase: $23,33 \pm 0,42s$; 2º fase: $28,5 \pm 3,89s$).

Figura 14 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o tempo de lambedura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina.



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o tempo de lambedura das patas traseiras direitas. a₃ = p<0,001 vs salina; b₂ = p<0,01 vs morfina; b₃ = p<0,001 vs morfina; c₂ = p<0,01 vs OEHM 100mg/kg; c₃ = p<0,001 vs OEHM 100mg/kg. ANOVA, Teste de Bonferroni.

O teste da formalina é um modelo experimental clássico para avaliação de efeitos antinociceptivos, consistindo em duas fases que envolvem diferentes mecanismos que resultam em algesia (TJØLSEN et al., 1992; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). A primeira fase (0-5 minutos) é caracterizada por uma dor de origem neurogênica, que resulta da

estimulação dos nociceptores das fibras sensoriais. Já a segunda fase (15-30 minutos) é caracterizada por uma dor de origem inflamatória, que combina eventos do processo inflamatório e centrais (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992).

A fase neurogênica ou primeira fase resulta da estimulação direta da pata do animal e reflexos centrais mediados pela substância P; já na fase inflamatória, estão envolvidos mediadores como histamina, prostaglandinas, serotonina e bradicinina (AMRESH et al., 2007). Os resultados demonstram que o OEHM na dose de 100mg/kg reduziu significativamente efeitos antinociceptivos em ambas as fases.

O óleo essencial de espécies da família Lamiaceae, como *Lavandula angustifolia* e *Rosmarinus officinalis* apresentam em sua composição química os constituintes 1,8-cineol e α -pineno em quantidades significativas e quando submetidas ao protocolo de nocicepção induzida pela formalina, apresentaram uma inibição significativa da resposta nociceptiva de lambedura das patas em ambas as fases do experimento, de forma semelhante à morfina (FARIA et al., 2011)

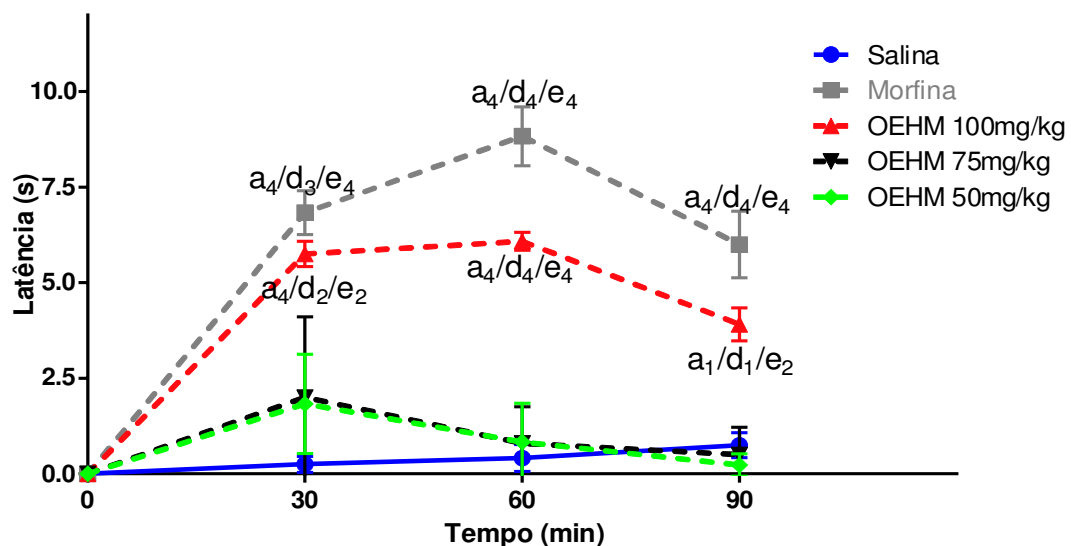
Hyptis fruticosa, espécie do gênero *Hyptis* teve o óleo essencial de suas folhas e flores avaliadas quando ao possível potencial antinociceptivo também pelo modelo da formalina. A caracterização fitoquímica das flores e folhas revelaram a presença significativa de 1,8-cineol e o composto α -pineno, e os resultados obtidos indicam uma importante atividade antinociceptiva de origem central e periférica do óleo obtido tanto das folhas como das flores da referida espécie (FRANCO et al., 2011).

Mais uma vez, nos experimentos com o constituinte isolado 1,8-cineol, SANTOS e RAO (2000) encontraram uma resposta antinociceptiva significativa no modelo em questão, onde o 1,8-cineol foi capaz de reduzir de forma importante o tempo de lambedura da pata dos animais em ambas as fases do teste. Esse modelo corrobora com os resultados já encontrados para o OEHM nos ensaios da placa quente e contorções abdominais, sendo o óleo capaz de reduzir o tempo de lambedura das patas em ambas as fases do teste. Drogas como os analgésicos opióides são capazes de inibir a resposta nociceptiva nas duas fases do ensaio (HUNSKAAR e HOLE, 1987), o que pode ser comprovado no modelo, onde a morfina foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambedura das patas na primeira e segunda fase.

4.5.2 Teste da Placa Quente ou Hot Plate

O OEHM na dose de 100mg/kg foi capaz de aumentar a latência do animal na placa quente em todos os tempos de observação apresentando maior significância nos tempos de observação de 30 e 60 minutos ($5,75 \pm 1,25s$ e $6,08 \pm 1,71s$ respectivamente) sendo a mais efetiva quando comparado com o grupo salina. O grupo que recebeu morfina, droga de referência, manteve o aumento da latência dos animais na placa em todos os tempos de observação, principalmente no tempo de 60 minutos ($8,83 \pm 1,71s$) de forma significativa em relação ao grupo tratado apenas com salina (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o estímulo nociceptivo térmico induzido em camundongos.



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) do tempo de reação ao estímulo térmico. $a_1=p<0,05$ vs salina; $a_4=p<0,0001$ vs salina; $d_1=p<0,05$ vs OEHM 75mg/kg; $d_2=p<0,01$ vs OEHM 75mg/kg; $d_3=p<0,001$ vs OEHM 75mg/kg; $d_4=p<0,0001$ vs OEHM 75mg/kg; $e_2=p<0,01$ vs OEHM 50mg/kg; $e_4=p<0,0001$ vs OEHM 50mg/kg; . ANOVA, Teste de Bonferroni.

O estímulo térmico da placa quente mostra uma resposta do animal (saltar ou lambear a pata) associado à neurotransmissão central, mediada pela ativação de nociceptores, como as fibras C e $A\delta$ (DICKENSON, 1997) e uma redução nesses parâmetros como saltar ou lambear a pata, é interpretado como potencial antinociceptivo.

O tratamento com o OEHM por via oral foi capaz de aumentar o tempo de latência do animal na placa, efeito esse também observado com a administração de morfina, uma analgésico opióide, que promoveu um aumento no tempo de reação do animal ao

estímulo do calor. Com base nesses resultados, levantamos a possibilidade de um envolvimento central relacionado ao efeito antinociceptivo apresentado pelo óleo.

O óleo essencial de *Ocimum basilicum*, outra espécie da família Lamiaceae cuja constituição química apresenta o linalol, a cânfora, óxido de cariofileno e o 1,8-cineol, este último em menores quantidades (HUSSAIN et al., 2008) aumentou de forma significativa o tempo de latência dos animais na placa quente em todos os tempos de avaliação, sugerindo uma atividade antinociceptiva central para o óleo em questão (VENÂNCIO et al., 2011).

O óleo essencial de *Micromeria biflora* (Lamiaceae) uma espécie cuja composição química se destaca pela presença de óxido de cariofileno, além de α -pineno, exibiu um aumento dependente da dose no tempo de latência do animal na placa aquecida quando comparado com o grupo que recebeu apenas o veículo, com um pico no aumento dessa latência no tempo de 60 minutos (CHANDRA et al.), o que vem corroborar com os dados encontrados no presente estudo, cujo pico do aumento da latência do animal na placa também se deu no intervalo de observação de 60 minutos, já que estes compostos também estão presentes na constituição química do óleo essencial de *Hyptis martiusii*.

Esse protocolo de avaliação antinociceptiva também foi utilizado por ARRIGONI-BLANK et al. (2008) e RAYMUNDO et al. (2011) ao avaliarem o potencial antinociceptivo do óleo essencial da espécie *Hyptis pectinata*, comprovando também uma possível atividade analgésica de origem central. Nesses estudos, a análise cromatográfica do óleo essencial da espécie, o óxido de cariofileno foi identificado como importante constituinte, esse também presente no óleo essencial da espécie em estudo.

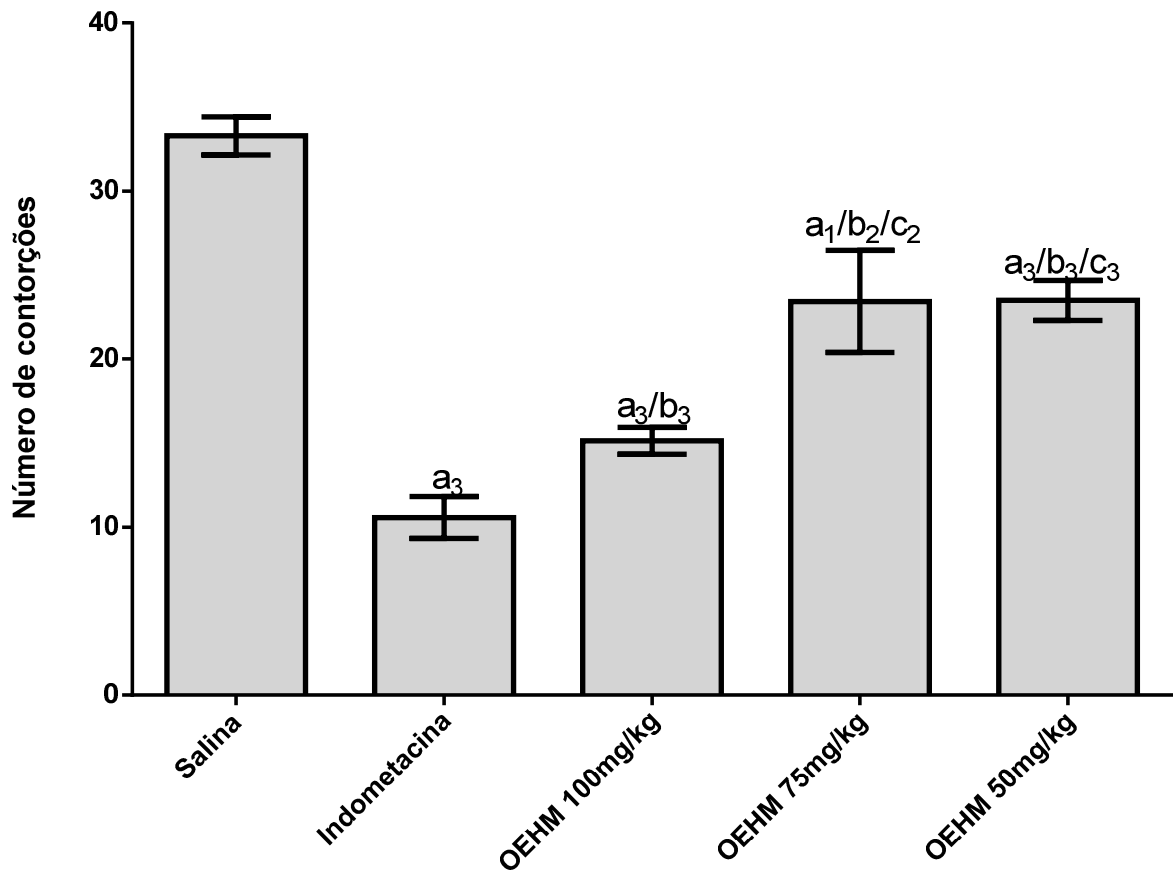
1,8-cineol, um monoterpeno isolado do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*, exibiu uma atividade antinociceptiva significativa no modelo da placa quente comparado à morfina (LIAPI et al., 2007). Vale ressaltar que o constituinte 1,8-cineol também está presente na composição química do OEHM, podendo ser um dos responsáveis pela atividade antinociceptiva no modelo em questão

4.5.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração do OEHM nas doses de 50, 75 e 100mg/kg reduziram significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético ($23,5 \pm 1,19$, $23,43 \pm 3,03$ e $15,14 \pm 0,79$ respectivamente), em relação ao grupo controle que recebeu como pré-tratamento apenas com salina ($33,29 \pm 1,12$). O grupo pré-tratado com um anti-inflamatório não esteroideal como a indometacina, utilizado como droga de referência, apresentou uma

redução significativa no número de contorções abdominais ($10,57 \pm 1,25$), como mostrado na figura 16.

Figura 16 - Efeito do OEHM 50, 75 e 100mg/kg sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de contorções induzidas pelo ácido acético. a₁ = p<0,05 vs salina; a₃ = p<0,001 vs salina; b₂ = p<0,01 vs indometacina; b₃ = p<0,001 vs indometacina; c₂ = p<0,01 vs OEHM 100mg/kg; c₃ = p<0,001 vs OEHM 100mg/kg. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

A administração intraperitoneal de ácido acético atua de maneira indireta ao induzir a liberação de mediadores presentes no processo inflamatório como algumas citocinas, prostaglandinas, histamina, serotonina (DERAEDT et al., 1980) que estimulam neurônios nociceptivos, esses últimos, sensíveis a anti-inflamatórios não esteroidais e analgésicos opióides (FISCHER et al., 2008) sendo considerado um típico modelo de nocicepção inflamatória visceral (IKEDA et al., 2001).

O modelo de contorções é utilizado para avaliar tanto um potencial antinociceptivo de origem central, como periférico, já que o ácido acético induz sensibilidade

a dor por meio da liberação de substâncias provenientes de mastócitos e macrófagos, além da sensibilização das terminações sensoriais aferentes periféricas (RIBEIRO et al., 2000).

No teste, o OEHM foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais nos camundongos em todas as doses utilizadas, caracterizada por contração, seguida de rotação do abdome e extensão de patas traseiras. Com esse resultado, podemos inferir que o óleo demonstra também um efeito antinociceptivo periférico, interferindo no processo inflamatório. A atividade analgésica apresentada nesse modelo envolve também uma antinocicepção de origem central, potencial esse já comprovado pelo ensaio da placa quente.

Lavandula angustifolia Mill., espécie da família Lamiaceae muito utilizada na medicina popular no tratamento de distúrbios inflamatórios e da dor, cuja composição química tem riqueza no composto 1,8-cineol (65%), além de outros constituintes como o linalol, α -pineno, β -pineno, apresentou uma decremento no número de contorções promovidas pelo ácido acético (HAJHASHEMI, GHANNADI e SHARIF, 2003). O mesmo pode ser observado nos estudos de SHAH et al. (2012) como óleo de *Teucrium stocksianum* espécie da família Lamiaceae constituída de terpenos como linalol, α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, em quantidades diferentes, mas que no modelo de contorções abdominais apresentou uma redução no número de contorções ocasionadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético.

MENEZES et al. (2007) ao trabalhar com o óleo essencial da espécie *Hyptis fruticosa*, cujo composto predominante foi o 1,8-cineol, encontrou uma significativa redução da resposta nociceptiva em todas as doses testadas no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sugerindo que óleo apresenta uma atividade analgésica periférica. Também no mesmo modelo, o óleo essencial de *Hyptis pectinata* foi capaz de reduzir significativamente o padrão de contorções em todas as doses testadas, demonstrando um efeito dose dependente (BRAVIM, 2008). Ainda em estudos com seis genótipos de *Hyptis pectinata*, ARRIGONI-BLANK et al. (2008) obteve como resultados a redução do número de contorções quando utilizados os seis genótipos da espécie, um importante indicativo do potencial analgésico da espécie.

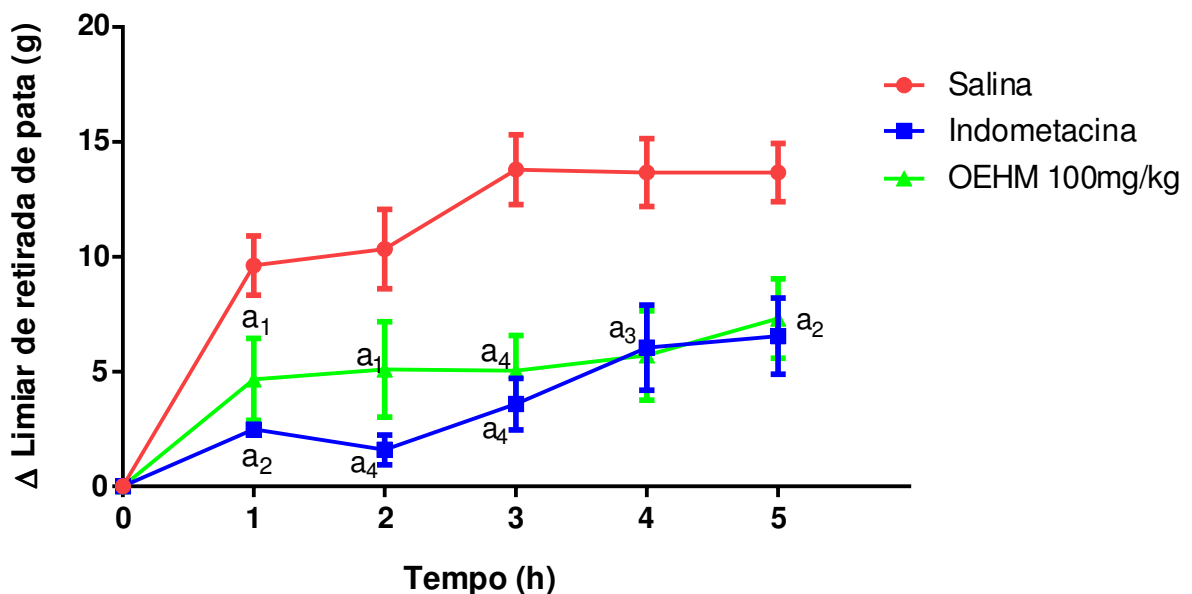
O efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do composto 1,8 cineol, quando utilizado de forma isolada, já foi avaliado em modelos experimentais de contorções induzidas por ácido acético (SANTOS e RAO, 2000), sendo esse efeito atribuído à inibição de mediadores como prostaglandinas, citocinas e mediadores GABAérgicos (BONJARDIM et al., 2011) podendo esse constituinte estar envolvido no possível potencial antinociceptivo

periférico apresentado pelo OEHM no modelo em questão, já que se apresenta em quantidades significativas na sua composição química.

4.5.4 Hipernociceção Mecânica Plantar

A dose de 100mg/kg do OEHM, administrada durante 7 dias consecutivos antes da indução do estímulo pela carragenina foi capaz de prevenir a hipernociceção em todos os tempos de mensuração do experimento, com destaque para a 3ª hora do experimento com aumento significativo do limiar de dor ($5,04 \pm 3,19$ g) quando comparado ao grupo salina. A indometacina, administrada 45 minutos antes da aplicação intraplantar de carragenina, também foi capaz de inibir a hipernociceção em todas os tempos do experimento de forma significativa, sendo que na 2ª hora de mensuração, aumentou o limiar de dor do animal em $1,6 \pm 2,53$ g (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do OEHM 100mg/kg sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por carragenina



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernociceção) para grupos de 6 animais. $a_1 = p < 0,05$ vs salina; $a_2 = p < 0,01$ vs salina; $a_3 = p < 0,001$ vs salina; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina ANOVA, teste de Bonferroni.

A administração intraplantar de carragenina em camundongos induz a liberação de citocinas, que por sua vez promovem a liberação de prostanóides e aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005). Esses últimos são responsáveis pela sensibilização

de nociceptores (CUNHA et al., 2008), logo, drogas que inibem a produção de citocinas são importantes agentes antinociceptivos em modelos de inflamação.

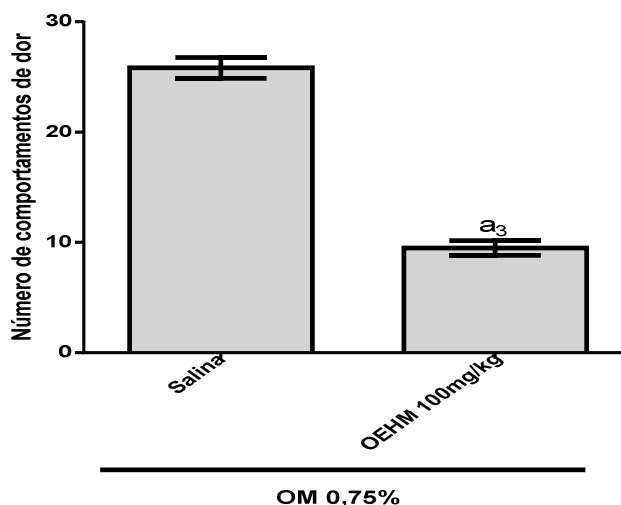
Vários estudos já demonstraram a atividade anti-inflamatória do 1,8-cineol, constituinte predominante no óleo da espécie *Hyptis martiusii*, mostrando seu efeito sobre a produção de mediadores inflamatórios, através da supressão da COX e metabolismo do ácido araquidônico e produção de citocinas (JUERGENS et al., 2004).

Nos modelos de inflamação sistêmica como edema de pata e peritonite cujo agente inflamatório utilizado foi a carragenina, o OEHM na dose de 100mg/kg foi bastante eficaz na redução do processo inflamatório produzido pela carragenina, seja pela diminuição do edema ou recrutamentos de células para o local da inflamação como os leucócitos. Na atividade anti-inflamatória envolvida nesses modelos estão presentes mediadores inflamatórios diversos, como histamina, produção de citocinas e prostaglandinas, todos intimamente relacionados, com forte indicativo de que a atividade anti-inflamatória e analgésica do OEHM seja resultado da interferência na produção de algum desses mediadores pelo terpeno 1,8-cineol.

4.5.5 Nociceção visceral induzida pelo óleo de mostarda

O OEHM na dose de 100mg/kg atuou reduzindo o número total de comportamentos de nociceção visceral ($9,5 \pm 0,67$), como o lambar abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais, de forma significativa quando comparado com o grupo salina ($25,83 \pm 0,94$) (Figura 18).

Figura 18 – Efeito antinociceptivo do OEHM 100mg/kg no modelo de nociceção visceral induzida pelo óleo de mostarda em camundongos



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de comportamentos de nociceção visceral exibidas pelos animais contados por 20 minutos, imediatamente após instilação intracolônica de óleo de mostarda. $a_3 = p < 0,001$ vs salina. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

O óleo de mostarda é um potente ativador neuronal que promove uma resposta aumentada a estímulos não nódicos como no caso da alodínea e provoca também hiperalgesia, que é um aumento da sensibilidade a estímulos nódicos em poucos minutos após sua aplicação. O óleo de mostarda, quando aplicado topicamente na pele, ativa terminações nervosas, produzindo dor, inflamação e hipersensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos (JORDT et al., 2004).

O maior constituinte do óleo de mostarda é o Alil-isotiocianato, cuja ação pode ser devido a sua atuação sobre os receptores da capsaicina TRPV1, bem como pela produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e bradicinina (CATERINA et al., 2000). Vale ressaltar que muitas são as divergências acerca do mecanismo de ação do óleo de mostarda.

Nesse modelo de nociceção, o OEHM, rico em terpenos, promoveu uma inibição significativa nos comportamentos de dor. Como o óleo de mostarda pode provocar seu efeito nociceptivo via receptores TRPV ou até mesmo através da liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas. A contorção abdominal observada pode ser explicada devido grande variedade de receptores de membrana (como os receptores vanilóides TRPV1) presente nas vísceras que são sensíveis a estímulos químicos que envolvem uma sinalização sensorial desde a periferia ao sistema nervoso central (WOOD, 2004).

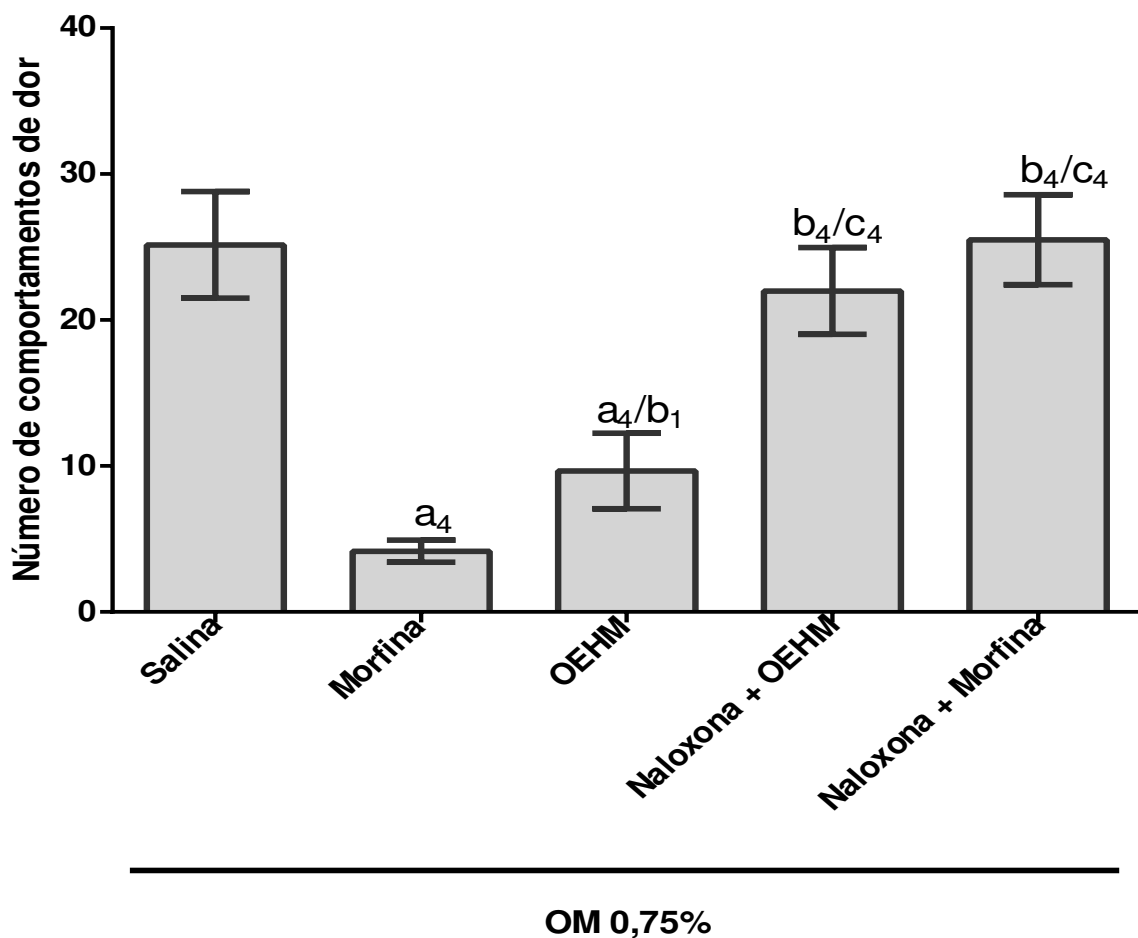
Para entender a via envolvida no bloqueio da nocicepção observada (Fig 18) faz-se necessária à investigação dos possíveis mecanismos de ação envolvido na atividade antinociceptiva do OEHM.

4.5.6 Mecanismos de ação para atividade antinociceptiva visceral

4.5.6.1 Envolvimentos dos receptores opióides

O tratamento dos animais com OEHM 100mg/kg e morfina promoveu uma inibição significativa ($9,67 \pm 1,05$; $4,17 \pm 0,31$ respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu apenas solução salina ($26,8 \pm 2,36$). O pré-tratamento com naloxona conseguiu reverter o efeito do OEHM ($22,8 \pm 1,68$) bem como o efeito da morfina, analgésico opióide de referência ($27,2 \pm 2,46$). (Figura 19)

Figura 19 – Estudo do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de comportamentos de nocicepção visceral exibidas pelos animais. a₄ = p<0,0001 vs salina; b₁ = p<0,05 vs morfina; b₄ = p< 0,0001 vs morfina; c₄ = p<0,0001 vs OEHM. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

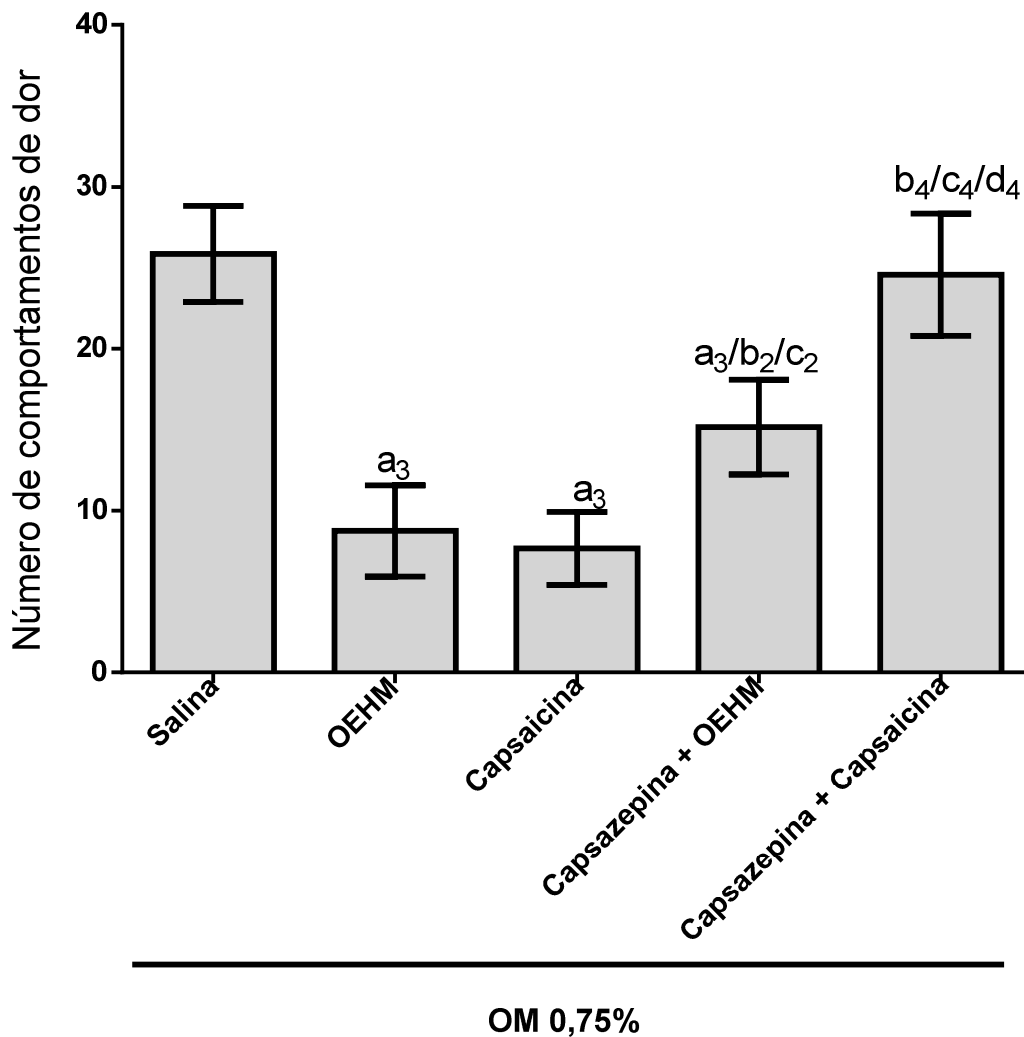
O estudo do mecanismo de ação do OEHM revela que existe o envolvimento do sistema opióide na ação antinociceptiva. A naloxona, um antagonista não seletivo para receptores opióides, conseguiu reverter significativamente o efeito da morfina e do OEHM, caracterizando que pode existir participação deste sistema na modulação da dor visceral. Esses dados nos levam a sugerir que o óleo essencial pode causar antinocicepção por promover a liberação de opióides endógenos, os quais irão interagir com seus receptores específicos ou então interagindo diretamente com receptores opióides.

Vale ressaltar que a morfina tem forte atuação sobre o subtipo de receptor κ -opióide e esse receptor exerce papel expressivo na nocicepção visceral (BLACK e TREVETHICK, 1998). Perifericamente, tem sido associado a participação dos agonistas de receptores μ -opióides inibindo a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários por mediadores inflamatórios como a serotonina e PGE2. Agonistas dos receptores δ e κ -opióides atuam inibindo a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (TAIWO e LEVINE, 1991). MILLAN e COLPAERT (1991) relatam ainda em seus estudos que opióides endógenos suprimem o processo inflamatório, auxiliando na redução da hiperalgesia.

4.5.6.2 Envolvimentos dos receptores TRPV1

A elucidação do envolvimento dos receptores TRPV1 sensíveis a capsaicina foi evidenciado realizando um pré-tratamento com capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) antes da aplicação de capsaicina e OEHM 100mg/kg, que resultaram em valores de média de $7 \pm 0,77$ e $8,28 \pm 1,01$ respectivamente, como pode ser observado na figura 20. Como ilustrado no gráfico, o efeito antinociceptivo do OEHM foi revertido ($13,5 \pm 1,72$) pelo antagonista seletivo para os receptores TRPV1, a capsazepina, resultado esse também encontrado com a reversão promovida pela capsazepina sobre a capsaicina ($19 \pm 0,94$).

Figura 20 - Estudo do envolvimento do receptor TRPV1 no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de comportamentos de nocicepção visceral exibidas pelos animais. a₃ = p<0,001 vs salina; b₂ = p<0,01 vs OEHM; b₄ = p< 0,0001 vs OEHM; c₂ = p<0,01 vs capsaicina; c₄ = p<0,0001 vs capsaicina; d₄ = p<0,0001 vs capsaicina+OEHM. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

Outros estudos demonstraram que os receptores TRPV1 presentes em fibras neuronais aferentes em vísceras como o cólon de camundongos que, medeiam comportamentos nociceptivos viscerais perante uma injúria tecidual mecânica (JONES, XU e GEBHART, 2005). O TRPV1 é um dos membros de uma família de receptores vanilóides e um dos seus principais agonistas é a capsaicina (SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Esse receptor realiza importante papel na regulação funcional dos nervos sensoriais (DOHERTY et al., 2005) e antagonistas desse receptor produzem efeitos anti-hiperalgésicos em modelos de dor neuropática e inflamatória (OGNYANOV et al., 2006).

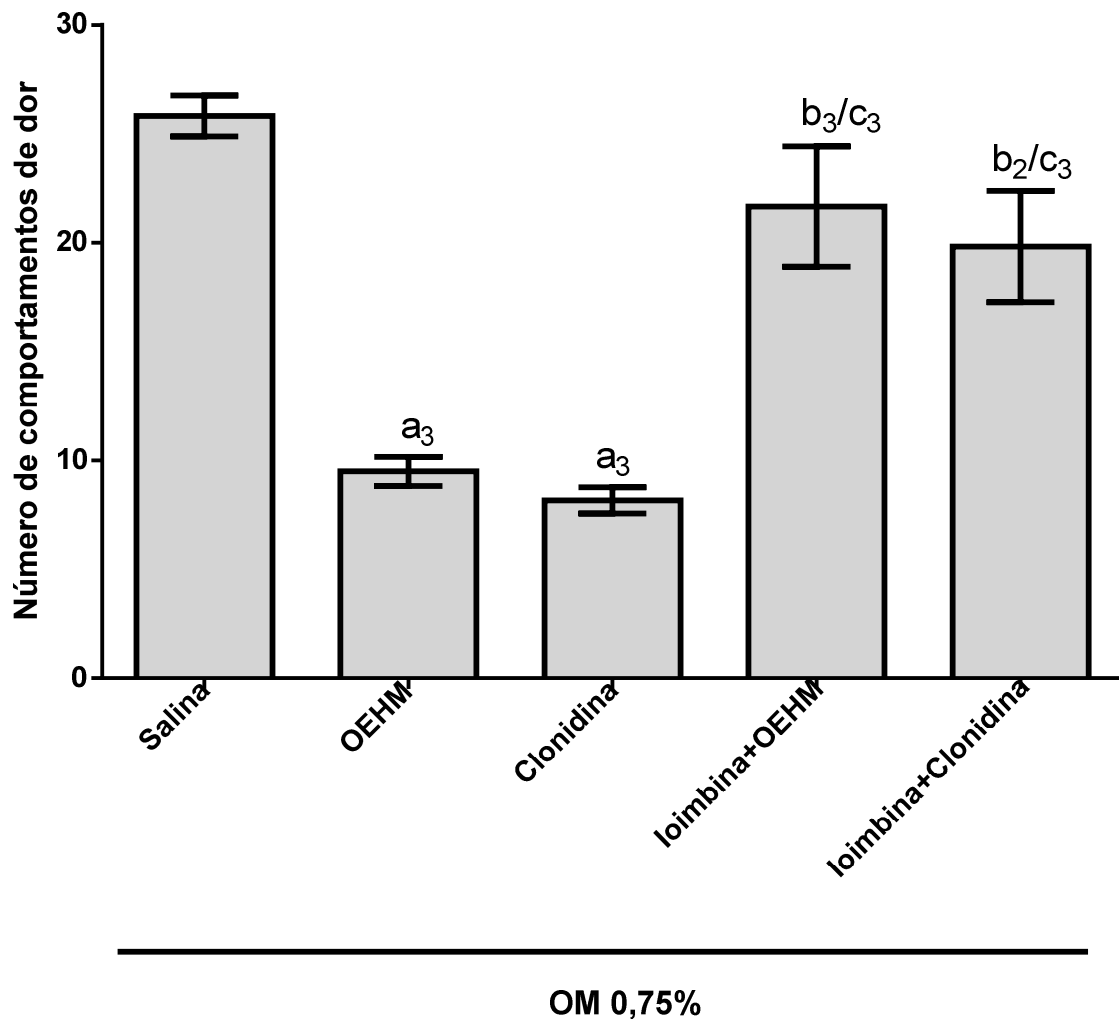
A capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) tem a capacidade de despolarizar fibras C ou A- δ , ligando-se a um receptor vanilóide, que abre canais iônicos gerando um influxo de cálcio na fibra nervosa (CATERINA et al., 1997). O antagonista da capsaicina, a capsazepina (uma substância exógena) inibe os processos dolorosos que surgem como respostas nociceptivas induzidas em processos inflamatórios quando da ligação da capsaicina com o receptor TRPV1 (FERREIRA, DA SILVA e CALIXTO, 2004).

A avaliação do envolvimento do receptor TRPV1, como parte do mecanismo de ação do OEHM demonstra que possivelmente o efeito antinociceptivo também seja dependente desta via.

4.5.6.3 Envolvimentos dos receptores noradrenérgicos $\alpha 2$

A participação dos receptores noradrenérgicos $\alpha 2$ foi evidenciada realizando um pré-tratamento com ioimbina (2 mg/kg, i.p.), antes da aplicação de clonidina e OEHM 100mg/kg, que resultou em valores de média de $8,16 \pm 0,60$ e $9,50 \pm 0,67$, respectivamente, como pode ser observado na figura 21. O tratamento dos animais com OEHM 100mg/kg e clonidina reverteu significativamente o número de comportamentos de dor dos animais quando comparados com o grupo que recebeu solução salina ($25,83 \pm 0,94$). O pré-tratamento com ioimbina conseguiu reverter a inibição dos comportamentos nociceptivos do OEHM e da clonidina ($21,67 \pm 2,76$ e $19,83 \pm 2,56$) respectivamente.

Figura 21 - Estudo do envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antinociceptivo visceral do OEHM 100mg/kg



Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de comportamentos de nocicepção visceral exibidas pelos animais. a₃ = p < 0,001 vs salina; b₂ = p < 0,01 vs OEHM; b₃ = p < 0,001 vs OEHM; c₃ = p < 0,001 vs clonidina. ANOVA, teste de Student Newman Keuls.

A clonidina, um agonista dos receptores adrenérgicos α_2 , tem sido utilizado em ensaios visando induzir efeito antinociceptivo no modelo experimental de colite, bem como para reduzir a hipersensibilidade visceral em ambientes clínicos (BLACKSHAW e GEBHART, 2002). A clonidina apresenta importantes propriedades antinociceptivas contra vários tipos de estímulos nocivos, desde modelos que utilizam como estímulos a pressão, temperatura e agentes químicos (SKINGLE, HAYES e TYERS, 1982).

Já foi reportada na literatura a atividade analgésica da clonidina por via sistêmica, espinal e supraespinal, sendo geralmente seus efeitos mediados em sítios de ação

espinais e supraespinais. Vários estudos sugerem a transmissão colinérgica associada ao efeito analgésico da clonidina (ZENG, CHEN e DOHI, 2007).

A ativação dos receptores α_2 por vias descendentes noradrenérgicas exerce um importante efeito regulador inibitório na modulação da dor aguda e casos de hiperalgesia inflamatória. Logo, possui um papel fundamental na dor de origem somática, bem como também na dor de origem visceral (MANSIKKA et al., 2004). Na modulação da dor de origem visceral, a ativação dos receptores α_2 atuam via proteína G, inibindo adenilato ciclase, o que irá aumentar o efluxo de K^+ e suprimir as correntes de Ca^{+2} , que impede a liberação continuada de substância P e glutamato por terminais nervosos (MILLAN, 2002).

Na avaliação do envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 , o efeito inibitório do OEHM sobre o comportamento dos animais foi revertido pela ioimbina, sugerindo também a participação desses receptores no mecanismo de ação do óleo.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

- O OEHM não apresentou atividade anti-inflamatória tópica aguda e crônica;
- O OEHM demonstrou atividade anti-inflamatória sistêmica;
- A ação da enzima mieloperoxidase não foi alterada pelo OEHM;
- A atividade locomotora não foi alterada com a administração do OEHM, sugerindo que o efeito antinociceptivo não está relacionado a um efeito depressor/ansiolítico do óleo;
- O OEHM revelou atividade antinociceptiva de origem central e inflamatória;
- Os receptores opióides, TRPV1 e α 2-noradrenérgicos parecem estar envolvidos no mecanismo de ação antinociceptivo do OEHM.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier, 2008.
- AGRA, M. D. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALMEIDA, C. D. F. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P. D. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 343-353, 2002.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain research**, v. 1000, n. 1, p. 40-56, 2004.
- AMRESH, G. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 526-531, 2007.
- ANDRADE, S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- ARAÚJO, E. C. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3760-3762, 2003.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARRIGONI-BLANK, M. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 334-339, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BESSON, J. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BLACK, D.; TREVETHICK, M. The kappa opioid receptor is associated with the perception of visceral pain. **Gut**, v. 43, n. 3, p. 312, 1998.

BLACKSHAW, L. A.; GEBHART, G. The pharmacology of gastrointestinal nociceptive pathways. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 642-649, 2002.

BONJARDIM, L. et al. Sida cordifolia leaf extract reduces the orofacial nociceptive response in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1236-1241, 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRAVIM, L. S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth. 2008.

BUENO, A. X. et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 317-323, 2006.

CALDAS, G. F. R. et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth.(Lamiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 886-892, 2011.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051-2058, 1999.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CAVALCANTI, B. et al. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 388-392, 2008.

CHANDRA, M. et al. Essential oil composition and pharmacological activities of *Micromeria biflora* (Buch.-Ham. Ex D. Don) Benth. collected from Uttarakhand region of India.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9171, p. 2233-2237, 1999.

CHENG, J.-K.; JI, R.-R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical research**, v. 33, n. 10, p. 1970-1978, 2008.

CHUKWUJEKWU, J. et al. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 295-297, 2005.

CORMACK, D. Ham histologia. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a. cap**, v. 7, p. 123-149, 1991.

COSTA-LOTUFO, L. et al. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 1, p. 78-79, 2004.

COSTA, J. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COUTINHO, H. D. et al. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 63-65, 2009.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CUNHA, T. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008.

DA SILVA AUGUSTO, L. G.; GÓES, L. Compreensões integradas para a vigilância da saúde em ambiente de floresta: o caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil Integrated understanding for health surveillance in a forest environment: the case of the Araripe. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. Sup 4, p. S549-S558, 2007.

DE OLIVEIRA, I. G.; DA SILVA, M. A. P. Plantas medicinais utilizadas na farmacopéia popular em Crato, Juazeiro e Barbalha-Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. pg. 189-191, 2007.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.; WILLOUGHBY, D. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp, 2002.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: (Ed.). **The pharmacology of pain**: Springer, 1997. p.167-210.

DOHERTY, E. M. et al. Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 1, p. 71-90, 2005.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

FACEY, P. C. et al. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican Hyptis verticillata Jacq. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4774-4777, 2005.

FALCÃO, D.; MENEZES, F. Review ethnopharmacological, pharmacological and chemical of genus Hyptis. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 84, p. 69-74, 2003.

FANTONE, J. C.; WARD, P. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **The american journal of pathology**, v. 107, n. 3, p. 395, 1982.

FARIA, L. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from Rosmarinus officinalis L.(Lamiaceae). **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 7, p. 1-8, 2011.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. Global importance of medicinal plants. **The conservation of medicinal plants**, p. 25-51, 1991.

FAZOLIN, M. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 599-603, 2007.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British journal of pharmacology**, v. 141, n. 5, p. 787-794, 2004.

FERREIRA, S. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, v. 240, n. 102, p. 200-203, 1972.

FISCHER, L. G. et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 235-239, 2008.

FRANCO, C. R. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1693-1699, 2011.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GONÇALVES, L. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GRUBB, B. Peripheral and central mechanisms of pain. **British journal of anaesthesia**, v. 81, n. 1, p. 8-11, 1998.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67-71, 2003.

HAJHASHEMI, V.; ZOLFAGHARI, B.; YOUSEFI, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. **Medical Principles and Practice**, v. 21, n. 2, p. 178-182, 2011.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

IADAROLA, M. J.; CAUDLE, R. M. Good pain, bad pain. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 239-240, 1997.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

ISOBE, T. et al. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1039-1041, 2006.

JANCAR, S. et al. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. **Prostaglandins**, v. 35, n. 5, p. 757-770, 1988.

JONES, R. C. W.; XU, L.; GEBHART, G. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 47, p. 10981-10989, 2005.

JORDT, S.-E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 260-265, 2004.

JUDD, W. S. et al. Plant systematics: a phylogenetic approach. **ecologia mediterranea**, v. 25, n. 2, p. 215, 1999.

JUERGENS, U. et al. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

JUERGENS, U.; STÖBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **European journal of medical research**, v. 3, n. 11, p. 508, 1998.

JUERGENS, U. R. et al. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 281-287, 2004.

JUNIOR, V. F. V.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.

KAWAMURA, M. et al. Are the anti-inflammatory effects of dexamethasone responsible for inhibition of the induction of enzymes involved in prostanoid formation in rat carrageenin-induced pleurisy? **European journal of pharmacology**, v. 400, n. 1, p. 127-135, 2000.

KUMAR, V. **Robbins patologia básica**. Elsevier, 2011.

LAPA, A. J. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2003.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 1, n. 1, p. 335-359, 1983.

LIAPI, C. et al. Antinociceptive properties of 1, 8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta medica**, v. 73, n. 12, p. 1247-1254, 2007.

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

LOPEZ, P. et al. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, 2005.

MACHADO, J. G. S. et al. Análise bioética da legislação brasileira aplicável ao uso de animais não-humanos em experimentos científicos. **Revista de Saúde do Distrito Federal, Brasília**, v. 15, n. 3/4, p. 9-21, 2004.

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

MANSIKKA, H. et al. α 2A Adrenoceptors contribute to feedback inhibition of capsaicin-induced hyperalgesia. **Anesthesiology**, v. 101, n. 1, p. 185-190, 2004.

MARTINS, E. et al. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. **MING LC ET AL., Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica, Botucatu: UNESP**, p. 97-126, 1998.

MELZACK, R. et al. Pain mechanisms: A new theory. **Psychosocial processes and health: A reader**, p. 112-131, 1994.

MENEZES-DE-LIMA, O. et al. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 80, n. 3-4, p. 123-135, 2006.

MENEZES, I. A. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 192-195, 2007.

MENICHINI, F. et al. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 679-686, 2009.

MILLAN, M.; COLPAERT, F. Opioid systems in the response to inflammatory pain: sustained blockade suggests role of κ -but not μ -opioid receptors in the modulation of nociception, behaviour and pathology. **Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 541-553, 1991.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

_____. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MOGIL, J. S.; GRISEL, J. E. Transgenic studies of pain. **Pain**, v. 77, n. 2, p. 107-128, 1998.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.

MURPHY, W. L.; ANDERSEN, J. M.; EBELIN, R. M. Assessment of geology as it pertains to modeling uplift in jointed rock :

a basis for inclusion of uncertainty in flow models. Vicksburg, Miss., March 2002 2002. Disponível em: < <http://libweb.wes.army.mil/uhtbin/hyperion/TR-02-2.pdf> >.

NAGHAVI, M. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664-1672, 2003.

OGNYANOV, V. I. et al. Design of Potent, Orally Available Antagonists of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1. Structure-Activity Relationships of 2-Piperazin-1-yl-1 H-benzimidazoles. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 12, p. 3719-3742, 2006.

OHSAKI, A. et al. New labdane diterpenoids from *Hyptis fasciculata*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1577-1579, 2005.

OKIEMY-ANDISSA, N. et al. Analgesic effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of three congolese medicinal plants: *Hyptis suaveolens*, *Nauclea latifolia* and *Ocimum gratissimum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, 2004.

OLIVEIRA, C. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth.(Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 756-759, 2004.

OLIVEIRA, R. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 296-301, 2008.

PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides ac, novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- α -pyrones from *hyptis pectinata*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 4, p. 583-593, 1993.

PORTE, A.; GODOY, R. L. D. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial; Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L): essential oil antimicrobial and chemical properties. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRANCE, G. T. What is ethnobotany today? **Journal of ethnopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 209-216, 1991.

RAYMUNDO, L. J. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata*(L.) Poit essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725-732, 2011.

REBELO, M. M. et al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 230-235, 2009.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

ROBBINS, S. L. et al. **Fundamentos de Robbins patologia estrutural e funcional**. Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P. L.; MEHTA, I. **Biology and chemistry of plant trichomes**. Plenum Press New York and London, 1984.

ROOME, T. et al. *Aegiceras corniculatum* extract suppresses initial and late phases of inflammation in rat paw and attenuates the production of eicosanoids in rat neutrophils and human platelets. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 248-254, 2008.

RUSSO, M., CATHY M; BROSE, M., WILLIAM G. Chronic pain. **Annual review of medicine**, v. 49, n. 1, p. 123-133, 1998.

SANTOS, F.; RAO, V. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000.

SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm.(Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2011.

SHAH, S. M. M. et al. Analysis of chemical constituents and antinociceptive potential of essential oil of *Teucrium Stocksianum* bioss collected from the North West of Pakistan. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 244, 2012.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIANI, A. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SIEGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of the gross bodily activity of small animals. **The Journal of Psychology**, v. 21, n. 2, p. 227-236, 1946.

SILVA-SANTOS, A. et al. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 8-13, 2006.

SILVA, A. et al. WD & NASCIMENTO, EA 2003. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.(Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1-7,

SILVA, A. B. et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 4, p. 475-9, 2006.

SILVA, J. V. D. Bioética: visão multidimensional; Bioethics: multidimensional. 2010.

SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN 13 C. **Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora**, p. 207-213, 2005.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SKINGLE, M.; HAYES, A. G.; TYERS, M. B. Antinociceptive activity of clonidine in the mouse, rat and dog. **Life sciences**, v. 31, n. 11, p. 1123-1132, 1982.

SOUSA, F. C. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, G. et al. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-380, 1988.

SOUZA, G. R. et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2013.

SOUZA, L. K. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 963-965, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

STANLEY, P. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 4, n. 4, p. 262-271, 1991.

STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 11845-11846, 2001.

SUGIYAMA, S. et al. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 3, p. 879-891, 2001.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 2, p. 159-212, 1999.

TAIWO, Y.; LEVINE, J. Kappa-and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **The Journal of neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 928-932, 1991.

TAKAKI, I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 4, p. 741-746, 2008.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential oil safety: a guide for health care professionals**. Churchill Livingstone London, 1995.

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

TUBARO, A. et al. The croton oil ear test revisited. **Inflammation Research**, v. 17, n. 3, p. 347-349, 1986.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENÂNCIO, A. M. et al. Chemical composition, acute toxicity, and antinociceptive activity of the essential oil of a plant breeding cultivar of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Planta medica**, v. 77, n. 08, p. 825-829, 2011.

VERAS, H. N. et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, 2012.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. Federation proceedings, 1987. p.118.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WOOD, J. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. **Gut**, v. 53, n. suppl 2, p. ii9-ii12, 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1768, 2000.

YAMADA, A. N. et al. Anti-inflammatory Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. **The American journal of Chinese medicine**, v. 41, n. 04, p. 913-926, 2013.

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

ZENG, W.; CHEN, X.; DOHI, S. Antinociceptive synergistic interaction between clonidine and ouabain on thermal nociceptive tests in the rat. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 12, p. 983-988, 2007.

ZHANG, B. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 465-469, 2007.