



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium sp. L.*
(ARAÇÁ)**

CRATO, CE

2013

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium sp. L.*
(ARAÇÁ)**

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

Orientadora: Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

CRATO, CE

2013

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium sp. L.*
(ARAÇÁ)**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf – Orientadora

Universidade Regional do Cariri – URCA – CE

Prof^a. Dr^a. Bagnólia Araújo da Silva – Membro externo

Universidade Federal da Paraíba – UFPB – PB

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – Membro interno

Universidade Regional do Cariri – URCA – CE

Prof. Dr. Irwin Alencar de Menezes – Co-orientador (Suplente)

Universidade Regional do Cariri – URCA - CE

***Dedico** este trabalho aos meus pais, Maria das Graças de Sousa e Raimundo Nonato Sampaio (cujo apoio e incentivo possibilitaram a realização desse trabalho), e aos meus irmãos Tamara de Souza Sampaio e David de Souza Sampaio, por sempre apoiarem minhas decisões e meus sonhos, por sempre estarem presentes em minha vida e por todo amor, carinho e dedicação de sempre.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela vida a mim concedida, pelo dom da infinita sabedoria que tens, por sempre guiar meus passos e minha família aonde quer que estejamos, por mais essa vitória e por todos que conheci durante esta caminhada.

Aos meus pais **Maria das Graças de Sousa** e **Raimundo Nonato Sampaio**, por todo o apoio, confiança e incentivo, pelo exemplo de força, luta e fé que sempre foram para mim, pelo colo e amor incondicional que sempre me deram e por serem os melhores pais do mundo! Aos meus amados irmãos **Tamara de Souza Sampaio** e **David de Souza Sampaio** pelo companheirismo, apoio, horas de descontrações, risos e muito amor, só nós nos entendemos! Vocês são as razões da minha vida, amo incondicionalmente e imensuravelmente!

A toda minha família, em especial a minha tia **Judite** (Tia Ju), por todo amor, incentivo e apoio e por ser minha segunda mãe, e a minha avó **Cecília Maria de Sousa** (*in memoriam*) meu anjinho que sempre rezou e torceu por mim, pelos conselhos e pelo amor de mãe.

A minha orientadora Prof. **Dra. Marta Regina Kerntopf**, por ter se disponibilizado em me orientar neste estudo, por todo o aprendizado adquirido e pelo incentivo à pesquisa.

Ao professor **Dr. Irwin Alencar de Menezes**, pela colaboração e auxílio fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao prof. **Dr. Galberto Martins** e **Msc. Fabíola Galvão**, pelo apoio à obtenção do óleo do arará, assim como a análise química e a contribuição de reagentes.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Farmacologia e Química Molecular pela disponibilidade nos testes e pelos momentos memoráveis que vocês me proporcionaram, em especial a **Daniele Oliveira**, **Larissa Rolim**, **Andreza Guedes**, **Emmily Petícia**, **Luiz Jardelino**, **Thales Coutinho**, **Barbosa Neto** e **Valter Santos**.

À professora **Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva** pela identificação botânica e depósito da exsicata.

Aos meus queridos amigos **Ivonildo Dias** e **Maíra Xavier**, que conheci na graduação e se tornaram os meus grandes amigos, obrigada pelos momentos inesquecíveis que vocês me proporcionaram.

À minha amiga **Gerlânia Leite**, pelo carinho e respeito que sempre teve por mim, por estar sempre disponível a me ouvir, um exemplo de força, foco, mulher e ser humano.

À **Laura Hévila**, minha amiga/irmã de todas as horas. Obrigada pelo carinho, preocupação, companheirismo, ajuda nos testes e momentos inesquecíveis vividos, pessoa especial que Deus colocou em minha vida e que quero ter sempre comigo.

À **Anita Oliveira**, que tive a honra de ser madrinha de casamento. Minha amiga, companheira, confidente, trabalhamos, nos ajudamos, rimos e choramos, agradeço a Deus por ter colocado você na minha caminhada.

À minha amiga **Damiana Sousa**, pelo apoio, carinho, disponibilidade de sempre me ajudar e me ouvir independente de dia e hora. Obrigado por se preocupar sempre com minha felicidade, você é muito especial!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, em especial Prof. **Dr. Waltécio de Oliveira Almeida**, Prof. **Dr. José Galberto Martins da Costa**, Prof. **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, Prof. **Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes**, Profa. **Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva**, Profa. **Dra. Marta Regina Kerntopf**, Profa. **Dra. Imeuda Peixoto Furtado** e Profa. **Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda**, pelos conhecimentos transmitidos!

Aos colegas de mestrado por tornarem os momentos mais divertidos e compartilharem esta etapa tão importante da minha vida, em especial **Thiago Almeida**, **Jacqueline Andrade**, **Naiana Seixas**, **Natallyanea Beserra**, **Gilena Sampaio** e **Olga Paiva**.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular.

Às secretárias **Maria Andecieli Rolim de Brito** e **Maria Lenira Pereira** pela atenção e gentileza que sempre me atenderam.

Aos funcionários, **Fernando**, **Rafael (pela ajuda no biotério)**, **Silvana**, **Marcos**, **Seu Luiz**, **Fred (pelas coletas)**, **Silvio**. Pelo respeito e ajuda nesses dois anos. Obrigada!

À **Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ)** pela concessão de linhagens de roedores para os ensaios *in vivo*;

À **FUNCAP**, pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento de material e ao **CNPq** e **CAPES**, pelo suporte financeiro.

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

"Uma prova de que Deus esteja conosco não é o fato de que não venhamos a cair, mas que nos levantemos depois de cada queda."

Santa Teresa de Ávila

RESUMO

A espécie *Psidium sp.* L. (Myrtaceae) é popularmente conhecida como araçá amarelo e na medicina popular é utilizada para cicatrização e contra diarreia, existindo poucos estudos sobre essa espécie. O óleo essencial das folhas de *Psidium sp.* (OEP) foi avaliado quanto à atividade antinociceptiva, onde foram realizados modelos clássicos para a determinação dessa atividade, utilizando os métodos de formalina, ácido acético, placa quente e capsaicina, e à atividade antiinflamatória tópica em modelos de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, como óleo de cróton, capsaicina, ácido araquidônico, histamina e fenol, em camundongos *Swiss*. A aplicação do OEP 200mg/ml apresentou uma atividade antiinflamatória de maior significância nos modelos de edema de orelha induzido por histamina (PE: 11,86%; $P < 0,001$) e fenol (PE: 100,1%; $P < 0,01$), indicando que o óleo pode ser um ótimo agente no tratamento de reações alérgicas, mas que também atua inibindo a síntese/liberação de prostaglandinas, evento que ocorre nas dermatites de contato. O OEP, nas doses de 100 e 200mg/kg, apresentou efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético semelhante ao diclofenaco. No teste de formalina o OEP, nas duas concentrações citadas, exibiu uma atividade antinociceptiva significativa nas duas fases do teste ($P < 0,001$), assim como a morfina (7,5mk/kg, i.p). A naloxona, um antagonista opióide, foi eficiente na inibição da antinocicepção induzida pelo OEP 100mg/kg, assim como da morfina, nas duas fases do teste. Para acrescentar, o OEP (100 e 200mg/kg) exerceu um significativo efeito no teste de nocicepção induzida por capsaicina, sendo um modelo semelhante a primeira fase da formalina. A naloxona também reverteu a antinocicepção induzida pelo OEP 100mg/kg nesse modelo. O OEPM parece exercer ação analgésica tanto periférica e/ou espinhal quanto supraespinhal, pois o OEP aumentou o tempo de latência dos animais na placa quente ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$). De acordo com os dados obtidos, o OEP parece exercer sua atividade antiinflamatória inibindo a liberação de mediadores vasoativos como CGRP, substância P, taquicinas, histamina e serotonina, assim como demonstrou ser eficaz em dermatites de contato irritativas pela redução do edema induzido por fenol. O efeito antinociceptivo do OEPM parece estar relacionado com o sistema opióide, já que a naloxona, um antagonista opióide, foi capaz de reverter à analgesia, induzida pelo óleo, nos testes de formalina, placa quente e capsaicina.

Palavras-chave: óleo essencial de *Psidium sp.*, atividade antiinflamatória, atividade antinociceptiva, produtos naturais.

ABSTRACT

The species *Psidium sp.* L. (Myrtaceae) is popularly known as araçá and is used in folk medicine for healing and against diarrhea, there are few studies on this species. The essential oil of the leaves of *Psidium sp.* (OEP) was evaluated for antinociceptive, where classical models were performed to determine this activity, methods using formalin, acetic acid, capsaicin and hot plate, and topical anti-inflammatory activity in models of ear edema induced by different phlogistic agents, as croton oil, capsaicin, arachidonic acid, phenol and histamine in mice Swiss. The application of OEP 200mg/ml presented an anti-inflammatory activity of greater significance in the model of ear edema induced by histamine (PE: 11,86%; $P < 0,001$) and phenol (PE: 100,1%; $P < 0,01$), indicating that the oil can be a great agent in the treatment of allergic reactions, but also acts by inhibiting the synthesis/release of prostaglandins, an event that occurs on contact dermatitis. The OEP at doses of 100 and 200mg/kg, showed antinociceptive effect the writhing test induced by acetic acid similar to Diclofenac. In the formalin test OEPM, at the concentrations listed, exhibited a significant antinociceptive activity in both phases of the test ($P < 0.001$) and morphine (7.5 mg / kg, ip). Naloxone, an opioid antagonist, was effective in inhibition of antinociception induced OEP 100mg/kg, as morphine in both phases of the test. To add, the OEPM (100 and 200mg/kg) exerted a significant effect test nociception induced by capsaicin being a model similar to the first phase of formalin. Naloxone also reversed the antinociception induced OEP 100mg/kg this model. The OEP seems to exert analgesic action both peripheral and / or spinal as supraspinal, OEP increased because the latency time of the animals on the hot plate (55 ± 0.5 ° C). According to the data obtained, the OEP seems to exert its anti-inflammatory activity by inhibiting the release of vasoactive mediators such as CGRP, substance P, tachykinins, histamine and serotonin, and shown to be effective in irritant contact dermatitis by reducing the edema induced by phenol. The antinociceptive effect of OEP appears to be related to opioid system, as naloxone, an opiate antagonist, was able to reverse analgesia induced by oil in formalin test, hot plate and capsaicin.

Keywords: essential oil of *Psidium sp.*, antiinflammatory, antinociceptive activity, natural products.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% por cento; percentual

+ mais

– menos

× vezes, multiplicado por

± mais ou menos

> maior que, superior a.

= igual a

< menor que, inferior a.

α - alfa

β - beta

δ - gama

μL – microlitro(s)

μm – micrômetro(s)

AA – ácido araquidônico

AINE's – anti-inflamatórios não esteroides

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

BK1 – receptor de bradicinina-1

°C – graus Celsius

C3a , C3b e C5a – proteínas do sistema complemento

Ca^{++} - cátion cálcio bivalente

CAP – capsaicina

CE – Estado do Ceará (Brasil)

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – cicloxigenase

COX-1 – cicloxigenase-1

COX-2 – cicloxigenase-2

E.P.M. – erro padrão da média.

DAINEs - drogas anti-inflamatórios não esteroides

DEXA – dexametasona

et. al. – e outros; e colaboradores (latim, abrev. de *et alii*)

g – grama(s)

h – hora(s)

IL-1 – interleucina-1

IL-1_α – interleucina-1-alfa

IL-6 – interleucina-6

IL-8 – interleucina-8

INDO – indometacina

i.p. – via intraperitoneal

kg – quilograma(s)

LOX – lipoxigenase

5-LOX – 5-lipoxigenase

12-LOX – 12-lipoxigenase

15-LOX – 15-lipoxigenase

LFQM – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA)

LTB₄ – leucotrieno B₄

LTC₄ – leucotrieno C₄

LTD₄ – leucotrieno D₄

mg – miligrama(s)

mg/kg – miligramas de concentração da solução por quilograma de massa corpórea do animal

mg/mL – miligramas de soluto por mililitro de solvente (água destilada ou salina)

min – minuto(s)

mL – mililitro(s)

mm – milímetro(s)

NF- κ B – *Nucleus factor – kappa B* (Fator de transcrição nuclear – capa B)

NO – óxido nítrico

OC – óleo de croton

OEPM – Óleo essencial de *Psidium myrcinites*

P – significância estatística (erro)

PAF – fator de ativação plaquetária

PE – percentual de edema

PGD₂ – prostaglandina D₂

PGE₁ – prostaglandina E₁

PGE₂ – prostaglandina E₂

PKC – proteína quinase C

PLA2 – fosfolipase A2

® - marca registrada

ROS – *reactive oxygen species* (espécie reativa de oxigênio, inglês)

SNC – Sistema Nervoso Central

TPA – 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato

TXA2 – tromboxano A2

TNF- α – *tumor necrosis factor – alpha* (fator de necrose tumoral-alfa, inglês)

URCA – Universidade Regional do Cariri

v.o. – via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Esquema simplificado de uma secção transversal ilustrando as três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Adaptado por SAMPAIO E RIVITTI, 2000.	17
Figura 02	(A) Dermatite atópica aguda com intenso eritema e presença de vesículas (WILLIANS <i>et. al.</i> , 2005); (B) Ilustração da dermatite de contato alérgica (Adaptado de HENNINO <i>et. al.</i> , 2005); (C) Ilustração da psoríase (adaptado de SAMPAIO e RIVITTI, 2000 e AZULAY e AZULAY, 1997).	22
Figura 03	Representação esquemática dos mecanismos básicos da dor. Fonte: http://www.dol.inf.br/Html/compreendendoDor.html .	24
Figura 04	Ilustração dos mediadores químicos envolvidos na dor inflamatória e ativação dos nociceptores, assim como o receptor representativo de ação de cada um. Fonte: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/5249/dor_cronicaa_nne_louise_oaklander.htm	25
Figura 05	Foto da espécie <i>Psidium myrsinites</i> . Fonte: http://www.flickr.com/groups/myrtaceae/pool/page3	28
Figura 06	(A) Equipamento tipo Clevenger utilizado para a obtenção do óleo essencial. (B) Óleo essencial das folhas de <i>Psidium myrsinites</i> pronto. Fonte: Autora.	33
Figura 07	Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>Psidium myrsinites</i> . (A) Estrutura do p-cineol e (B) β -eudesmol. Fonte: http://www.sigmaaldrich.com	47
Figura 08	Efeito do OEP, aplicado topicamente, sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton em camundongos	49
Figura 09	Curva tempo-resposta do efeito do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos	52
Figura 10	Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos	53
Figura 11	Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por N-vanililnonanamida em camundongos	56
Figura 12	Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos	58
Figura 13	Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina em camundongos	61
Figura 14	Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por fenol em camundongos	63

Figura 15	Efeito antinociceptivo do OEP no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	66
Figura 16	Efeito do OEP sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida por formalina na 1º fase do teste	69
Figura 17	Efeito do OEP sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida por formalina na 2º fase do teste	70
Figura 18	Efeito do OEP sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente	73
Figura 19	Efeito do OEP sobre a nocicepção induzida pela injeção subplantar de capsaicina	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Drogas e reagentes utilizados nos ensaios farmacológicos e suas respectivas origens.	36
Tabela 02	Esquematização da divisão dos grupos e aplicação das substâncias nos modelos de edema de orelha.	38
Tabela 03	Esquematização da administração das substâncias e da avaliação do tempo que o animal permaneceu na placa quente.	42

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação.....	17
1.1.1 Fisiologia e estrutura da pele.....	17
1.1.2 Mecanismos da inflamação cutânea.....	19
1.1.3 Doenças inflamatórias cutâneas.....	21
1.2 Nocicepção.....	23
1.2.1 Definição de dor e nocicepção.....	23
1.2.2 Dor inflamatória.....	25
1.2.3 Dor Neuropática.....	26
1.2.4 Dor visceral.....	26
1.3 <i>Psidium sp.</i> L.....	27

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30

3.MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material.....	32
3.1.1 Material botânico.....	32
3.1.2 Obtenção do óleo essencial de <i>Psidium sp.</i>	32
3.1.3 Análise química do óleo essencial.....	32
3.1.4 Aspectos éticos da pesquisa.....	33
3.1.4 Reagentes e drogas.....	36
3.1.5 Material e equipamentos utilizados.....	36
3.1.6 Animais.....	37
3.2 Métodos.....	37
3.2.1 Dose letal média (DL ₅₀)	37
3.2.2 Avaliação da atividade antiinflamatória tópica através de modelos de edema de orelha.....	38

3.2.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	38
3.2.2.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	39
3.2.2.3 Edema de orelha induzido pela aplicação de N-vanililnonanamida.....	39
3.2.2.4 Edema de orelha induzido pela aplicação de ácido araquidônico.....	40
3.2.2.5 Edema de orelha induzido pela aplicação de fenol.....	40
3.2.2.6 Edema de orelha induzido pela aplicação de histamina.....	41
3.2.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	41
3.2.3.1 Teste da placa quente ou “Hot-plate”.....	41
3.2.3.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	42
3.2.3.3 Teste da Formalina.....	43
3.2.3.4 Teste da nocicepção induzida por capsaicina.....	43
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1 Análise química do óleo essencial.....	45
4.2 Dose letal média (DL ₅₀).....	47
4.1 Avaliação da atividade antiinflamatória tópica do óleo essencial de <i>Psidium sp</i> (OEP) em modelos de inflamação cutânea.....	47
4.1.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	47
4.1.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	50
4.1.3 Edema de orelha induzido por N-vanililnonanamida.....	54
4.1.4 Edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico.....	56
4.1.5 Edema de orelha induzido por Histamina.....	59
4.1.6 Edema de orelha induzido por Fenol.....	62
4.2 Avaliação da atividade antinociceptiva do óleo essencial de <i>Psidium sp</i> (OEP) em modelos clássicos de nocicepção.....	64
4.2.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	64
4.2.2 Efeito do OEP na nocicepção induzida por formalina.....	67
4.2.3 Efeito do OEP no modelo de nocicepção pela Placa Quente.....	71
4.2.4 Efeito do OEP na nocicepção induzida por Capsaicina.....	74
5.CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	79

PUBLICAÇÕES.....	96
ANEXOS.....	99

1. Introdução

1.1. INFLAMAÇÃO

1.1.1. Fisiologia e estrutura da pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, onde representa 15% do peso corporal. Ela é responsável pelo isolamento da estrutura interna do corpo com o meio externo, desenvolvendo uma função de proteção. É constituída por três camadas de propriedades e estruturas distintas, sendo dispostas e inter-relacionadas de modo a adequar-se ao desempenho de suas funções de maneira harmônica, essas camadas são: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura1), sendo uma camada superior, uma camada intermediária e uma camada profunda, respectivamente (SAMPAIO E RIVITTI, 2000).

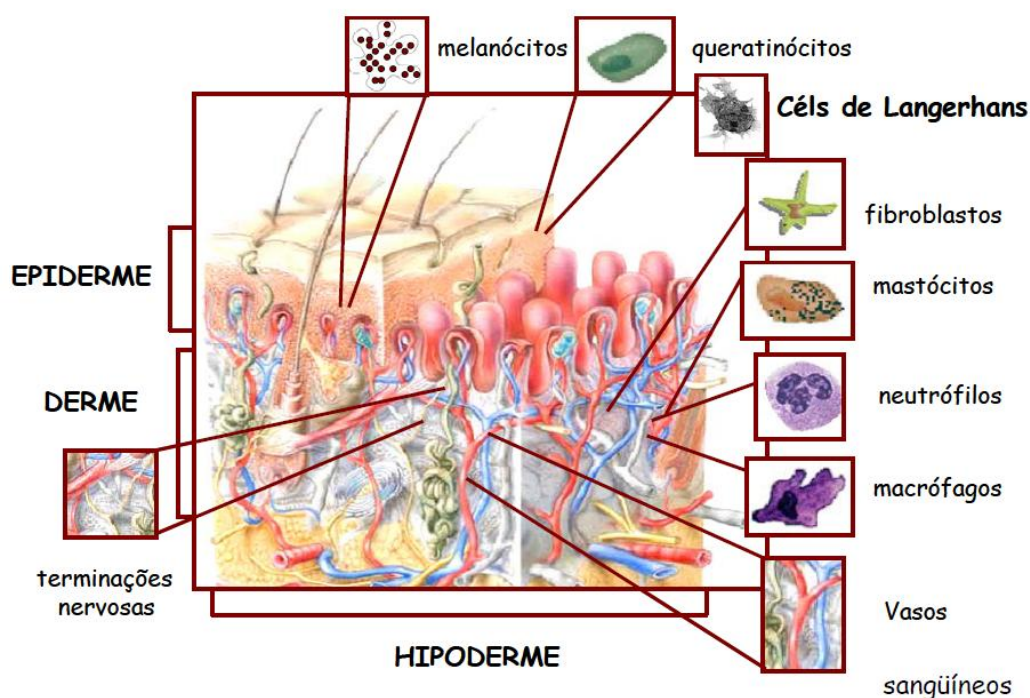


Figura 01: Esquema simplificado de uma seção transversal ilustrando as três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. **Fonte:** Adaptado por SAMPAIO E RIVITTI, 2000.

A epiderme é constituída de inúmeros tipos celulares onde aproximadamente 80-85% são queratinócitos, 10-13% melanócitos, 4% células de Langerhans e 1% células de Merckel. É um tecido multiestratificado, do tipo pavimentoso sendo renovado

constantemente através de uma diferenciação progressiva, que começa na camada basal em direção à camada superficial (CANDI *et. al.*, 2005; KOSTER e ROOP, 2004; FREINKEIL e WOODLEY, 2001).

Os queratinócitos são o principal tipo celular da epiderme e estão envolvidos na manutenção da integridade da estrutura epidérmica assim como na resposta imunológica do tecido cutâneo, pois expressam diferentes quimiocinas, citocinas e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC – II). No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da epiderme (corneócitos) promovendo força mecânica, mantêm a estrutura do queratinócito e contribui na adesão celular (CHAN, 2004).

Os melanócitos, outro tipo celular da epiderme, também são encontrados no aparelho ocular, na retina, no ouvido, no sistema nervoso central, nas mucosas e pelos. São de natureza dendrítica, com numerosos prolongamentos longos e ramificados, que se relacionam com células espinhosas supradjacentes. Sua função é produzir pigmentação à pele (SAMPAIO E RIVITTI, 2000).

Outro tipo celular da epiderme são as células de Langerhans, capazes de capturar e processar o antígeno no interior da pele, migrando para o linfonodo no intuito de fazer a apresentação aos linfócitos T. Em certas doenças inflamatórias cutâneas, como na dermatite de contato e em processos alérgicos, verifica-se o aumento no número de células de Langerhans, sugerindo que essas células participem nas reações de sensibilização das dermatites de contato (MONTAGNA e PARAKKAL, 1974; NORRIS, 2004; HAAKE *et. al.*, 2000).

Por fim, as células de Merkel são células epidérmicas modificadas, atuam como mecanoreceptores e também contribuem no desenvolvimento do plexo nervoso, pois no citoplasma dessas células existem grânulos que contém catecolaminas, além disso, esse tipo celular frequentemente está próximo ou em contato com nervos não-mielinizados, formando sinapses com terminações nervosas periféricas (HAAKE *et. al.*, 2000; NORRIS, 2004).

A derme possui espessura superior a da epiderme e consiste de um tecido conjuntivo, rico em mucopolissacarídeos e fibras colágenas, reticulares e elásticas. Esta

estrutura confere a pele resistência mecânica, elasticidade e força tensil (HAAKE *et. al.*, 2000). Além de suas células características, ou seja, fibroblastos, histiócitos, mastócitos, células mesenquimais indiferenciadas e as células de origem sanguínea, leucócitos e plasmócitos, a derme aloja estruturas anexas da pele, como glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, etc (RYAN, 2004). Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido a ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 α (IL 1 α) e interleucina 1 β (IL 1 β) (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele composta exclusivamente por tecido adiposo. Além de depósito nutritivo de reserva, a hipoderme participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Reconhecer a composição normal da pele em termos de estrutura e função é importante para auxiliar na identificação das variações e diagnosticar doenças da pele para que se possa realizar um tratamento adequado. Primeiramente, essas variações se manifestam através da espessura, composição de densidade dos anexos cutâneos, e, em alguns casos, de diferenciação bioquímica (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

1.1.2. Mecanismos da inflamação cutânea

A pele, além de possuir um papel importante na proteção, termorregulação e resposta imunológica do corpo, é um importante agente na manutenção e desenvolvimento de defesa, pois está constantemente sujeita a estímulos externos, tais como agentes mecânicos, agentes químicos e físicos, patógenos e resposta auto-imune. Esses estímulos vão desencadear uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória, que tem como finalidade erradicar o agente agressor,

evitando sua disseminação a outras regiões do corpo, promover reparo tecidual e reestabelecer a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004; BECKER, 1997).

Uma resposta imediata da inflamação desencadeia cinco sinais característicos e descritíveis, denominados de sinais cardinais da inflamação, são eles: calor (aumento da temperatura local), dor, tumor (inchaço ou edema), rubor (vermelhidão, devido ao aumento do fluxo sanguíneo) e perda da função da região afetada pelo processo inflamatório (por afetar terminações nervosas). (COTRAN *et. al*, 2000).

A resposta inflamatória cutânea é iniciada para solucionar um desequilíbrio na homeostase da pele, por isso, junto com sinais inflamatórios são gerados mecanismos para inibir este processo, como, por exemplo, as lipoxinas que agem sobre os leucócitos inibindo a quimiotaxia, a adesão celular e sua migração através das células endoteliais, bem como o aumento da permeabilidade vascular mediado pelas células polimorfonucleares (GILROY *et al.*, 2004). Quando, por algum motivo, os mecanismos endógenos que controlam a inflamação falham, pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do órgão, podendo, o mesmo, desenvolver processos inflamatórios crônicos (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

Os queratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo devido à produção de diversos mediadores pró-inflamatório como, por exemplo, as citocinas, cuja produção se mostra consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Os queratinócitos armazenam grande quantidade de IL-1 em seu citoplasma, podendo liberá-la quando danificados, iniciando uma cascata inflamatória (SPELLBERG, 2000). Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (BURBACH *et. al.*, 2000; KUPPER, 1990).

Além das citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (AA), também chamados de prostanóides, também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo. Estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo. Sabe-se que na pele os prostanóides são produzidos abundantemente e que os seus receptores também estão expressos de forma considerável (KABASHIMA e MIYACHI, 2004).

1.1.3. Doenças inflamatórias cutâneas

Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas doenças iniciadas por um processo irritativo ou alérgico. Assim, as doenças inflamatórias cutâneas não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, conseqüentemente, o mesmo tipo de tratamento (FIRESTEIN, 2004; LEUNG *et. al.*, 2004). As dermatites são dermatoses inflamatórias mediadas por fatores imunológicos locais ou sistêmicos, embora a causa de muitas delas continuem desconhecidas (MURPHY; MIHM Jr., 2000).

A dermatite atópica (Figura 2A) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por um estado de hiper-reatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos, ressecamento intenso (xerose), prurido, eritema, níveis elevados de IgE e eosinofilia. A dermatite atópica é inicialmente caracterizada por níveis elevados de IL-4 e IL-13, em consequência da presença de um infiltrado de células Th2. Essas citocinas induzem a síntese de IgE e IL-5, e esta, por sua vez, tem uma importante função no desenvolvimento e sobrevivência dos eosinófilos (GUTTMAN-YASSKY *et. al.*, 2007; LEUNG *et. al.*, 2004).

A dermatite de contato, por sua vez, é caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de dermatite de contato: a dermatite de contato irritativa, decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de ativar a imunidade inata da pele; e a dermatite de contato alérgica (Figura 2B), também conhecida como hipersensibilidade de contato, que requer a ativação da imunidade adquirida antígenoespecífica, levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras da inflamação cutânea (HENNINO *et. al.*, 2005).

Outra doença inflamatória crônica é a psoríase (Figura 2C), que apresenta como característica remissão e exacerbação espontâneas. Atualmente, a psoríase é reconhecida como uma doença auto-imune causada por uma ativação inapropriada do sistema imune celular, sendo caracterizada como uma doença papulo-escamosa, como consequência da hiperproliferação excessiva dos queratinócitos e da formação de um foco inflamatório. A sua patogenia envolve a integração de leucócitos infiltrados no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos), células residentes e uma variedade

de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e eicosanóides (KRUEGER e BAWCOCK, 2006; NICKOLOFF e NESTLE, 2004).



(A)



(B)



(C)

Figura 02: (A) Dermatite atópica aguda com intenso eritema e presença de vesículas (WILLIANS *et. al.*, 2005); (B) Ilustração da dermatite de contato alérgica (Adaptado de HENNINO *et. al.*, 2005); (C) Ilustração da psoríase (adaptado de SAMPAIO e RIVITTI, 2000 e AZULAY e AZULAY, 1997).

Diante disso, busca-se uma terapia com fármacos que minimizem os efeitos negativos da inflamação, reduzindo o sofrimento durante o tratamento. Dentre os fármacos mais utilizados para este fim estão os glicocorticóides, que ainda são os agentes antiinflamatórios mais utilizados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação antiinflamatória, e os antiinflamatórios não-esteroides (AINE's), cuja ação principal é a inibição direta das enzimas COX, influenciando assim a síntese de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (SCHOEPE *et. al.*, 2006 ; RANG *et al.*, 2007).

1.2. NOCICEPÇÃO

1.2.1. Definição de Dor e Nocicepção

Dor é uma experiência complexa, difícil de ser definida, descrita ou interpretada, a melhor definição é aquela proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*): “a Dor é uma experiência emocional com sensação desagradável, associada à lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal”. A dor desempenha um papel de alerta, comunicando ao indivíduo que algo está errado, podendo gerar estresse acentuado e incapacidade física. (Bruno, 2001).

A dor possui o importante papel de nos alertar que algo está errado com o corpo, nos levando a tomar medidas cabíveis para o alívio da mesma. A sensação de dor induz respostas urgentes para seu alívio, provocando nos animais comportamentos como massagear ou lambe a área lesada. A dor manifesta-se com intensidade diferente entre os indivíduos, variando de acordo com o sexo, idade e estado de humor (FAUCETT e LEVINE, 1991; GANONG, 1988; BERKLEY, 1999; CHAPMAN e GAVRIN, 1999; SHARP, 2001).

É necessária, tanto experimental como clinicamente, à distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção (KANDEL *et al.*, 2003). Dessa forma, o termo nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999).

Os animais não possuem a capacidade de verbalizar os componentes subjetivos da dor, ou seja, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES, 1992).

Os nociceptores são terminações nervosas sensoriais, diferindo dos outros receptores sensitivos devido ao seu limiar de ativação mais elevado, estando associado aos estímulos de intensidade potencialmente lesiva (MILLAN, 1999).

De forma simplificada, a nociceção constitui-se dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo, seja ele térmico, mecânico ou químico, podendo ser considerado como uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

As fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC são as fibras A β , que constitui a fibra de condução nervosa mais rápida dentre as envolvidas com o processo nociceptivo, são bastante mielinizadas, possui diâmetro grande (10 μ m) e transmitem estímulos inócuos. As fibras A δ possuem uma condução nervosa mais lenta que as fibras A β devido a pouca mielinização, são ativadas através de nociceção mecânica e térmica e apresentam diâmetro intermediário (2 – 6 μ m). E por fim as fibras C não apresentam mielinização, sendo, por isso, a fibra de condução mais lenta, são ativadas por vários tipos de nociceção e apresentam o menor diâmetro (0,4 – 1,2 μ m) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

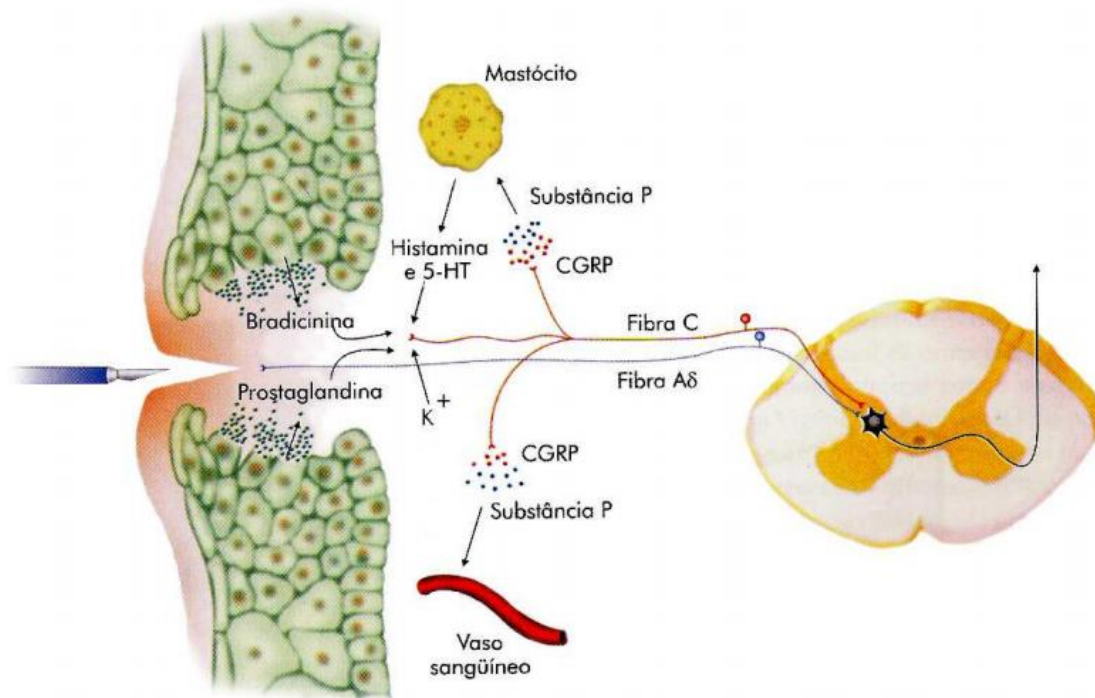


Figura 03: Representação esquemática dos mecanismos básicos da dor. **Fonte:** <http://www.dol.inf.br/Html/compreendendoDor.html>.

1.2.2. Dor Inflamatória

Como visto anteriormente, o processo inflamatório envolve a liberação de diversos mediadores químicos, como citocinas, quimiocinas, eicosanóides, aminas vasoativas, entre outras. Na presença de inflamação, os nociceptores adquirem novas características, ficando sensibilizados. Eles começam a disparar estímulos espontaneamente e seu limiar de ativação fica reduzido. Esta sensibilização pode ser produzida por: alterações físicas como pressão decorrente da formação de edema; alterações químicas como a síntese/liberação de prostaglandinas, serotonina, bradicinina e aminoácidos excitatórios, e pela participação de citocinas (RANG *et. al.*, 2007; AKBARI *et. al.*, 2009).

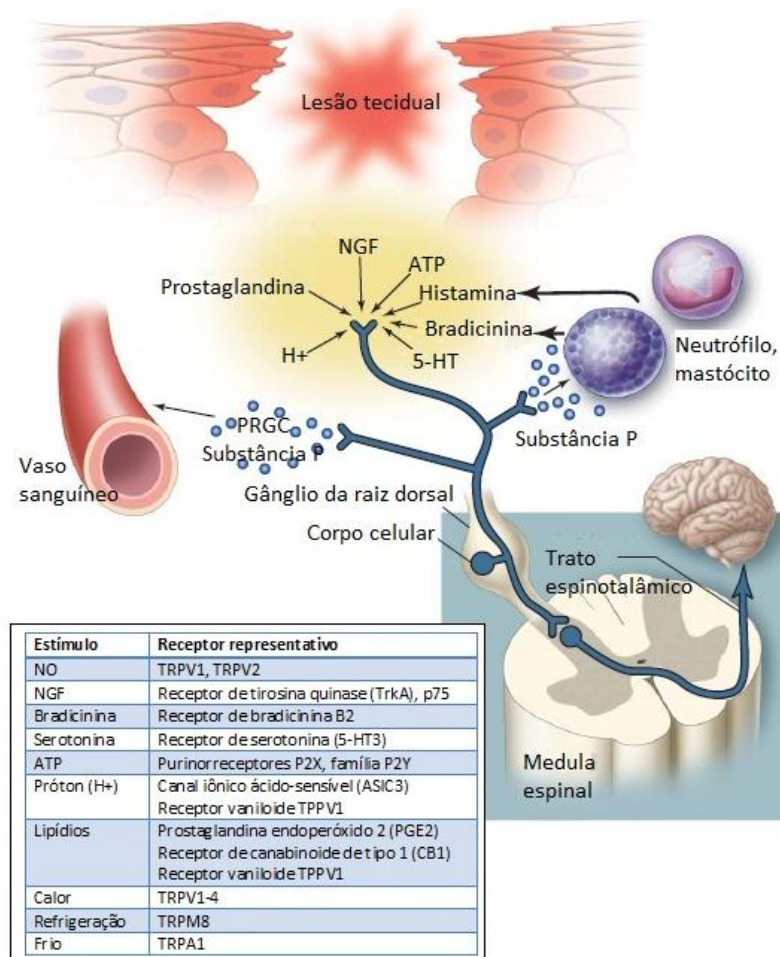


Figura 04. Ilustração dos mediadores químicos envolvidos na dor inflamatória e ativação dos nociceptores, assim como o receptor representativo de ação de cada um. **Fonte:** http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/5249/dor_cronicaanne_louise_oaklander.htm

De fato, a dor é uma característica peculiar da inflamação e a dor inflamatória é o maior problema clínico em vários distúrbios inflamatórios, como, por exemplo, a artrite reumatóide (MacMahon *et al.*, 2005). Um dos aspectos mais problemáticos da dor de origem inflamatória é a possibilidade da progressão de um estado agudo para um estado prolongado, podendo, dessa forma, aumentar a susceptibilidade de instalação de um quadro de dor inflamatória crônica (WOOLF e MANNION, 1999; MENDELL e SAHENK, 2003).

1.2.3. Dor Neuropática

É aquela que se manifesta em doentes com lesões no SNP, medula espinal, tronco encefálico e encéfalo. A lesão das vias sensitivas periféricas e centrais pode resultar na ocorrência de dor espontânea nas áreas desferentadas (TEIXEIRA, 2001).

A etiologia da dor neuropática é heterogênea e pode ser ocasionada por um insulto primário ao sistema nervoso periférico ou central (ZIMMERMANN, 2001). As neuropatias originam-se quando ocorre uma lesão nos nervos ou nas demais estruturas que transmitem a sensação dolorosa e podem resultar de trauma mecânico, lesão nervosa (amputação ou compressão), efeitos tóxicos de drogas, doenças como diabetes ou síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) (MENDELL e SAHENK, 2003).

Os mecanismos envolvidos na dor neuropática ainda não estão exatamente estabelecidos, porém, MacFarlane e colaboradores (1997) sugerem que o desenvolvimento de dor crônica após lesão de nervo ocorra, através de alterações, na medula espinal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e, eventualmente, mudança no fenótipo. Essas alterações ocorrem principalmente devido a uma estimulação excessiva dos nociceptores, uma vez que estes estão com limiar de ativação mais baixo (hipersensibilidade) (COUTAUX *et al.*, 2005).

1.2.4. Dor visceral

A dor visceral é uma das mais comuns formas de dor produzidas por um estado patológico (angina, cólica, dispepsia, dismenorréia, etc.) (LEITE, 2011).

A dor visceral resulta da ativação de fibras sensoriais aferentes que inervam órgãos internos. É causada por alterações internas de órgãos ocos e cápsulas de vísceras sólidas, tais como o estômago, rim, bexiga, vesícula biliar, cápsula hepática, intestinos, entre outros. Os principais fatores que estimulam as fibras nociceptivas viscerais são: estiramento (tensão) da parede muscular das vísceras ocas e capsulas das vísceras sólidas (anormalidades motoras intestinais que geram pressões intraluminais exageradas são causas comuns), processo inflamatório (colites, pancreatites, entre outras), isquemia e neoplasias (KRAYCHETE; GUIMARÃES, 2003).

1.3. *Psidium sp. L.*

A Chapada do Araripe destaca-se no Nordeste brasileiro pela sua geomorfologia e geologia e estende-se nos limites de Pernambuco ao Ceará. A biodiversidade da chapada com suas riquezas naturais atrai uma intensa atividade antrópica que resulta em degradação e risco de extinção, entre elas está à espécie *Psidium sp.* (LEITE, 2011).

O gênero *Psidium* inclui aproximadamente 150 espécies, que são todas árvores frutíferas ou arbustos (JAISWAL e JAISWAL, 2005), conhecidas popularmente como araçá, e está distribuída nos estados de Ceará, Bahia, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Maranhão, Piauí, entre outros (FRAZON *et al.*, 2009).

Segundo FRAZON *et al.*, 2009, no cerrado existem aproximadamente 13 espécies conhecidas como araçazeiros, sejam elas nativas ou introduzidas, podendo, quanto ao hábito, serem arbustos ou árvores que alcançam até cinco metros de altura.

As espécies tem potencial para o paisagismo, principalmente pela linda folhagem e os frutos servem de alimentação para a fauna e também são utilizados pelo homem, para consumo *in natura* e na forma de iguarias regionais como doces e geleias (FRAZON *et al.*, 2009; SILVA JÚNIOR, 2005).

Algumas espécies nativas de araçá também vêm despertando a atenção da indústria farmacêutica, pois as frutas são ricas em vitaminas, como a vitamina C, e em substâncias antioxidantes, entre outras, como óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta (FRAZON *et al.*, 2009).

O óleo essencial de *Psidium myrsinites* apresentou atividade antimicrobiana, no screening bacteriano, e os fungos também apresentaram sensibilidade ao óleo. Em associação a gentamicina e neomicina o óleo promoveu o aumento da atividade desses antibióticos (PEREIRA, 2010).

Outras espécies de *Psidium* apresentaram diversas outras atividades biológicas e farmacológicas, como a espécie *Psidium guajava* que apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva (DUTTA e DIAS, 2010; OJEWOLE 2006)



Figura 05: Foto da espécie *Psidium sp.* **Fonte:** <http://www.flickr.com/groups/myrtaceae/pool/page3>

Na medicina popular, as espécies de *Psidium* são utilizadas para cicatrização, devido a suas propriedades adstringentes e contra a diarreia (SOUZA *et al.*, 2004; SOUZA e FELFILI, 2006), porém, existem poucos estudos relatando suas atividades biológicas e sua composição química, o que motivou a busca por novas descobertas a respeito desse gênero, visto que em outras espécies do mesmo gênero e família foram relatadas significativas atividades antiinflamatória e antinociceptiva, como relatado anteriormente.

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *Psidium sp.* (OEP) em diferentes modelos animais, assim como estabelecer a DL50.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito antiinflamatório tópico do óleo essencial de *Psidium sp.* em modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton (modelo agudo e crônico), ácido araquidônico, fenol, capsaicina e histamina, bem como elucidar os possíveis mecanismos de ação.
- Estudar o possível efeito antinociceptivo nos modelos de contorções abdominais por ácido acético, teste de formalina, nocicepção por capsaicina e placa quente;
- Estabelecer a DL50 para a padronização das doses terapêuticas a serem utilizadas;
- Analisar a composição química óleo essencial das folhas de *Psidium sp.* para melhor elucidação dos seus possíveis efeitos antiinflamatório e antinociceptivo.

3. Material e Métodos

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material botânico:

As folhas frescas de *Psidium sp.* utilizadas para a obtenção do óleo essencial foram coletadas no Sítio Barreiro Grande, na cidade de Crato, Ceará, no mês de Junho/2011, às 8 horas. Foi feita uma exsicata da planta, sendo identificada pela Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri, sob número de registro de 8200.

3.1.2. Obtenção do óleo essencial de *Psidium sp.*:

As folhas frescas de *Psidium sp.* (523g) foram colocadas, separadamente, em balão de vidro de 5 L, acrescida de 3 L de água destilada e aquecida à destilação por 2 horas, em equipamento tipo Clevenger (Figura 5 e 6A). Em seguida, a mistura água/óleo obtida foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada, o óleo obtido foi mantido em refrigeração até o momento das análises (Figura 6B).

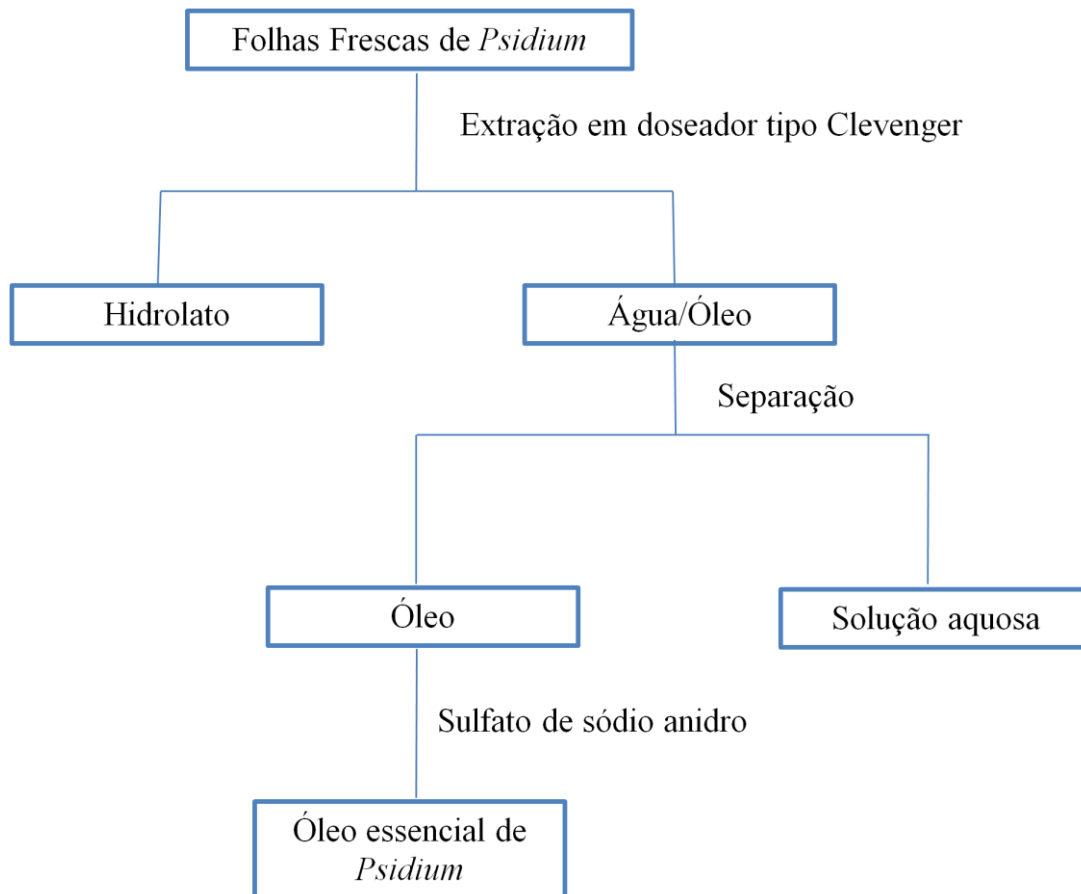
3.1.3. Análise química do óleo essencial:

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM Shimadzu, modelo QP5050A) e provido de uma coluna capilar DB-5HT de sílica fundida com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme 0,25 µm, tendo o hélio como gás de arraste e fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura do detector (ou interface) foi 200 °C. A temperatura da coluna foi programada de 35 °C para 180 °C em 4 °C/min e em seguida 180 °C para 250 °C em 10 °C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450 *m/z*.

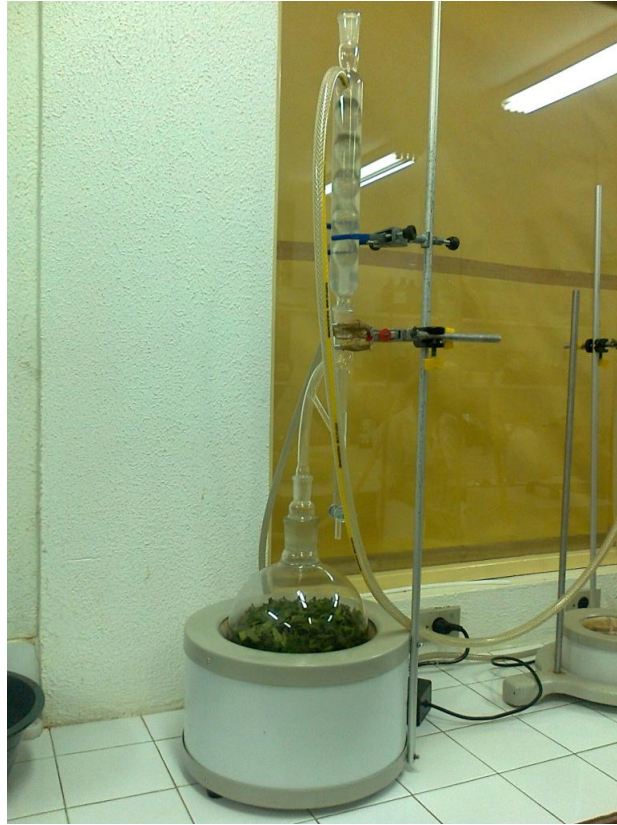
Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, com energia de impacto de 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro (Wiley, 229) e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR, CRAVEIRO e MATOS, 1984; ALENCAR *et al.*, 1990), bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN, ABRAHAMSON e MCLAFFERTY, 1974; ADAMS, 2001).

3.1.4. Aspectos éticos da pesquisa:

A pesquisa está em conformidade com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: *Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - *National Institute of Health*-EUA; Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA; e Lei Federal Nº 9605/1998 (BAZZANO, 2006; MACHADO *et al.*, 2006; BRASIL, 2008). O projeto contendo os protocolos referentes a este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais da Universidade Regional do Cariri (URCA).



Esquema 1: Fluxograma do método de extração do óleo essencial das folhas de *Psidium sp.*



(A)



(B)

Figura 06: (A) Equipamento tipo Clevenger utilizado para a obtenção do óleo essencial. (B) Óleo essencial das folhas de *Psidium sp.* pronto. **Fonte:** Autora.

3.1.5. Reagentes e Drogas:

As drogas e reagentes utilizados nos ensaios farmacológicos encontram-se na tabela 1, estando correlacionados com suas respectivas origens.

Substância	Origem
Acetona P.A. (propan-2-ona)	Dinâmica, Brasil
Ácido araquidônico	Sigma, USA
Capsaicina	Sigma, USA
Carragenina	Sigma, USA
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec, Brasil
Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®)	Syntec, Brasil
Dexametasona (Decadron®)	Ache, Brasil
Diclofenaco	Flor de Juá, Brasil
Fenol 99%	Sigma-Aldrich, USA
Formalina	Fluka, Alemanha
Histamina	Sigma, USA
Indometacina (Indocid®)	Merck Sharp & Dohme, Brasil
Morfina	Cristália, Brasil
Naloxona	Cristália, Brasil
Óleo de croton	Sigma, USA
Solução fisiológica NaCl 0,9%	FARMACE, Brasil
Tween 80	Sigma-Aldrich, USA

Tabela 01: Drogas e reagentes utilizados nos ensaios farmacológicos e suas respectivas origens.

3.1.6. Material e equipamentos utilizados:

- Analgesímetro Hot Plate (Insight®)
- Balança analítica de precisão (Metler Toledo AB204)
- Caixas de observação de vidro
- Cânulas de gavagem para camundongos
- Cronômetros digitais (LivStar)
- Estufa de secagem e esterilização
- Extrator de Clevenger
- Hidropletismógrafo
- Materiais de biossegurança
- Material cirúrgico
- Paquímetro digital (Jomarca, Ref. N° 205509)

- Perfurador de couro (circunferência de 6 mm Ø)
- Pipetas automáticas (Maxipette)
- Pletismômetro (Insight®)
- Ponteiras grandes e pequenas
- Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)
- Tubos Eppendorffs
- Vidrarias gerais

3.1.7. Animais:

Nos ensaios foram utilizadas duas espécies de roedores: camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), com massa corpórea entre 25-35 g e ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) albinos, com massa corpórea entre 200-300 g, fêmeas, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados no Biotério Experimental da URCA, em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios (CARDOSO, 1998-2001) e bioéticas (BAZZANO, 2006). Os mesmos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre 23 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Dose letal média (DL₅₀)

A DL₅₀ do OEP foi realizada a partir método estabelecido pela OECD, 2008, definido através do número de ocorrência de mortes, calculadas com auxílio do programa LC₅₀ Modem System.

3.2.2. Avaliação da atividade antiinflamatória tópica através de modelos de edema de orelha:

3.2.2.1. Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

O óleo de cróton possui como constituinte ativo o TPA, responsável pela indução da inflamação tópica semelhante a muitas doenças de pele, como na psoríase. A aplicação dessa substância induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, como aminas vasoativas (histamina e serotonina) e derivados do ácido araquidônico (LAPA, 2008).

Para avaliar a atividade do OEP, foram utilizados grupos de camundongos *Swiss* ($n = 6$) que tiveram suas orelhas direitas tratadas, topicamente, com 20 μL de salina, dexametasona 4 mg/mL (0,08 mg/orelha) ou o OEP (100 e 200 mg/mL) esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 μL de óleo de croton 5% (v/v) em acetona foram aplicados topicamente na orelha direita e 20 μL do veículo acetona na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados por guilhotina, e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas através de um *punch* (perfurador de couro metálico) para avaliação do edema (TUBARO, 1985). Abaixo encontra-se uma tabela (Tabela 2) demonstrando o esquema de aplicação nas orelhas e divisão dos grupos.

Grupo	Tratamento
Grupo 1:	(aplicação tópica da salina na orelha direita + agente flogístico)
Grupo 2:	(aplicação tópica da dexametasona 4mg/ml na orelha direita + agente flogístico)
Grupo 3:	(aplicação tópica do OEP 100mg/kg na orelha direita + agente flogístico)
Grupo 4:	(aplicação tópica do OEP 200mg/kg na orelha direita + agente flogístico)

Tabela 02: Esquematização da divisão dos grupos e aplicação das substâncias nos modelos de edema de ore

3.2.2.2. *Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton*

Objetivando avaliar o efeito antiinflamatório do OEP num processo inflamatório já estabelecido, foi utilizado o modelo de edema de orelha crônico, através da aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μ L de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona em dias alternados, durante 9 dias, em camundongos *Swiss* (n = 6/grupo). O OEP puro (13 mg/orelha), OEP 200mg/mL e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) foram aplicados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) a partir do 5º dia do experimento, sendo o edema avaliado diariamente através de medição da espessura da orelha direita. No 9º dia do experimento, os animais foram sacrificados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (STANLEY *et al.*, 1991).

3.2.2.3. *Edema de orelha induzido pela aplicação de N-vanililnonanamida (capsaicina)*

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida) constitui o princípio ativo da pimenta, sendo responsável pela indução da resposta inflamatória neurogênica e sensibilização nociceptiva (HOLZER, 1991). Na avaliação da atividade tópica do OEP nesse modelo, as orelhas direitas de camundongos *Swiss* (n = 6 / grupo) foram tratadas, topicamente, com 20 μ L de salina, dexametasona 4 mg/mL, ou o OEP (200mg/mL), esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 μ L de N-vanililnonanamida (capsaicina) 0,01 mg/ μ L diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 μ L do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Ainda topicamente, foram aplicados 20 μ L de capsazepina, e em outro grupo foi aplicado a capsazepina e após 15 minutos o OEPM para observar se o óleo conseguiria potencializar o efeito da capsazepina. Após 30 minutos (pico máximo de formação de edema), os animais foram anestesiados e sacrificados por guilhotina e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema (GÁBOR & RAZGA, 1992).

3.2.2.4. Edema de orelha induzido pela aplicação de ácido araquidônico

O ácido araquidônico (AA), assim como seu metabólitos, estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias da pele, como verificada na dermatite atópica e psoríase (GABOR, 2000). O AA é metabolizado em vários mediadores que promovem a formação do edema, como o leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (HUMES *et al.*, 1986). Para avaliar a atividade tópica do OEP neste modelo, as orelhas direitas dos camundongos Swiss (n = 6 / grupo) foram tratadas, topicamente, com 20 µL de solução salina (controle negativo); dexametasona 4 mg/mL (controle positivo), ou o OEP (200mg/mL), esperando 15 minutos para absorção. Também foi feito um grupo para testar o efeito potencializador do óleo, onde houve o tratamento com o OEP associado a indometacina. Em seguida, 20 µL de ácido araquidônico 0,1 mg/µL diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram sacrificados por guilhotina e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987).

3.2.2.5. Edema de orelha induzido pela aplicação de fenol

Esse modelo animal, a aplicação tópica do fenol provoca uma inflamação cutânea semelhante à dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM *et al.*, 2004). Nessa avaliação, as orelhas direitas dos camundongos Swiss (n = 6 / grupo) foram pré-tratadas, topicamente, com 20 µL de solução salina, dexametasona 4 mg/mL, OEP (200mg/mL), esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de fenol 10% (v/v) diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram anestesiados e sacrificados por guilhotina e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para análise do edema (GÁBOR, 2000).

3.2.2.6. Edema de orelha induzido pela aplicação de histamina

Este modelo visa à avaliação do efeito do óleo essencial na reação de hipersensibilidade imediata. Inicialmente, cada animal (n = 6 / grupo) foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). Em seguida, os animais foram pré-tratados topicamente com 20 µL de salina, ou dexametasona 4mg/mL (0,08 mg/orelha), fenegan (25mg/mL) ou OEPM (200mg/mL). Também foi feito um grupo para testar o efeito potencializador do óleo, onde houve o tratamento com o OEP associado ao fenegan. Após 30 minutos, foi administrado intradermicamente um volume de 5 µL de uma solução de histamina (100 mg/mL de salina), na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica 29 G, enquanto que a orelha esquerda recebeu o mesmo volume de salina, também intradermicamente (Sham). Após 2 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados por guilhotina e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema (BRAND *et al*, 2002).

3.2.3. Avaliação da atividade antinociceptiva

3.2.3.1. Teste da placa quente ou “Hot-plate”

A colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50°C determinou uma resposta característica, na qual o animal pulou ou lambeu uma das patas. Neste teste, os animais foram colocados individualmente numa placa quente de temperatura constante 55±0,5°C. Após a obtenção do valor basal os camundongos foram tratados, por via oral, com veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.), com o OEPM nas concentrações de 100 e 200mg/kg v.o. ou morfina (7,5 mg/kg i.p.; controle positivo). O papel do sistema opióide na antinocicepção do óleo essencial de *P. myrsinites* foi determinado pela administração subcutânea (s.c.) de naloxona (1mg/kg), 15 minutos antes do tratamento com o OEP (100mg/kg, v.o.) e morfina (7,5mg/kg, i.p.).

A resposta foi novamente avaliada decorridos 30, 60 e 90 min da administração das drogas (Tabela 3). O tempo máximo de contato do animal com a placa quente foi mantido em 30 s (tempo de corte) para evitar lesões nas patas (LAPA *et al*, 2008).

-1 h	0 h	30 min	60 min	90 min
Tempo basal do animal na placa quente	Administração da salina, mofina e substâncias testes	Tempo que o animal permaneceu na placa quente após administração das substâncias	Tempo que o animal permaneceu na placa quente após administração das substâncias	Tempo que o animal permaneceu na placa quente após administração das substâncias

Tabela 03: Esquematização da administração das substâncias e da avaliação do tempo que o animal permaneceu na placa quente.

3.2.3.2. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os animais foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.), OEP (100 e 200mg/kg; v.o) ou diclofenaco (10mg/Kg; v.o) e, para observar o efeito potencializador do óleo, foi feito um grupo onde houve a administração do OEP associado ao diclofenaco 1 hora antes da administração intraperitoneal (i.p) de ácido acético 0,6% (10mL/Kg). Após a administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado, para cada animal, durante um período de 30 minutos (KOSTER; ANDERSON; DE BEER, 1959).

Uma contorção sendo identificada como uma contorção do corpo inteiro e/ou alongamento dos membros posteriores, com o movimento do abdômen tocando a superfície do solo (Figura 7).

3.2.3.3. *Teste da Formalina*

Os animais, divididos em grupos, foram tratados com o OEP (100 e 200mg/kg, v.o.), veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.) 60 minutos e morfina (7,5mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subplantar (s.pl.), na pata direita traseira, de formalina 2,5% (20µL/pata). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1º Fase) e de 15-30 min (2º Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

O papel do sistema opióide na antinocicepção do óleo essencial de *Psidium sp.* foi determinado pela administração subcutânea (s.c.) de naloxona (1mg/kg), 15 minutos antes do tratamento com o OEP (100mg/kg, v.o.) e morfina (7,5mg/kg, i.p.).

3.2.3.4. *Teste da nocicepção induzida por capsaicina*

A possível ação analgésica do óleo essencial da planta pôde também ser testada na dor neurogênica causada pela capsaicina, que envolve uma modulação predominantemente taquicininérgica (LAPA *et al.*, 2008).

Os camundongos divididos em grupos de seis animais, receberam pré-tratamento com o OEP, nas doses de 100 e 200mg/kg (v.o.), veículo (Tween 80 em solução salina, 10 mL/kg, v.o.) 1 hora e morfina (6 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subplantar, na pata direita traseira, de capsaicina (1,6 µg/pata). Registrou-se, então, durante 5 minutos, o período que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada, medida esta indicativa de dor (SANTOS *et al.*, 2003).

O papel do sistema opióide foi determinado pela administração de naloxona (1mg/kg, s.c.) 20 minutos antes da administração do óleo essencial (100mg/kg, v.o.) e da morfina (6 mg/kg, i.p.).

4. Resultados e Discussões

4.1. Análise química do óleo essencial

O óleo essencial obtido por hidrodestilação apresentou rendimento de 1,38% (p/v). O estudo da composição química do OELS foi realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e os componentes foram identificados através de comparação dos seus espectros de massas e tempo de retenção (TR) com os existentes na literatura (ADAMS, 2001). Dessa forma, foi possível a identificação de 99,81% dos constituintes (Figura 07, p. 45), sendo o p-cineol (24,68%) e o β -eudesmol (27,09%) os majoritários (Tabela 4).

Componentes	(%)	TR (min)
α -pineno	11,35	3,17
β -pineno	8,35	3,59
p-cineol	24,68	4,15
α -terpineol	3,30	6,19
α -elemol	11,78	11,03
guaíol	9,13	12,12
α -cadinol	4,13	12,20
β -eudesmol	27,09	12,39
TOTAL	99,81	

Tabela 04: Composição química (%) do óleo essencial de *Psidium sp.* TR: Tempo de retenção

O p-cineol é um óxido monoterpênico cíclico, com odor semelhante a cânfora e incolor (VITTI e BRITO, 2003). Geralmente, os monoterpênicos são utilizados no tratamento de doenças obstrutivas crônicas (JUERGENS et al., 1998), utilizado também no tratamento dos sintomas das doenças das vias aéreas quando intensificados por infecção, afecções como pneumonia e asma (ZANKER et al., 1980). Espécies da família Myrtaceae, como a *Eucalyptus glóbulus* e *Psidium sbraleanum*, também possui como constituinte majoritário o p-cineol (FEITOSA, 2012; PEREIRA, 2010). Este composto é responsável por diversas atividades, dentre elas é usado no tratamento de infecções de

pele (HAMMER, CARSON e RILEY, 2002; TAKAHASHI, KOKUBO e SAKAINO, 2004; SALARI et al., 2006; CERMELLI et al., 2008).

O β -eudesmol é um sesquiterpeno encontrado em folhas de *Eucalyptus maculata*, pertencente à família Myrtaceae (MARSARO et al., 2004). Os sesquiterpenos são compostos muito voláteis, obtidos, normalmente, a partir de flores e folhas de plantas, funcionando como isca para atrair polinizadores (PARE e TUMLINSON, 1999; SCHNEE et al., 2002). O β -eudesmol também é conhecido por ter vários efeitos benéficos sobre a saúde humana, utilizado no tratamento de convulsões e demência (CHIOU et al., 1997).

Outros estudos com espécies do gênero *Psidium* como *Psidium friedrichsthalianum*, *Psidium salutare*, *Psidium caudatum*, *Psidium pohlianum*, *P. guyanensis* e *P. aff aerugineum*, apresentaram compostos como: δ -cadineno, α -pineno, (E)- β -cariofileno, α -terpineol, β -pineno, 1,8-cineol, mirceno, limoneno, terpinen-4-ol, β -pineno, ρ -cymene, α -humuleno, linalol, γ -eudesmol e β -eudesmol (apud PEREIRA 2010), onde alguns desses compostos também estão presentes no óleo essencial de *Psidium sp.*

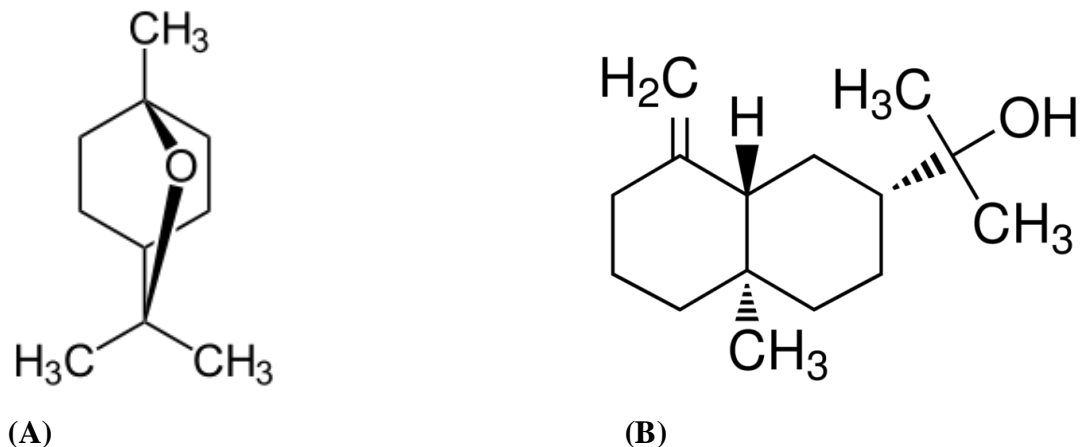


Figura 07. Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de *Psidium myrsinites*. (A) Estrutura do p-cineol e (B) β -eudesmol. **Fonte:** <http://www.sigmaaldrich.com>

4.2.Dose letal média (DL₅₀)

Os resultados dos ensaios para a obtenção da DL₅₀ demonstraram que o óleo essencial de *Psidium sp.* apresenta uma baixa toxicidade quando administrado por via oral, de acordo com o protocolo estabelecido pela OECD 2008. Os animais tratados com o OEP não apresentaram sintomas de toxicidade aguda, como mortes, estado de depressão, excitação, convulsão, salivação, piloereção, lacrimejamento e anormalidades quanto a defecação e efeitos sobre respiração e locomoção mesmo na dose de 2000 mg/kg, considerada elevada para via oral (ZANETTI et al., 2003).

Os resultados obtidos caracterizam o OEP como pouco tóxico, quando diluído, segundo LARINI, que classifica os agentes tóxicos via oral como extremamente tóxicos (DL₅₀ igual ou inferior a 25 mg/kg), altamente tóxicos (DL₅₀ entre 100 e 500 mg/kg), mediantemente tóxicos (DL₅₀ entre 500 e 2000 mg/kg) e pouco tóxicos (DL₅₀ acima de 2000 mg/kg).Desse modo, optou-se por utilizar concentrações menores que 10% da DL₅₀ do OEP para composição das doses usadas nos ensaios *in vivo*, sendo 100 e 200mg/kg, respectivamente, as doses utilizadas para os testes.

4.3.Avaliação da atividade antiinflamatória tópica do óleo essencial de *Psidium sp.* (OEP) em modelos de inflamação cutânea.

4.3.1.Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.

A figura 8 mostra que após 6 horas da aplicação tópica do óleo de cróton, as orelhas dos animais apresentaram um aumento significativo da espessura. O percentual de edema (PE) nos grupos tratados com o OEP puro (20 µL/orelha) e na concentração de 100mg/mL (2 mg/orelha) não apresentaram redução significativa do edema (PE: 116,0 ± 9,3% e 116,9 ± 7,9%, respectivamente) quando comparados ao grupo tratado apenas com salina (controle negativo), onde apresentaram intenso edema (PE: 133,9 ± 3,3%). Porém os grupos tratados com o OEP na concentração de 200mg/mL (4mg/orelha) e o controle positivo, com a aplicação do glicocorticóide dexametasona (0,08mg/orelha), foram capazes de reduzir significativamente o edema (PE: 95,23 ± 6,01% e 64,4 ± 3,5%, respectivamente) quando comparados ao grupo controle negativo

($P < 0,01$). Nas orelhas esquerdas, a aplicação do veículo acetona, por sua vez, não foi capaz de induzir a formação do edema.

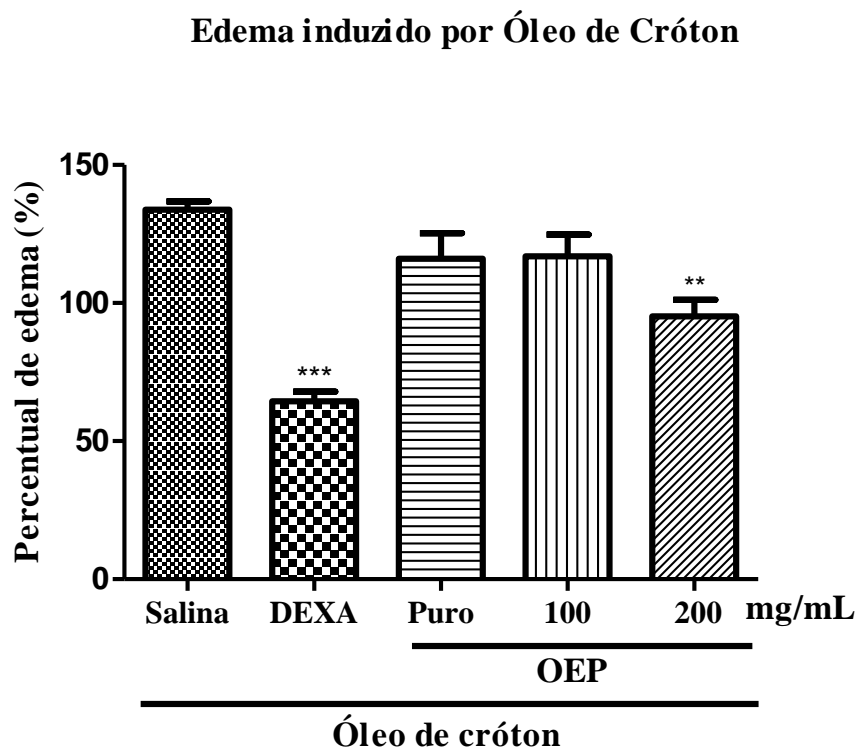


Figura 08. Efeito do OEP, aplicado topicamente, sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton em camundongos. As orelhas direitas dos camundongos foram tratadas previamente com salina (0,9%), dexametasona (0,08mg/orelha), OEP puro ou nas concentrações de 100 e 200mg/mL (2 e 4mg/orelha, respectivamente). Após 1 hora foi administrado topicamente o óleo de cróton a 5% (v/v) em acetona. Decorridas 6 horas da administração do óleo de cróton foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro das orelhas para posterior cálculo do edema e avaliação do efeito antiedematogênico das substâncias. A figura representa a média do edema (%) em cada grupo e as barras verticais o E.P.M. Os grupos foram comparados ao grupo Salina, considerando um $P < 0,05$ (** $P < 0,01$ em relação ao grupo salina. Análise estatística: ANOVA e Teste de Student- Newman- Keuls).

O óleo de cróton é extraído da planta *Croton tiglum*, e possui como princípios irritantes ésteres de forbol, destacando-se como majoritário o TPA, do inglês 12-o-tetradecanoilphorbol-13-acetate, sendo o mesmo utilizado em modelos empregados para avaliar a resposta inflamatória, uma vez que esse agente flogístico induz inflamação cutânea e hiperproliferação celular, assemelhando-se a doenças de pele, como a psoríase (GÁBOR, 2000).

O mecanismo preciso pelo qual o TPA exerce seu efeito inflamatório é decorrente da ativação da PKC, bem como da ativação sequencial da via da MAP quinase, fosfolipase A2 (PLA2), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez leva à síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006; DE BERNARDIS *et al.*, 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC, promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B e a AP-1, os quais têm um papel central na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 e iNOS, e moléculas de adesão (PASCUAL e GLASS, 2006; GLASS e OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2001; SANCHEZ & MORENO, 1999). Enquanto a fosforilação da PLA2 pela PKC resulta na liberação do AA seguida da produção de PG e LT via COX e LOX, respectivamente (WANG *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 1984). O TPA também parece induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos da pele, desencadeando o processo inflamatório (WILMER *et al.*, 1994; REDONDO *et al.*, 1997). Fármacos inibidores das COX e 5-LOX, antagonistas de LTB₄, inibidores seletivos de iNOS e corticosteroides podem demonstrar ação anti-inflamatória tópica, com redução significativa do edema em modelos animais de inflamação cutânea induzido por óleo de cróton ou TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2009).

A espécie *Eucalyptus globulus* pertence à família Myrtaceae, é considerada eficaz no tratamento de inflamações pulmonares e da excessiva mucosidade (ROCHA e SANTOS, 2007). O uso do óleo essencial obtido a partir das suas folhas apresenta importância farmacêutica, sendo propostas inúmeras aplicações medicinais, incluindo atividade anti-inflamatória, analgésica (SILVA *et al.*, 2003) e antioxidante (CRUZ *et al.*, 2005). Essas atividades podem estar relacionadas ao seu composto majoritário o p-cineol, onde DEWHIRST, 1980, demonstrou em seu trabalho que o p-cineol é um antiinflamatório geral, como esse composto também é um dos majoritários do OEP, a atividade antiedematogênica desse óleo pode estar relacionada à presença dessa substância, assim como do β -eudesmol, pois o óleo essencial de *Eucalyptus cuba*, que também possui o p-cineol e o β -eudesmol em sua composição é utilizado por sua ação

analgésica, antiinflamatória e antipirética, para os sintomas de infecções respiratórias, tal como resfriados (JÚNIOR et al., 2006)

4.3.2. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

A figura 9 demonstra que a aplicação do OEP puro (20 µL/orelha, 2 vezes ao dia, durante 5 dias) nas orelhas direitas dos camundongos após um processo inflamatório já estabelecido, causou um significativo edema (Figura 09), mesmo quando comparado ao grupo controle negativo (salina 0,9%), após cinco dias (96 horas) da aplicação com o óleo de cróton a 5% (v/v) em acetona, onde o mesmo causou necrose das orelhas tratadas nesses grupos. Porém o OEP na concentração de 200 mg/mL (4mg/orelha, 2 vezes ao dia, durante 5 dias) mostrou uma efetiva redução do edema, quando comparado ao grupo salina e ao grupo do OEP puro, após 24 horas da aplicação do mesmo, persistindo o efeito até o último dia de tratamento ($P < 0,01$). A dexametasona (0,08 mg/orelha, 2 vezes ao dia, durante 5 dias) diminuiu significativamente o edema após 24 horas da aplicação da mesma, persistindo o efeito até o último dia de tratamento ($P < 0,001$). Os resultados foram confirmados pela análise do percentual de edema (PE) e pelo efeito inibitório médio (EIM), feitos no último dia do experimento (Figura 10).

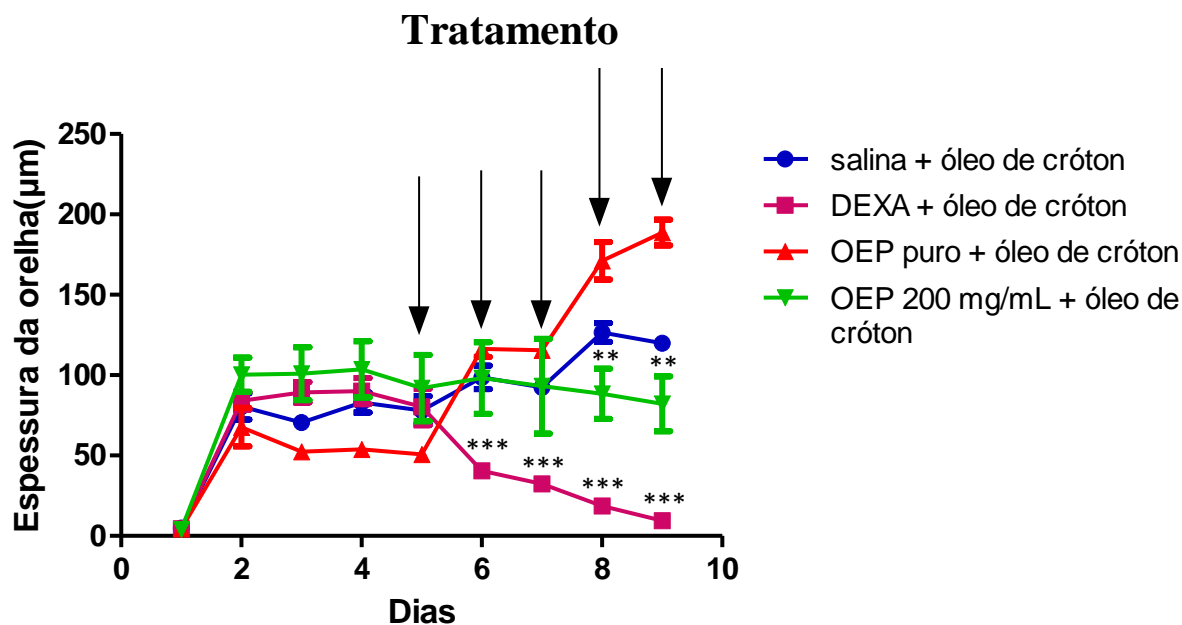


Figura 09. Curva tempo-resposta do efeito do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos. Os animais receberam óleo de cróton em acetona na orelha direita em dias alternados e veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha desafiada com o agente flogístico foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX), OEP bruto ou OEPM 200mg/mL (20 µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os dias posteriores (setas apontam os dias em que houve tratamento). O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

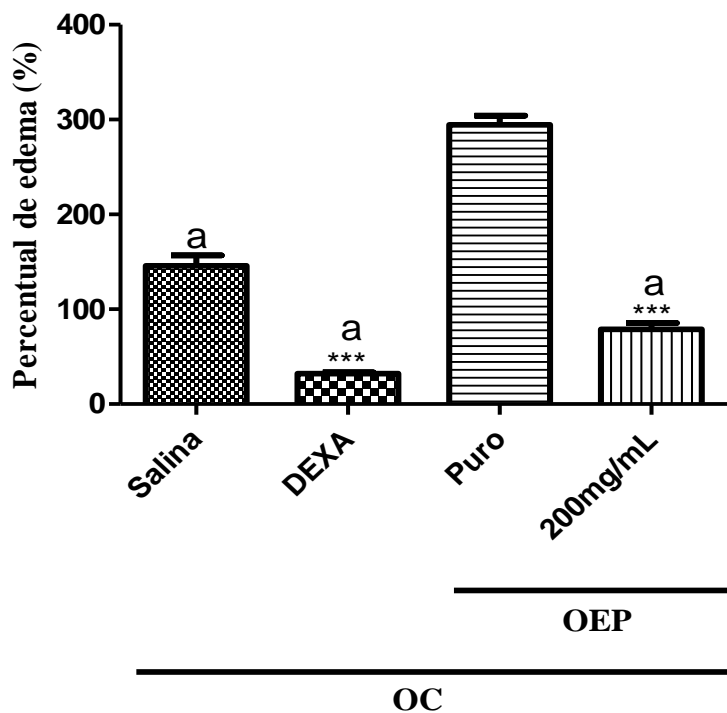


Figura 10. Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos. A aplicação do OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º e 8º dias do experimento, a orelha dos animais recebeu salina (controle negativo), dexametasona (DEX), OEPM bruto ou OEP 200mg/mL (20 µL, 2 vezes ao dia). O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 192 horas (9 dias) da primeira aplicação do OC. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (***) $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, a = $P < 0,001$ comparadas ao OEPM puro. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

A aplicação única de óleo de cróton atua fornecendo dados quanto à atividade antiedematogênica de uma substância num processo inflamatório agudo, a aplicação múltipla de óleo de cróton, em dias alternados, promove a avaliação da atividade antiedematogênica num processo inflamatório já estabelecido, com características semelhantes a uma inflamação crônica (SARAIVA, 2009).

De acordo com as figuras 9 e 10 o OEP quando aplicado puro, tanto no modelo agudo quanto no crônico, não foi capaz de inibir ou reduzir o processo inflamatório, sendo que no segundo modelo, o percentual de edema das orelhas tratadas a partir do quinto dia com o OEP puro foi maior que as orelhas tratadas apenas com salina,

promovendo o aumento da espessura das orelhas após 48 horas do início do tratamento. O mesmo efeito foi observado por VERAS 2011, onde o óleo essencial de *Lippia sidoides* e seu composto majoritário Timol aumentaram consideravelmente o percentual de edema nos animais tratados com os mesmos. Porém nos animais tratados com o OEPM diluído na concentração de 200mg/mL o edema foi reduzido significativamente a partir de 48 horas após o início do tratamento com o óleo essencial, demonstrando um possível efeito antiedematogênico do óleo essencial diluído. Dessa forma, estudos realizados com modelo de inflamação em ratos, utilizando diversas concentrações do p-cineol apresentou uma inibição do processo inflamatório, além de sua ação gastroprotetora (SANTOS e RAO, 2000).

BOSCARDIN, 2012, em seu trabalho observou que o α -pineno, composto presente no OEP, apresentou significativa atividade antiedematogênica frente ao modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, nos dando subsídios para afirmar que, além do p-cineol e do β -eudesmol, o α -pineno também pode ser um dos responsáveis pelo efeito do OEP.

Uma vez que o OEPM na concentração de 200mg/mL foi capaz de reduzir o edema causado pela aplicação do óleo de cróton, o próximo passo foi verificar o possível mecanismo pelo qual o óleo estava agindo.

4.3.3. Edema de orelha induzido por N-vanililnonanamida (capsaicina)

O OEP na concentração de 200mg/mL foi capaz de reduzir significativamente o edema de orelha (PE: 81,81%) após 30 minutos da aplicação tópica de N-vanililnonanamida ($p < 0,01$), comparado com o grupo onde houve apenas a aplicação da solução salina (controle negativo) (PE: 116,8%). O grupo tratado com dexametasona apresentou uma redução significativa (PE: 49,64%) comparada com o controle negativo ($p < 0,001$). No grupo tratado com o óleo essencial em associação a capsazepina, reduziu significativamente o edema (PE: 17,89) causado pelo N-vanililnonanamida quando comparado ao grupo onde houve apenas a aplicação do OEP ou da capsazepina (PE: 26,63) separadamente (Figura 11).

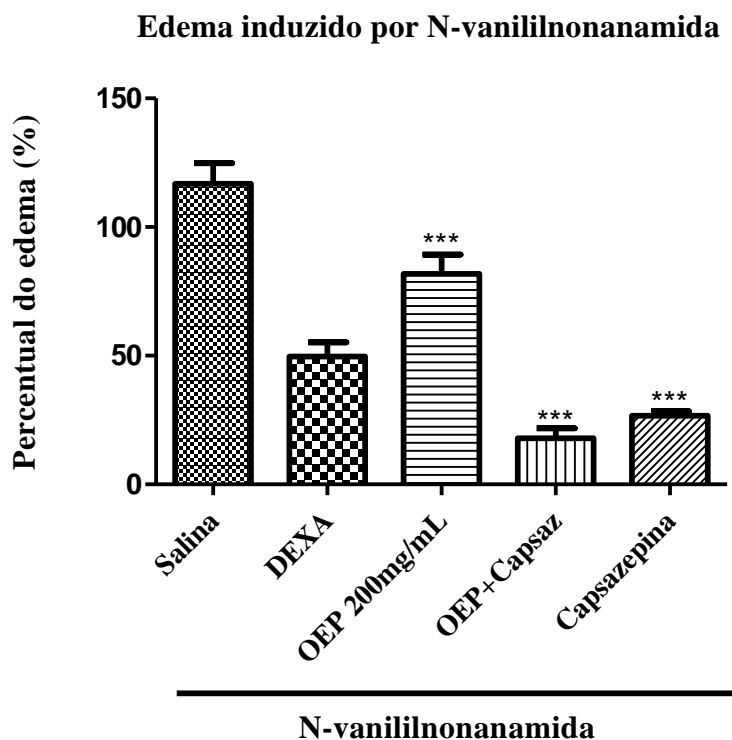


Figura 11. Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por N-vanililnonanamida em camundongos. Os animais foram pré-tratados com salina (controle negativo), dexametasona (DEXA) 0,08 mg/orelha, OEP 200mg/mL, OEPM+capsazepina e capsazepina. Após 15 minutos, receberam N-vanililnonanamida topicamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em etanol 90%. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 30 minutos de aplicação da capsaicina. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (salina) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$ comparadas ao controle negativo, *** $P < 0,001$). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student- Newman-Keuls).

A capsaicina, desde muito tempo, tem sido descrita por muitos pesquisadores como sendo um agente capaz de induzir a inflamação em modelos animais, tem como princípio ativo a N-vanililnonanamida. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é um alcaloide irritante presente em plantas do gênero *Capsicum* (pimentas) e é responsável pelo sabor picante dos frutos dessas espécies (GABÓR, 2000). Quando ela é aplicada topicamente, é possível observar uma resposta inflamatória neurogênica imediata, cujo pico máximo da ação da capsaicina é atingido em até 30 minutos após a aplicação da mesma, caracterizada por extravasamento plasmático e consequente formação de edema. O efeito da capsaicina dar-se através da sua ligação aos receptores específicos TRPV1, também localizados em fibras aferentes primárias do tipo C e parte das fibras do tipo A δ , produzindo resposta rápida através da liberação de neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), taquicinas e as monoaminas como a histamina e a serotonina (BOUCLIER *et al.*, 1990; GÁBOR & RAZGA, 1992).

Estudos comprovaram que o edema induzido pela aplicação tópica da capsaicina é inibido por antagonistas da histamina e serotonina, mas não por inibidores da COX, como a indometacina (GABÓR, 2000). Além do mais, bloqueadores dos canais de Ca²⁺ e o vermelho de rutênio e a capsazepina (inibidores da capsaicina) também demonstram ação antiedematogênica no modelo induzido por capsaicina, mas não no modelo induzido por AA (INOUE *et al.*, 1993). O OEP inibiu de forma significativa a formação do edema, dessa forma, os compostos presentes nesse óleo parecem agir diretamente nos receptores nos quais a capsaicina exerce seu efeito, os receptores TRPV1, assim como na inibição de algumas aminas como a histamina e serotonina.

4.3.4. Edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico

O OEP diluído na concentração de 200mg/mL aplicado topicamente demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha (PE: 116,1 \pm 13,22%) após 1 hora em contato com ácido araquidônico, comparada com o grupo tratado com salina (PE: 150,0 \pm 16,20%). A indometacina, aplicada topicamente, demonstrou redução

significativa comparada com o controle negativo (PE: $40,97 \pm 7,595\%$). O grupo onde houve a associação do OEP com a indometacina apresentou uma redução significativa do edema (PE: $28,53 \pm 5,073\%$) quando comparado com o controle negativo e com o grupo tratado apenas com o OEP, porém não apresentou significância quando comparado com o grupo tratado apenas com o fármaco (Figura 12).

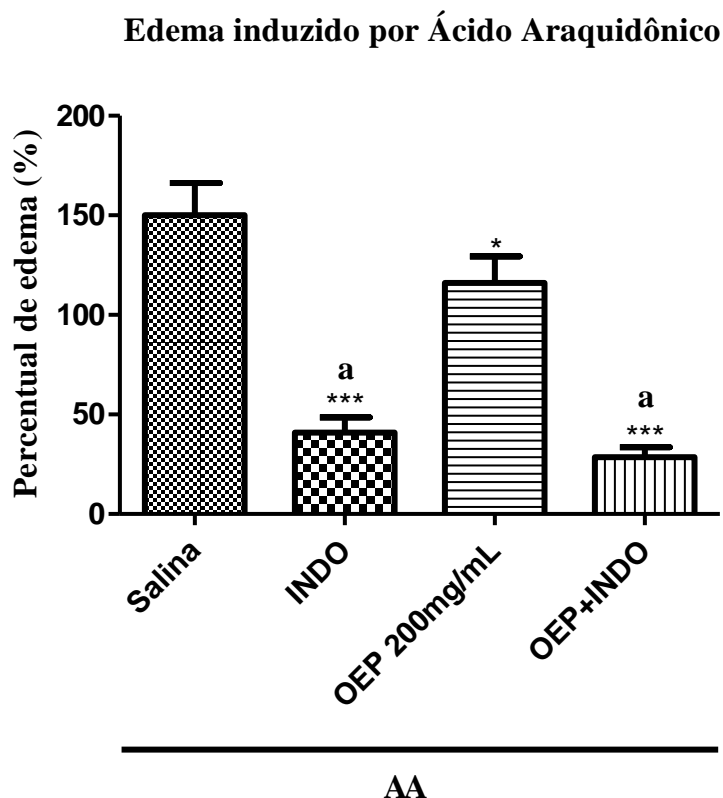


Figura 12. Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos. Os animais foram pré-tratados com salina, indometacina (INDO), OFCC 200mg/mL e OEP associado a indometacina. Após 15 minutos, receberam topicamente ácido araquidônico (AA) $0,1 \mu\text{g/mL}$ em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 1 hora de aplicação do AA. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E.P.M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (salina) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo. **a** $< 0,001$ comparadas com o grupo tratado apenas com o OEP. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student- Newman-Keuls).

O AA é o precursor de eicosanoides inflamatórios, tais como a PGE2, LTB4, LTC4 e LTD4 que induzem a vasodilatação, quimiotaxia (principalmente pelos leucotrienos), aderência leucocitária, agregação plaquetária, edema, dor e febre (IVERSEN & KRAGBALLE, 2000; MARCHIONNI *et al.*, 2006). A PGE2 é um potente vasodilatador e atua de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina (LEE *et al.*, 2003). A aplicação tópica do AA gera uma resposta inflamatória rápida caracterizada por intenso eritema e edema com pequeno acúmulo de neutrófilos (RAUH, 2008). A vasodilatação e a hiperemia provocadas pelo composto foram observadas após 5 minutos, enquanto que o edema pôde ser visualizado após 15 minutos com pico máximo em 60 minutos (BOLLER, 2007).

Os antiinflamatórios não- esteroidais (AINEs) inibem a via da COX, impedindo, portanto a síntese das PGs (RANG *et al.*, 2007). Sendo assim, o fármaco de referência utilizado neste modelo experimental foi a indometacina, um AINE cuja ação antiinflamatória está relacionada com a inibição não-seletiva das isoformas da COX (COX-1 e COX-2) e que reverte ativamente o edema induzido pela aplicação de forma tópica do AA (GABOR, 2000). É importante lembrar que há metabólitos do AA também responsáveis por degranulação dos mastócitos, liberando histamina, podendo afirmar que o modelo de edema induzido por AA não é específico para identificar compostos que inibem exclusivamente a COX ou LOX, pois antagonistas da histamina e antioxidantes também são capazes de reduzir o edema induzido por AA (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY, 1987; BLASZÓ & GÁBOR, 1995). O óleo essencial da espécie *Eucalyptus globulus* foi capaz de reduzir o edema causado induzido pela aplicação de carragenina, um agente inflamatório, que produz inflamação por liberação de prostaglandinas, indicando mais uma vez que o p-cineol possa estar envolvido na atividade antiedematogênica de óleos que possuam esse composto (FARSAM *et al.*, 2000). Estudos relatam que p-cineol foi capaz de inibir a produção de metabólitos do ácido araquidônico, leucotrienos B4 (LTB4) e prostaglandinas (PGE2), em monócitos de pacientes com asma brônquica (JUERGENS *et al.*, 1998).

O OEP promove a redução do edema tanto no modelo da capsaicina quanto no modelo do AA, porém com eficácias diferentes. Dessa forma, podemos concluir que o OEP pode não estar agindo diretamente na inibição das enzimas COX e LOX e sim de

aminas vasoativas como a histamina e a serotonina, que também participam da inflamação desencadeada pelo agente flogístico AA, e nos receptores TRPV1 (YOUNG *et. al.*, 1984; CRUMMEY, 1987; BLASZÓ & GÁBOR, 1995; INOUE *et. al.*, 1993).

Para avaliar essa teoria e para caracterizar melhor as propriedades farmacológicas do *Psidium sp.* foi avaliado o efeito do OEP sobre os modelos de inflamação cutânea com o edema de orelha induzido pelo fenol e pela histamina, que simulam a dermatite de contato irritativa e reações alérgicas, respectivamente (RAUH 2008).

4.3.5. Edema de orelha induzido por Histamina

O OEP aplicado por via tópica apresentou uma redução significativa ($P < 0,001$) no percentual de redução do edema de orelha (PE: $11,86 \pm 1,75\%$) após 2 horas da aplicação intradérmica de solução de histamina comparado ao grupo controle tratado com salina (PE: $55,54 \pm 7,44\%$). A dexametasona (PE: $12,95 \pm 2,72\%$) e o fenergan (PE: $8,80 \pm 1,65\%$) também inibiram significativamente o edema ($P < 0,001$). Também foi feito um grupo onde houve a aplicação do OEP em associação ao fenergan para observação do efeito, havendo uma redução significativa (PE: $2,454 \pm 0,2348$) quando comparado ao grupo controle negativo, conseguindo também, reduzir o edema mais que o fenergan puro (Figura 13).

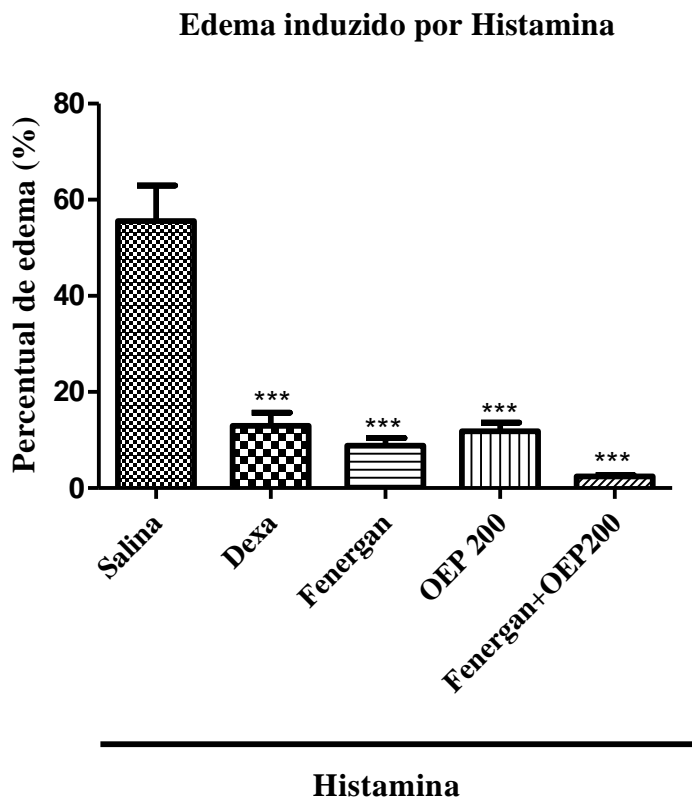


Figura 13. Efeito tóxico do OEP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina em camundongos. Os animais, previamente anestesiados, foram pré-tratados com salina (C), dexametasona (DEXA), fenegan e OEP+fenegan. Após 15 minutos, receberam a aplicação intradérmica na orelha direita uma injeção de 5 μ L de solução de histamina 100 mg/mL. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 2 horas de aplicação da histamina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (***) $P < 0,0001$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

A histamina é uma amina vasoativa liberada por mastócitos ativados pelas proteínas do complemento C3a e C5a e por leucócitos ativados por IgE, sendo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e tem ação vasodilatadora, promovendo uma resposta edematogênica em poucos minutos (RANG *et al.*, 2007; KINDT *et al.*, 2008). Além dessas reações, a histamina é capaz de estimular fibras nervosas sensitivas através de mecanismos H1-dependentes que resulta em prurido. Uma das principais funções fisiopatológicas da histamina é a sua ação como mediador das reações de hipersensibilidade do tipo I, como a urticária (RANG *et al.*, 2007; BRAND *et al.*, 2002).

Sabe-se que um dos mediadores do prurido é a histamina, ou seja, a histamina ativa os nociceptores que por sua vez liberam neuropeptídeos como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), na qual via reflexos axonais, induzem ao aparecimento de edema no local da aplicação. Quando a SP é injetada por via intradérmica em altas concentrações, ocorre a degranulação dos mastócitos causando a sensação desagradável de prurido (HÄNGERMARK, 1978). Com o intuito de diminuir o prurido, antagonistas de receptores H1 e corticosteroides são constantemente usados.

Os efeitos anti alérgicos do p-cineol foram avaliados em reações alérgicas do tipo 1, onde o composto foi capaz de suprimir a liberação de histamina a partir de mastócitos (JUERGENS e STOBER, 1998). Em outro estudo, a administração oral de p-cineol inibiu a anafilaxia cutânea passiva (ACP) em cobaias. Foi demonstrado também que gomas de hortelã enriquecidas com p-cineol foram eficazes na rinite alérgica (ARAKAWA e OSAWA, 2000; ARAKAWA, 1992).

A reação de hipersensibilidade imediata desenvolve-se após a degranulação dos mastócitos e liberação da histamina. A aplicação tópica do OEP inibiu o edema induzido pela histamina, assim como o OEPM administrado em associação ao fenegan inibiu o edema de forma muito significativa ($P < 0,001$), indicando que possa haver um sinergismo do óleo com o fármaco. Sendo assim, o OEP poderia ainda ser útil no alívio de alguns sintomas existentes na hipersensibilidade imediata, como o prurido presente em algumas situações como picadas de insetos, re-exposição de contato com alérgenos, como por exemplo, alguns oriundos de plantas ou até mesmo comida. Porém, para tal

indicação ainda é necessário à realização de experimentos que confirmem sua atividade anti-pruriginosa (RAUH, 2008).

4.3.6. Edema de orelha induzido por Fenol

O OEP 200mg/mL aplicado por via tópica demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha após 1 hora da aplicação tópica de fenol 10% em acetona, comparada com o grupo tratado com salina (controle negativo; PE: 130,6%), sendo o percentual de edema de 100,1% ($P < 0,01$). O grupo tratado com dexametasona também demonstrou redução significativa (PE: 25,12%, $P < 0,01$) comparada com o controle negativo (Figura 14).

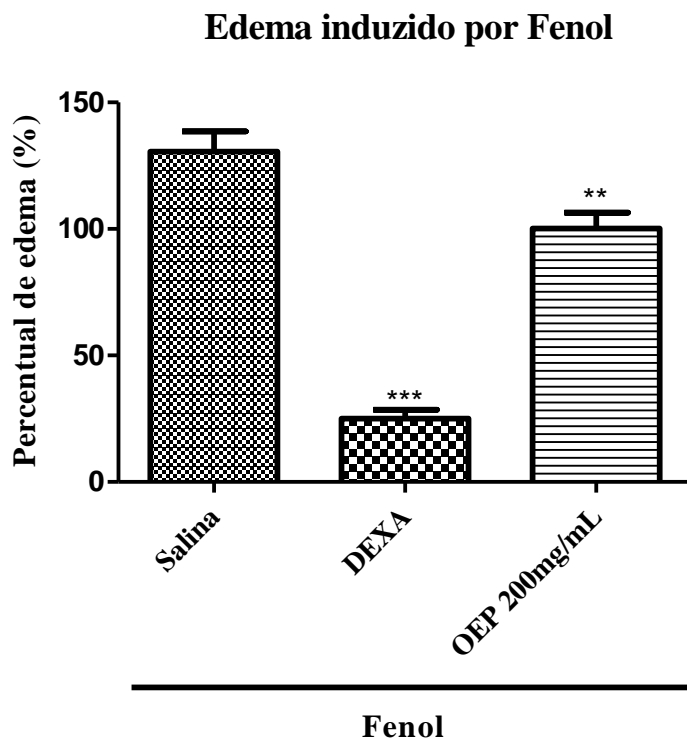


Figura 14. Efeito tópico do OEP sobre o edema de orelha induzido por fenol em camundongos. Os animais foram pré-tratados com salina, dexametasona (DEXA) e OEP 200mg/mL. Após 15 minutos, receberam por via tópica 20 μ L de fenol 10% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 1 hora de aplicação do fenol. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (salina) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (***) $P < 0,001$. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

O modelo de edema de orelha induzido por fenol simula uma dermatite de contato. Em resposta a estímulos exógenos, quando há a aplicação do fenol, os queratinócitos produzem mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM *et al.*, 2004; WILMER *et al.*, 1994). Um dos mecanismos pelos quais o fenol promove a irritação cutânea seria a ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 α pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e de espécies reativas de oxigênio ROS. As citocinas pró-inflamatórias são induzidas nesse modelo por um mecanismo diferente daquele observado no modelo de inflamação cutânea induzido pelo óleo de cróton, onde a indução das citocinas ocorre via ligação a receptores específicos, através de vias dependentes da PKC, nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear (WILMER *et al.*, 1994). Porém, apesar da inflamação ser desencadeada por vias diferentes ambos os modelos, tanto com o fenol ou com o óleo de cróton, compartilham do envolvimento dos metabólitos do AA e ROS na resposta inflamatória instalada (RAUH 2008).

De acordo com a figura 14, podemos ver que o OEPM foi capaz de reduzir o edema induzido por tal agente flogístico de maneira significativa ($P < 0,01$), porém menor que a redução vista no modelo de edema de orelha induzido pela histamina ($P < 0,001$), indicando que o óleo possa estar agindo também pela via das prostaglandinas. DUTTA e DAS 2010, no trabalho feito com a espécie *Psidium guajava*, confirmou a atividade antiinflamatória dessa planta, que foi eficaz na redução tanto da inflamação induzida pela liberação de histamina quanto da induzida por prostaglandinas.

A utilização de diversos agentes flogísticos, como fenol, óleo de cróton e capsaicina, justifica-se devido aos seus distintos mecanismos de ação, simulando afecções cutâneas características e/ou sugerindo o possível mecanismo de ação antiedematogênico da substância em estudo (BLAZSÓ; GÁBOR, 1995). Dessa forma, os modelos de inflamação cutânea induzida por esses diferentes agentes flogísticos permitem a identificação de compostos com atividade antiinflamatória que possam ser potencialmente úteis para o tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele (VANE, 2000; BOUCLIER *et al.*, 1990; CARLSON *et al.*, 1985).

4.4. Avaliação da atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Psidium myrcinites* (OEPM) em modelos clássicos de nocicepção.

4.4.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração intraperitoneal de ácido acético 0,6% (Figura 15) nos animais tratados previamente com veículo (Tween 80 em água destilada, v.o; controle negativo) foi eficiente em produzir um alto número de contorções abdominais ($51,20\% \pm 1,85$). As doses 100mg/kg e 200mg/kg reduziram o número de contorções abdominais de forma eficiente ($30,40\% \pm 2,50$ e $29,80\% \pm 1,39$, respectivamente; $P < 0,001$) quando comparadas ao grupo controle. O diclofenaco (10mg/Kg; v.o), um fármaco antiinflamatório não-esteroidal, utilizado como droga padrão neste teste, diminuiu significativamente o número de contorções abdominais ($18,60\% \pm 1,20$; $P < 0,001$) nos animais quando comparada ao grupo controle. Porém, quando houve a administração do OEP 100mg/kg associado ao diclofenaco, a redução do número de contorções foi muito significativa, reduzindo mais que a administração dessas substâncias separadamente ($7,00\% \pm 2,28$).

Contorções por Ácido Acético

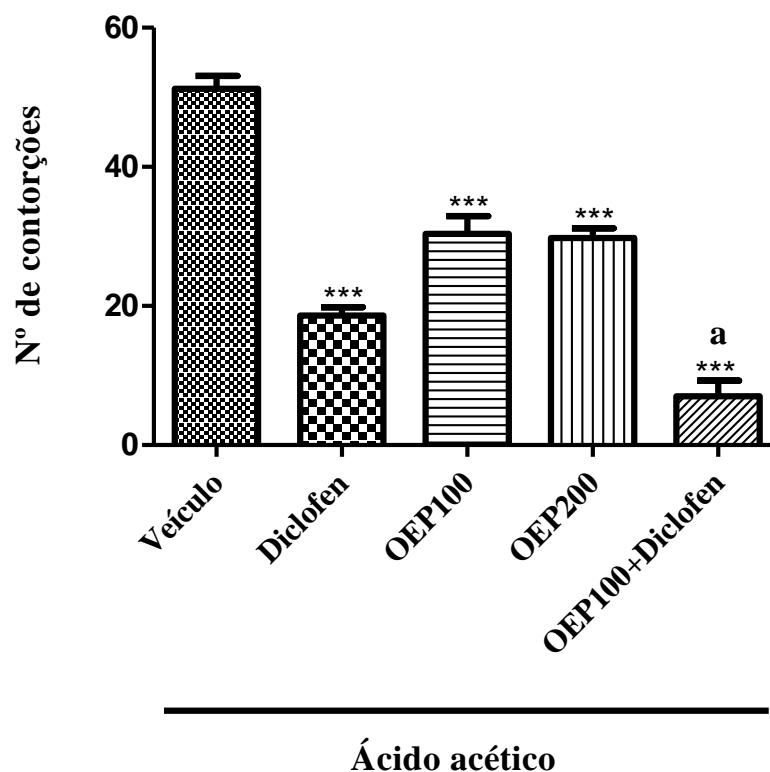


Figura 15. Efeito antinociceptivo do OEP no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O gráfico mostra a média ± E.P.M. do número de contorções durante o teste. Os animais foram previamente tratados com o OEP nas doses de 100 e 200mg/kg, Veículo (Tween 80 em água destilada, v.o), Diclofenaco (Diclofen) 10mg/kg, v.o ou OEPM100mg/kg+Diclofen 60 minutos antes de receberem a injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. O número de contorções foi contado durante 30 minutos após a administração do ácido acético (***P < 0,001 quando comparado ao grupo veículo, **a** < 0,001, quando comparado aos demais grupos. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Devido a pouca existência de trabalhos relacionados às atividades farmacológicas do OEP, investigamos também a atividade antinociceptiva desse óleo. Ultimamente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésica utilizadas primariamente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória) vem aumentando consideravelmente (PIETROVSKI, 2004). Os modelos utilizados na busca de novas moléculas com

potencial nociceptivo frequentemente baseiam-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração, sendo assim, os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em três categorias: os que utilizam estímulos térmicos, químicos e mecânicos (ALMEIDA e OLIVEIRA, 2006).

Como ponto de partida para a avaliação da atividade antinociceptiva do OEP foi utilizado um dos modelos mais clássicos para a avaliação dessa atividade, o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que é utilizado para avaliar, essencialmente, a atividade analgésica central e periférica. Animais que são submetidos à injeção intraperitoneal de ácido acético exibem comportamento alterado constituído por uma onda de constrição e alongamentos, acompanhados de torção do tronco e seguidos pela extensão dos membros (WENDE e MARGOLIN, 1956; COLLIER, 1968).

A indução dessas contorções abdominais ocorre em decorrência a uma reação inflamatória aguda relacionada com aumento dos níveis de PGE2 α e PGF2 α , em fluídos peritoneal, bem como de produtos da lipoxigenase (DERAEDT *et. al.*, 1980; VERMA *et. al.*, 2005). Contudo, verificou-se que a administração intraperitoneal de ácido acético não só induz a liberação de prostaglandinas, mas também de histamina, serotonina e bradicinina (WHITTLE, 1964; BASTOS *et. al.*, 2001). Do mesmo modo, macrófagos e basófilos, existentes na cavidade abdominal, sob ação do ácido acético, podem liberar citocinas, como IL-8, IL-1 β e TNF- α (RIBEIRO *et. al.*, 2000), as quais estimulam neurônios aferentes primários, aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cerebrospinal (FENG *et. al.*, 2003), o que explica a ocorrência da característica nocicepção, observada nesse modelo.

Com a utilização desse modelo foi possível observar que o OEP foi eficiente na redução do número de contorções abdominais de forma significativa quando comparadas ao controle negativo assemelhando-se estatisticamente ao fármaco diclofenaco, sendo que a administração do OEP associado ao diclofenaco reduziu o número de contorções abdominais mais que em qualquer outro grupo. O diclofenaco, assim como os outros DAINEs, inibem a ciclooxigenase em tecidos periféricos reduzindo a síntese e/ou a liberação de mediadores inflamatórios, interferindo, dessa forma, com os mecanismos de transdução dos nociceptores aferentes primários (TRONGSAKUL *et. al.* 2003). O mecanismo de ação analgésico do OEP pode estar envolvido na inibição da

síntese e liberação de mediadores inflamatórios que promovem a dor nas terminações nervosas, isso pode ser confirmado com a eficiente inibição da inflamação do OEP em diversos modelos de inflamação cutânea. OJEWOLE 2006 também descreveu a significativa redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético da espécie *Psidium sp.*

Estudos realizados com o óleo essencial da espécie *Eucalyptus globulus*, que assim como o OEP apresenta em sua composição química como composto majoritário o p-cineol, também apresentou redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (SILVA et al., 2003) indicando que esse composto possa estar envolvido na ação antinociceptiva do óleo essencial de *Psidium sp.*.

4.4.2. Efeito do OEP na nocicepção induzida por formalina

O OEP nas concentrações de 100 e 200mg/kg foram capazes de reduzir significativamente ($P < 0,001$) o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata nas duas fases do teste (0,543 % e 0,365%; 0,601% e 0,550%, respectivamente) comparados com o controle negativo (1,183% 1º fase e 1,053% 2º fase). A morfina (7,5mg/kg, i.p), um analgésico opióide, também demonstrou uma redução significativa ($P < 0,001$) do tempo que o animal lambeu a pata nas duas fases, como já era esperado (0,2317%, 0,141%, respectivamente).

A naloxona (1mg/kg, s.c), um antagonista opióide, foi capaz de inibir significativamente o efeito antinociceptivo da morfina nas duas fases do teste. Ela não alterou a resposta nociceptiva induzida pela morfina quando administrada sozinha. Além disso, a naloxona também conseguiu reverter de forma significativa o efeito antinociceptivo produzido nesse modelo pelo OEP nas duas fases do teste (Figuras 16 e 17).

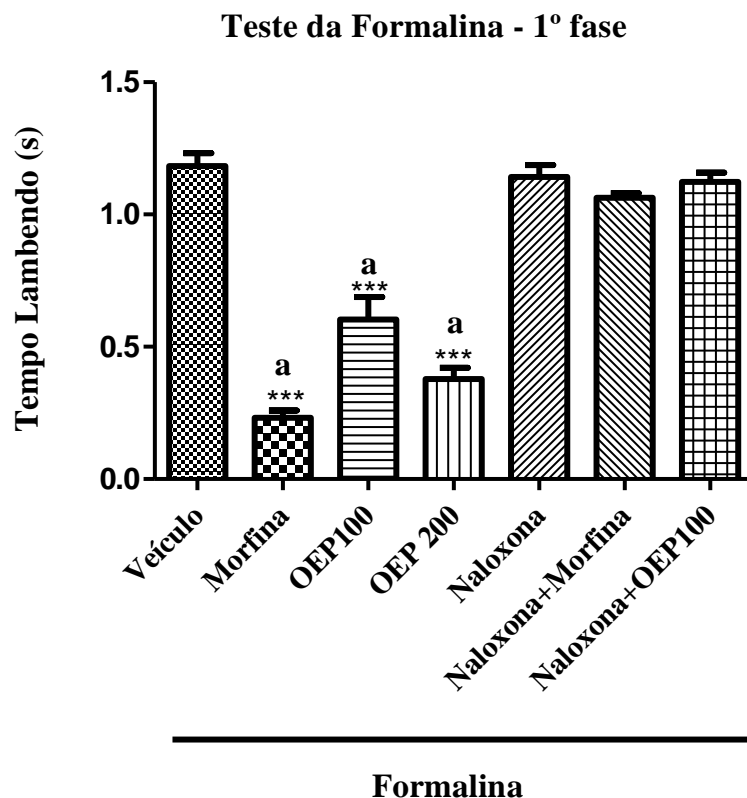


Figura 16. Efeito do OEP sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida por formalina na 1º fase do teste. Os valores no gráfico apresentam a média \pm E.P.M. do tempo de lambedura da pata direita traseira após a aplicação da formalina 1% na primeira fase do teste (0-5 min). O OEPM (100 e 200mg/kg), veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.) foram administrados 60 minutos e morfina (7,5mg/kg, i.p) 30 minutos antes da injeção subplantar de formalina 1% (20 μ L/pata). A naloxona (1mg/kg, s.c) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com morfina ou OEP (100mg/kg). (***) $P < 0,001$ quando comparadas ao grupo veículo. **a** $< 0,001$ comparadas aos demais grupos. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

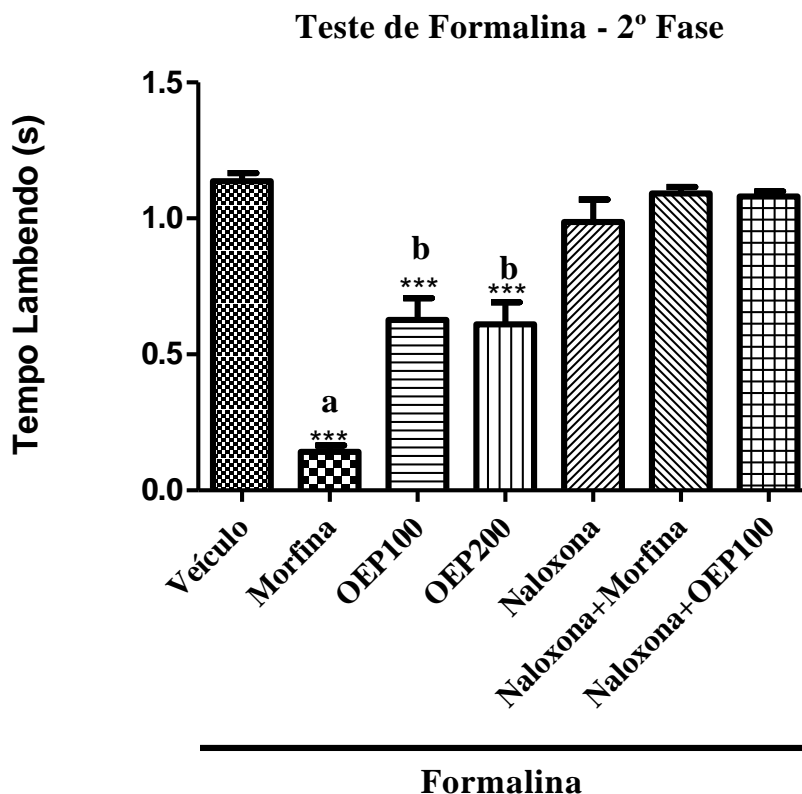


Figura 17. Efeito do OEP sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida por formalina na 2ª fase do teste. Os valores no gráfico apresentam a média \pm E.P.M. do tempo de lambedura da pata direita traseira após a aplicação da formalina 1% na segunda fase do teste (15-30 min). O OEPM (100 e 200mg/kg), veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.) foram administrados 60 minutos e morfina (7,5mg/kg, i.p) 30 minutos antes da injeção subplantar de formalina 1% (20 μ L/pata). A naloxona (1mg/kg, s.c) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com morfina ou OEP (100mg/kg). (***) $P < 0,001$ quando comparadas ao grupo veículo. **b** $< 0,001$ comparadas aos demais grupos. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Esse modelo desencadeia intensa nociceção por estimulação direta dos nociceptores. A nociceção causada pela injeção intraplantar de solução de formaldeído é caracterizada por intensas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com esse agente irritante. Este teste é caracterizado por apresentar duas fases distintas de nociceção, que parecem envolver diferentes mediadores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR *et. al.*, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997; SEGUIN *et. al.*, 1995). A primeira fase (neurogênica) inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 minutos e resulta da estimulação química direta dos nociceptores de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, predominantemente das fibras C (SULAIMAN *et al.*, 2008), sendo associada à liberação de aminoácidos excitatórios como óxido nítrico, substância P, glutamato, entre outros (OMOTE *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2004).

Por outro lado, a liberação de mediadores nociceptivos, durante a primeira fase do teste da formalina, causa extravasamento plasmático, vasodilatação de capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, de mastócitos e de macrófagos. Este processo também induz a liberação de mais mediadores do processo inflamatório, tais como, como histamina, 5-HT, bradicinina e prostaglandinas (FERREIRA *et. al.*, 2004). Este conjunto de mediadores inflamatórios produz sensibilização das vias periféricas e centrais de condução da dor, característica da segunda fase (fase inflamatória), observada de quinze a trinta minutos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN *et. al.*, 1992). Após a primeira fase, segue-se um período de relativa ausência de comportamento indicativo de nociceção que dura cerca de 10 minutos.

Estudos advertiram que drogas como codeína e morfina, drogas de ação central, tinham ação ao diminuir o tempo de lambedura da pata dos animais em resposta a formalina tanto na primeira fase, como na segunda fase do teste. Contrariamente, indometacina e naproxeno, exemplos de DAINes, diminuíram a nociceção apenas na segunda fase do teste, 15-30 minutos após a injeção subplantar de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; ALMEIDA e OLIVEIRA, 2006).

Para a investigação de um possível envolvimento do sistema opióide na atividade analgésica do OEP, foram utilizados morfina, (7,5mg/kg, i.p), um conhecido agonista dos receptores opióides e naloxona (1 mg/kg,s.c), um antagonista não seletivo de receptores opióides. Em alguns modelos experimentais, a ação da naloxona é de antagonizar opióides endógenos envolvidos na dor ou estresse (BISPO *et al.*, 2001). Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento com naloxona reverteu de maneira significativa os efeitos antinociceptivos do OEPM (100mg/kg) e da morfina (7mg/kg, i.p), em ambas as fases (Figuras 16 e 17). Sendo assim, estes resultados sugerem que os receptores opióides estão envolvidos na ação antinociceptiva do OEP.

Estudos com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, que possui em sua composição o p-cineol como majoritário, apresentou uma redução de 60% do tempo que o animal passou lambendo a pata no modelo de formalina, mostrando indícios que esse composto esteja envolvido na atividade antinociceptiva do OEP (RABELO *et al.*, 2003).

4.4.3. Efeito do OEP no modelo de nociceção pela Placa Quente

O OEP nas concentrações testadas (100 e 200 mg/kg), foram capazes de prolongar significativamente ($P<0,001$) o tempo de reação a placa quente (30 min: 22,13s e 23,13s; 60 min: 23,63s e 23,75s; 90 min: 22,88s e 21,88s, respectivamente) quando comparadas ao grupo onde houve a aplicação apenas da salina (30 min: 13,13s; 60 min: 11,50s; 90 min: 11,13s). A morfina (7,5mg/kg, i.p) também prolongou de forma significativa ($P<0,001$) o tempo de reação dos animais nos intervalos de registros estudados (30 min: 27,88s; 60 min: 29,25s; 90 min: 27,13s). O grupo tratado com o OEPM 100mg/kg associado à naloxona conseguiu reduzir de maneira significativa o tempo de reação à placa quente dos animais em todos os intervalos de tempos testados quando comparados ao grupo onde houve a aplicação do OEP (30 min: 15,38s; 60 min: 14,50s; 90 min: 13,63s), o mesmo ocorreu com grupo tratado com a morfina em associação a naloxona (30 min: 15,38s; 60 min: 14,50s; 90 min: 13,63s) como demonstra a figura 18.

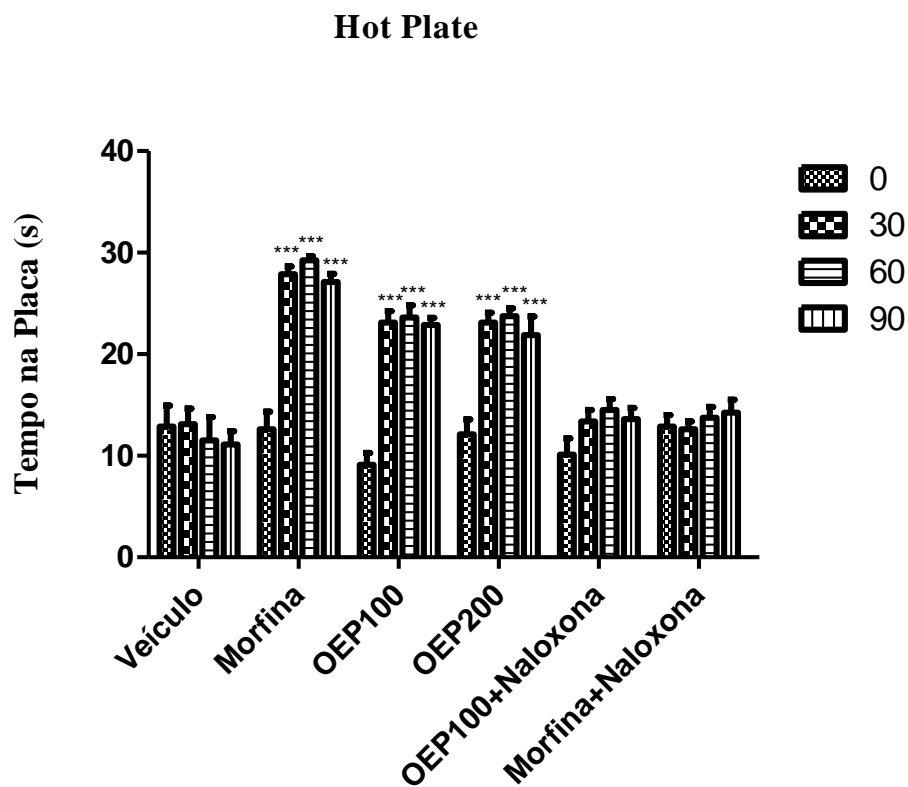


Figura 18. Efeito do OEP sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo necessário para os animais exibirem respostas frente ao estímulo térmico, registrados antes (tempo zero) e nos tempos 30, 60 e 90 minutos após os tratamentos com o OEP nas doses de 100 e 200mg/kg v.o, veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.), morfina (7,5mg/kg, i.p) , OEPM 100mg/kg associado a naloxona ou morfina associada a naloxona. A resposta consiste em saltar ou lamber a pata traseira após serem postos na placa aquecida a $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$. (***) $P < 0,001$. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

O teste da placa quente tem sido utilizado para a avaliação de drogas que agem, principalmente por via central (GUPTA *et. al*, 2005). Neste modelo, o parâmetro utilizado para avaliação da atividade analgésica de um composto é o tempo de latência para a observação do comportamento de lambedura ou salto do animal em resposta ao estímulo térmico gerado pela placa aquecida (ALMEIDA e OLIVEIRA, 2006).

O teste da placa quente é caracterizada por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e em seguida a centros corticais, sendo que a resposta é proporcional à frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICKENSON e BESSON, 1997). Estas fibras são estimuladas posterior a ativação dos receptores vanilóides, entre outros, especificamente o tipo VR-1, tendo como limiar de ativação 43°C, e VRL-1, tendo como limiar de ativação 52°C, que são responsáveis pela resposta a aumento na temperatura, sendo que os receptores VRL-1 são mais importantes na mediação da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o OEP também foi efetivo em aumentar significativamente a latência dos animais na nocicepção térmica da placa quente. Também foi possível observar que o agonista opióide morfina, também foi efetivo em aumentar a latência dos animais no estímulo térmico, porém a naloxona conseguiu reverter o efeito antinociceptivo do OEPM 100mg/mL de da morfina, diminuindo o tempo de latência dos animais a placa quente. É importante lembrar que o resultado positivo no modelo da placa quente sugere uma importante participação de mecanismos supra-espinhais na mediação da atividade antinociceptiva evidenciada pelo OEPM (DICKENSON e BESSON, 1997). OJEWOLE 2006 também observou que a espécie *Psidium guajava* apresentou um significativo aumento no tempo de latência dos animais na nocicepção térmica induzida pela placa quente.

SILVA et al., 2003, observou que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, também conseguiu aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente, podendo ser sugerido mais uma vez, que o efeito antinociceptivo de ambos os óleos, o de *E. globulus* e *Psidium sp.*, deve-se, também, a presença do composto p-cineol. TAKAKI, 2008, demonstrou em seu trabalho como óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, que apresenta em sua composição o p-cineol e o α -pineno, dois compostos do OEP, também conseguiu aumentar o tempo de permanência do animal na placa quente.

4.4.4. Efeito do OEP na nociceção induzida por Capsaicina

O OEP nas concentrações de 100 e 200mg/kg, via oral, reduziu significativamente ($P < 0,001$) o tempo que os animais permaneceram lambendo a pata, após a administração de capsaicina ($20\mu\text{L}/\text{pata}$) para $0,53 \text{ seg} \pm 0,02$ e $0,56 \text{ seg} \pm 0,10$, respectivamente, em relação ao grupo veículo, $0,97 \text{ seg} \pm 0,09$. A morfina ($7,5 \text{ mg}/\text{kg}$, i.p) demonstrou uma inibição de mais de 95% no tempo gasto pelos animais lambendo a pata ($0,03 \text{ seg} \pm 0,007$) quando comparado ao controle. A Naloxona ($1 \text{ mg}/\text{kg}$, s.c) inibiu significativamente ($P < 0,05$) o efeito antinociceptivo da morfina, assim como do OEPM nas duas concentrações estudadas (Figura 19).

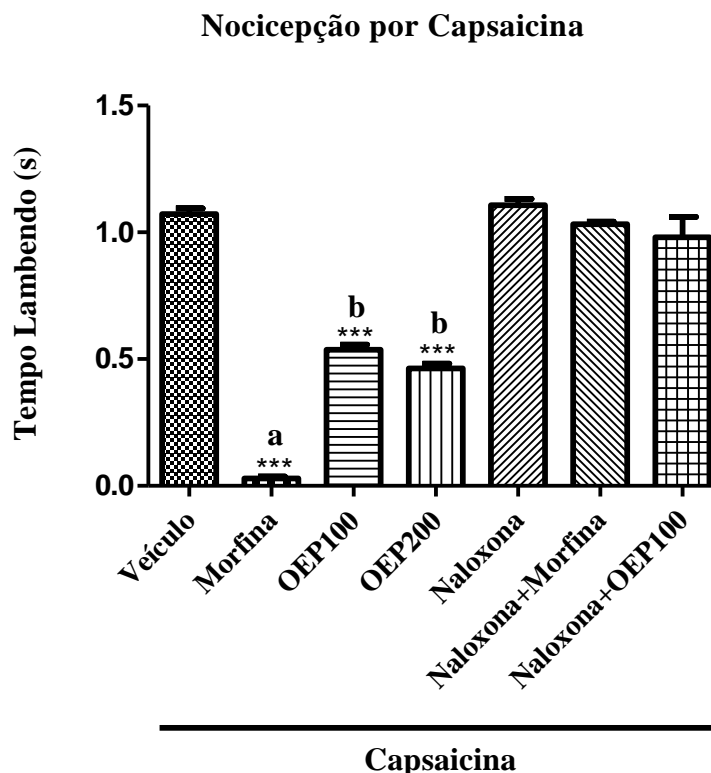


Figura 19. Efeito do OEP sobre a nociceção induzida pela injeção subplantar de capsaicina. O OEP (100 e 200mg/kg), veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.) foram administrados 1 hora e morfina ($7,5\text{mg}/\text{kg}$, i.p) 30 min antes da injeção subplantar de capsaicina. Naloxona ($1\text{mg}/\text{kg}$, s.c) foi administrada 15 min antes da administração da morfina ou do OEPM 100mg/kg, respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo gasto pelos animais lambendo a pata (seg) por um período de 5 min. (***) $P < 0,001$, em relação ao grupo veículo, **a** $< 0,001$, em relação aos demais grupos, **b** $< 0,01$ em relação ao grupo tratado com a Naloxona + OEP 100mg/kg. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

A injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de animais (camundongos) causa intensa nocicepção, caracterizada por lambidas e mordidas, sendo esse efeito relacionado com a nocicepção de origem neurogênica. Essa substância estimula o receptor específico TRPV-1, localizados nas fibras C (SAKURADA *et. al*, 1992).

Estudos indicaram que a ativação de neurônios nociceptivos, estimulada pela capsaicina, indicaram que esta interagem com os receptores VR1 nos neurônios sensoriais, induzindo o fluxo de cátions, particularmente os íons Ca^{++} e Na^+ . O influxo de Ca^{++} é essencial para a transmissão da informação nociceptiva induzida pela capsaicina. A capsaicina age, especificamente, nas fibras C não mielinizadas e neurônios sensoriais primários A δ mielinizados delgados. De forma funcional, estes neurônios são considerados por serem sítios de liberação de mediadores pró-inflamatórios na periferia, como substância P, neurocinina A e B, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e somatostatina, e por transmitirem informação nociceptiva até o nível da medula espinhal (AMARAL, 2004).

WRIGHT, 1997, mostrou em seu trabalho que o composto p-cineol conseguiu reduzir em cobaias o número de tosse induzidas por capsaicina, podendo-se argumentar que esse composto pode estar agindo na liberação de neuroquininas.

O OEP (100 e 200mg/kg) e a morfina exerceram, significativamente, efeito inibitório na resposta nociceptiva neurogênica induzida pela capsaicina, indicando que os compostos desse óleo essencial conseguem inibir de forma significativa a nocicepção induzida pelos agentes utilizados. O mecanismo essencial da ação antinociceptiva do OEPM parece estar relacionado ao sistema opióide, pois a naloxona reverteu de forma significativa este efeito do óleo quando aplicada por via subcutânea, assim como ocorreu no modelo de nocicepção induzida por formalina e no modelo de placa quente dando indícios que o OEPM pode ter sua ação nesses receptores opióides.

Atualmente é reconhecido que dentre os diversos neurotransmissores envolvidos nos modelos de nocicepção citados acima, os aminoácidos excitatórios, como glutamato e aspartato, apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação destes transmissores nesse local (MILLAN, 1999; 2002).

Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho, fornecem o embasamento farmacológico da utilização da planta *Psidium sp.* na medicina popular, e mostram visivelmente o potencial desta planta e seus compostos, como o p-cineol, o β -eudesmol e o α -pineno, para o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias e analgésicas.

5. Conclusões

- O óleo essencial de *Psidium sp.* na concentração de 200mg/ml possui efeito antiinflamatório quando administrado topicamente em camundongos (efeito local);
- O OEP possui efeito antiinflamatório agudo e crônico quando administrado por via tópica em camundongos no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton;
- O melhor efeito de redução do edema do OEP foram nos modelos induzido pela histamina, capsaicina e fenol, sugerindo que o tratamento inibe a liberação de mediadores vasoativos como CGRP, substância P, taquicininas, histamina e serotonina.
- A aplicação do OEP em dermatites de contato irritativas demonstrou ser eficaz pela redução do edema induzido por fenol;
- O OEP demonstrou efeito antinociceptivo nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina (nas duas fases) e capsaicina, corroborando a sua participação em mecanismos de analgesia espinhal e/ou periférica;
- O OEP também aumentou o tempo de latência dos animais na placa quente, sugerindo, também, o envolvimento de analgesia supra-espinhal;
- O OEP induziu uma possível potencialização do efeito do diclofenaco, pois a administração associada dos dois reduziu ainda mais o número de contorções, quando comparado à administração dos dois separadamente;
- O efeito antinociceptivo do OEP parece estar relacionado com o sistema opióide, já que a naloxona, um antagonista opióide, foi capaz de reverter à analgesia, induzida pelo óleo, nos testes de formalina, placa quente e capsaicina.
- As atividades antiinflamatória e antinociceptiva do OEP parecem estar envolvidas com seus compostos majoritários, principalmente o p-cineol, onde estudos anteriores relatam essas atividades no composto.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AKBAR, A., WALTERS, J.R.F., GHOSH, S. Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 30, p. 423-435, 2009.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

ALMEIDA, F.R.C., OLIVEIRA, F.S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guabara Koogan, p. 179-188, 2006.

AMARAL, J.F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell, Arg.**. 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.

BASTOS, J. K. *et al.* Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p. 279-282, 2001.

BAZZANO, F.C.O. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, p. 149-180. In: SILVA, José Vitor da (Org.) *et al.* **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BECKER, P.F.L. Inflamação. In: **Patologia Geral**, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.

BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behavioral and brain sciences**. 20: 371-380. 1999.

BISPO, M. D. *et al*; Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.

BLAZSÓ, G., GÁBOR, M. Effects of prostaglandin antagonist phlorenti derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. **Prostaglandins**, v. 50, p. 161-168, 1995.

BOLLER, S. **Atividade antiinflamatória tópica do extrato e compostos isolados da *Baccharis illinita* DC, (*Asteraceae*) em camundongos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOSCARDIN, P.M.D. **Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOUCLIER, M. *et al*. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BOUCLIER, M. *et al*. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BRAND, C. *et al*. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.

BRASIL. Lei Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 (“lei Arouca”), regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso

científico de animais; revoga a Lei N° 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 out. 2008.

BRUNO A. A Abordagem clínica na dor crônica. **Revista Brasileira de Medicina**, 58:1-10. 2001.

BURBACH, G. J.; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **the Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nature review molecular cellular biology**, v.6, p.328-340, 2005.

CARDOSO, T.A.O.. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim Central. Panamaense Fiebre Aftosa**, v. 64-67, p. 3-17, 1998-2001.

CARLSON, R.P. *et al.* Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v.17 (2), p. 197-206, p. 1985.

CERMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. **Current microbiology**, v. 56, p. 89-92, 2008.

CHAN, L.S. **Animal model of human inflammatory skin diseases**. Boca Raton:CRC Press, 2004.

CHAPMAN, C.R., GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet** 353:2233-2237. 1999.

CHIOU, L.C., LING, J.Y. AND CHANG, C.C. Beta-eudesmol as an antidote for intoxication from organophosphorus anticholine esterase agents. **European Journal of Pharmacology**. 13, 151–156, 1997.

COLLIER, H.O.J, *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Brazilian Journal of Pharmaceutical** , v. 32, p. 295-310, 1968.

CORRÊA, C.R., CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Brazilian Journal of Pharmaceutical** , v. 110, p. 193-198, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1251 p.

COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359 – 371, 2005.

CRAVEIRO, A.A.,QUEIROZ, D.C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v.16, p. 224-228, 1992.

CRUMMEY, A. *et al.* Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 503-511, 2005.

DE BERNARDIS, L. *et al.* Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42 (1-2), p.29-33, 1994.

DEBENEDICTS, C. *et al.* Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, v.19, p. 573-585, 2001.

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

DEWHIRST, F. E.; Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. **Prostaglandins**.v. 20. p. 209-222, 1980.

DICKENSON, A., BESSON, J.M. **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer, 1997. disease. **Prostaglandin & other Lipids Mediators**, v. 63, p. 25-42, 2000.

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

DUTTA, S., DAS, S. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. **Pharmacognosy Research**, v.2, p. 313-317, 2010.

FARSAM, H., AMANLOU, M., DEHPOUR, A.R., JAHANIANI, F. Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **Journal Ethnopharmacology**, 71: 443-447, 2000.

FAUCETT, J.A., LEVINE J. The contributions of interpersonal conflict to chronic pain in the presence or absence of organic pathology. **Pain** 44: 35-43. 1991.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, M. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced. **II Farmaco**, v. 56, p. 335-338, 2003.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v.11, p. 315-322, 2004.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FRAZON, R. C. *et al.* Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, 2009.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. T. **The biology of the skin**. The Parthenon Publishing Group, 2000.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 48:129-141. 1999.

GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M., RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GANONG, W. The stress response: a dynamic overview. *Hospital practice*, 23:155-190. 1988.

GARCIA-PIÑERES, A.J. *et al.* Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GUPTA, M. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 267-273, 2005.

GUTTMAN-YASSKY, E. *et al.* Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 119 (5), p.1210-1217, 2007.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T In: **the Biology of the Skin**. p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.E.; RILEY, T.V. In vitro activity of Malaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 50, p. 195-199, 2002.

HANGERMARK, O.; HOKFELD, T.; PERNOW, B. Fare and itch induced by substance P in human skin. **J. invest dermatol**, v. 71, p.233-235, 1978.

HENNINO,A. *et al.* Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetora e das células T CD4 regulatórias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80 (4), p. 335-347, 2005.

HOLZER P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research**, p. 57-65, 1986.

HUNSKAAR, S., FASMER, O.B., HOLE, K. Formalin test in mice, auseful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Meth**, v.14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S., HOLE,K. The formalin teste in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory. **Pain**,v.30, p. 103-104, 1987.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparision with arachidonic acidinduced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1614-1620, 1993.

IVERSEN, L.; KRAGBALLE, K. Arachidonic acid metabolism in skin health and disease. **Prostaglandin & other Lipids Mediators**, v. 63, p. 25-42, 2000.

JAISSWAL, U.; JAISSWAL, V.S. Psidium guajava Guava. In: LITZ, R.E. (Ed.). Biotechnology of fruit and nut crops. **Cambridge: CAB Publishing**, p.394-401, 2005.

JONES, S.L. Anatomy of pain. In: Sinatra RS, Hord, AH, Ginsberg B, Preble L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992.

JUERGENS, U.R.; STOBBER, M.V. The anti-inflammatory activity of l-menthol compared to mint oil in human monocytes *in vitro*: A novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. **European Journal of Medical Research**, v. 3, 539–545, 1998.

JUERGENS, U. R.; STOBBER, M.V. SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effect of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. **European Journal of Medical Research**, v. 3, n. 9. p. 407-412, 1998.

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

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

JÚNIOR, F.G., et al. Extração de óleos essenciais e verificação da atividade antifúngica. **Argumento**, v. 8, n.14, p. 49-65, 2006.

KABASHIMA, K.; MIYACHI, Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. **Nature Immunology**, v. 5 (10), p. 1045-1051, 2004.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL T.M. Princípios da Neurociência. São Paulo: **Manole**. p. 73-491. 2003.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Trad.: Ana Cristina Arámburu da Silva [et al]. Porto Alegre: Artmed, 2008.

KOSTER, M.I. e ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cellular Biology**, v.83, p. 625-629, 2004.

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

KRAYCHETE, D.C., GUIMARÃES, A.C. Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.53,p.833-853, 2003.

KRUEGER, J.G. e BAWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annual Rheumatic diseases**, v. 64 (supl., II), p. 30-36, 2005.

KUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and Speculations. **Journal of Clinical Investigation**. v. 86, p. 1783-1789, 1990.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. **Toxicologia**. Ed: Manole, 1997. p. 43-58.

LAPA, A. J. *et al.* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2008.

LEE, J. L. *et al.* Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEUNG, D.Y.M. *et al.* New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacol Research**. v. 27, p. 442-448, 2004.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid wogonin. **Archive Pharmacology Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

MACFARLANE, B.V. *et al.* Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 75:1-19, 1997.

MACHADO, J. G. S. *et al.* Análise bioética da legislação brasileira aplicável ao uso de animais não-humanos em experimentos científicos, p. 45-62. In: GARRAFA, Volnei; CORDÓN, Jorge (Orgs.). **Pesquisas em Bioética no Brasil de hoje**. São Paulo: Gaia, 2006.

MACMAHON, S.B., CAFFERTY, W.B.J., MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental neurology*, 192:444-462, 2005.

MARCHIONNI, A. M. T.; PAGNONCELLI, R. M.; REIS, S. R. A. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**, PUCRS, v. 21, n. 51, 2006.

MARSARO, JUNIOR, A.L.; SOUZA, R.C.; DELLA LUCIA, T.M.C.; FERNANDES, J.B.; S ILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P. C. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, n.9, p.1771-1780, 2004.

MEDEIROS, R. *et al.* Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 390-395, 2009.

MENDELL, J.R., SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **New England Journal of Medicine**. v. 348:1243-1255, 2003.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MILAN, M.J. Descending Control of Pain. **Progress in Neurobiology**, v.57, p. 355-474, 2002.

MILAN, M.J. The Induction of Pain: Na Integrative Review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 161-164, 1999.

MONTAGNA W; PARAKKAL P. F. The pilary apparatus. In **The Structure and Formation of Skin**. New York: Academic Press, p. 172 - 258, 1974.

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, p. 1331-1336, 2006.

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

MURPHY, G.F., MIHM Jr., M.C. A pele. In: Patologia Estrutural e Funcional. Eds. Cotran, RS., Kumar, V., Collins, T. Guanabara Koogan: Philadelphia, p. 1068-1075. 2000.

NICKOLOFF, B.J. e NESTLÉ, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, v.13, p.1664-1675, 2004.

NORRIS, D.A. Structure and function of the skin. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 2444-2446, 2004.

OJEWOLE, J.A.O. Anti-Inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology** v. 28, p. 441, 2006.

OMOTE, K. *et al.* Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. **Brain**, v. 814, p. 194-198, 1998.

Pare, P.W. and Tumlinson, J.H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Journal of Plant Physiology**. 121, 325–331, 1999.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PEREIRA, C.K.B. **Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium* (Myrtaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular). Universidade Regional do Cariri, Crato.

PIETROVSKI, E.F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos obtidos das flores de *Combretum leprosum* Mart.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PINTO, J. R. R.; LENZA, E. ; PINTO, A. S. Composição florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea em um cerrado rupestre, Cocalzinho de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 32, p. 1-10, 2009.

RABELO M., *et al.* Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 521-524, 2003.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 6. ed. Trad.: Raimundo Rodrigues Santos [*et al.*]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAUH, L.K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

REDONDO, P. *et al.* Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expresión in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 186-194, 1997.

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, p. 111-118, 2000.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 23-34, 2007.

ROSLAND, J. H. *et al.* The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v.45, p. 211-216, 1991.

RYAN, T. The ageing of the blood suply and the lymphatic drainage of the skin. **The International Research and Review Journal for Microscopy**, v. 35, p. 161-171, 2004.

SCHNEE, C., KO^o LLNER, T.G., GERSHENZON, J. AND DEGENHARDT, J. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-b-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. **Journal of Plant Physiology**, 130, 2049–2060, 2002.

SALARI, M. H.; AMINE, G., SHIRAZI, M. H., HAFEZI, R.; MOHAMMADYPOUR, M. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 194-196, 2006.

SAKURADA, T. *et al.* The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 1279-1285, 1992.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Arte Médica, 2000.

SANCHEZ, T. e MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by compound MV8612 isolated from *Mandevilla velutina* in mice. **Brain Research**, v. 961, p. 269-276, 2003.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Antiinflammatory and antinociceptivy effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTOS, F.A., RAO, V.S.N., SILVEIRA, E.R. Studies on the neuropharmacological effects of *Psidium guyanensis* and *Psidium pohlianum* essential oils. **Phytotherapy Research**, v.10, p. 655-658, 1996.

SARAIVA, R.A.. **Efeito anti-inflamatório do óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre o edema induzido por agentes flogísticos em modelos animais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioprospeção Molecular). Universidade Regional do Cariri, Crato.

SCHOEPE, S. *et al.* Glucocorticoid therapyinduced skin atrophy. **Experimental Dermatology**. v. 15 ,p. 406-420, 2006.

SEGUIN, L., MAROUILLE-GIRARDON, L., MILLAN, M. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin-1 and neurokinin-2 receptor antagonists, a comparison to other classes of antinociceptive agent. **Pain**, v. 61, p. 325-343, 1995.

SHARP, T.J. Chronic pain: a reformulation of the cognitive-behavioral model. **Behaviour Research and Therapy** 39:787-800. 2001.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA JUNIOR, M.C. 100 árvores do Cerrado: guia de campo. **Brasília: Rede de sementes do Cerrado**, 2005.

SOUZA, C.D.; FELFILI, M.J. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SOUZA, G.C. *et al.* Ethnopharmacology studies of antimicrobial remedies in south of Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

STANLEY, P. L. *et al.* Mouse skin inflammation induced by multiple topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate. **Journal of Pharmacological and Biophysiological Research**, v. 4, n. 4, 1991.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. **Registry of Mass Spectra Data Base**. Washington DC: Government Printing Office, 1974

SULAIMAN, M. R. *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 557-561, 2008.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 39, n. 1, p. 60-64, 2004.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da Nocicepção e da Supressão da Dor. **JBA**, v.1, n.4, p.329-334, 2001.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 399-402.

TRONGSAKUL, S. *et al.* The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p. 221-225, 2003.

TUBARO, A. *et al.* The croton oil test revisited. **Agents Actions**, v. 17, p. 347-349, 1985.

VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104 (3A), p. 2S-8S, 2000.

VENANCIO, A.M. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe, 2006.

VERAS, H.N.H. **Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antiinflamatória tópica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular). Universidade Regional do Cariri, Crato.

VERMA, P. R. *et al.* Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298-301, 2005.

VITTI, M. A. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**. n.17. p. 1-26, 2003.

WANG, B. *et al.* CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2001.

WENDE, C., MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc.**, v.15, p. 494-499, 1956.

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

WILLIAMS, I.R. e KUPPER, T.S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life sciences**, v. 58 (18), p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMS, H. C. Atopic Dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 352(22), p. 2314-2324, 2005.

WILMER, J.L. *et al.* Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WOOLF, C.J., MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Pain**. 353:1959 – 1964, 1999.

WRIGHT C.E., LAUDE, E.A., GRATTAN, T.J., MORICE, A.H. Capsaicin and neurokinin A-induced bronchoconstriction in the anaesthetised guinea-pig: evidence for a direct action of menthol on isolated bronchial smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 1645-1650, 1997.

YOUNG, J. M. *et al.* The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.

ZANETTI, Z.D., *et al.* Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, vol. 22, nº 2, p. 159-162, 2003.

ZANKER, K. S.; TOLLE, W. BLUMEL, G. PROBST, J. Evaluation of surfactant-like effects of commonly used remedies for colds. **Respiration**, v. 39(3), 150-157, 1980.

ZIMMERMANN, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. 429: 23, 2001.

PUBLICAÇÕES

Artigos publicados

LEITE, G. O; SAMPAIO, R. S; LEITE, L. H. I; MENEZES, I. R. A; COSTA, J. G. M; CAMPOS, A. R., **Attenuation of visceral pain in mice by th essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Bark.** Rev Dor, São Paulo, 2011 jan-mar; 12(1): 46-9

LEITE, G. O; SAMPAIO, R. S; LEITE, L. H. I; ARARUNA, M. K. A; MENEZES, I. R. A; COSTA, J. G. M; CAMPOS, A. R., **α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice.** Fitoterapia 82 (2011) 208-211.

LEITE, G.O; LEITE, L.H.I; SAMPAIO, R.S; ARARUNA, M.K; RODRIGUES, F.F.G; MENEZES, I.R.A; COSTA, J.G.M;CAMPOS, A.R. **Modulation of tropical inflammation and visceral nociception by *Vanillosmopsis arborea* essential oil in mice,** Biopha-D-11-00103, 2011 Publicado em: Biomedicine & Preventive Nutrition.

Artigos submetidos

LEITE, L.H.I; SAMPAIO, R.S.; COUTINHO, H.D.M; KERNTOPF, M.R et al.; **Chemical composition and study of antibacterial activity of *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira) – Fabaceae – Papilionoidae** 809180, Submetido para Baseada em evidências medicina alternativa e complementar - ECAM, em 2012.

Apresentação de trabalho em congresso

SAMPAIO, R.S.; RAMOS, A.G.B; NUNES, A.A.; PEREIRA, A.O.B.; SOUSA, D.G.; [MENEZES, I.R.A.](#); KERNTOPF, M.R. Atividade antinociceptiva do extrato hidroalcolico das folhas de *Annona muricata* L. no modelo de hot plate. XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Fortaleza/CE, 2011.

SAMPAIO, R.S.; LEITE, L.H.I; NASCIMENTO, E.P.; PEREIRA, A.O.B.; [MENEZES, I.R.A.](#); KERNTOPF, M.R. Avaliação preliminar da atividade antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *Psidium myrsinites* DC. A. (araçá). IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, João Pessoa/PB, 2012.

FERNANDES, C.N.; SOUZA, H.H.F.; KERNTOPF, M.R.; [COSTA, J.G.M.](#); [MENEZES, I.R.A.](#); **SAMPAIO, R.S.;** SIEBRA, A.L.A.; COUTINHO, H.D.M.; OLIVEIRA, L.R. Involvement of A2 noradrenergic receptors in the gastroprotective effect of ethanol extract from leaves *Duguetia furfuraceae* (A. TS-Hill). 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry-BrazMedChem. Rio Grande do Sul, 2012.

PEREIRA, A.O.B.; **SAMPAIO, R.S.**; ANDRADE, J.C.; COUTINHO, H.D.M.; KERNTOPF, M.R.; [MENEZES, I.R.A.](#) Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex. Spreng (Gonçalvo). III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticas. Aracaju/SE, 2012.

PEREIRA, A.O.B.; **SAMPAIO, R.S.**; SIEBRA, A.L.A.; SOUZA, D.O.; KERNTOPF, M.R.; [MENEZES, I.R.A.](#) Avaliação do Perfil Químico do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex. Spreng (Gonçalvo). III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticas. Aracaju/SE, 2012.

Anexo 1: Efeito do OEP sobre o edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton (OC)

Tratamento	Óleo de cróton	
	Dose	PE (%)
Salina	-	133,9± 2,964
Dexametasona	4mg/MI***	64,40± 3,508
Óleo puro	-	116,0± 9,311
OEPM	100	116,9± 7,930
OEPM	200***	95,23± 6,012

Valores expressos em média ± E.P.M. (P < 0,001); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls). PE: Percentual de Edema

Anexo 2: Efeito do OEP sobre o edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC)

Tratamento	Óleo de cróton	
	Dose	PE (%)
Salina	-	146,0± 10,91
Dexametasona	4mg/mL***	32,04± 1,446
Óleo puro	-	294,6± 9,682
OEPM	100	78,80± 6,797

Valores expressos em média ± E.P.M. (P < 0,001); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls). PE: Percentual de Edema

Anexo 3: Efeito do OEP sobre o edema induzido pela aplicação de N-vanililnonanamida (capsaicina)

Tratamento	N-vanililnonanamida (capsaicina)	
	Dose	PE (%)
Salina	-	116,8± 8,029
Dexametasona	4mg/mL***	49,64± 5,551
OEP	200mg/mL	81,81± 7,440
OEP+Capsaz	-	17,89±3,861
Capsazepina	-	26,63±1,782

Valores expressos em média ± E.P.M. (P < 0,001); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls). PE: Percentual de Edema

Anexo 4: Efeito do OEP sobre o edema induzido pela aplicação de ácido araquidônico

Tratamento	Ácido araquidônico	
	Dose	PE (%)
Salina	-	150,0± 16,20
Dexametasona	4mg/mL***	40,97± 7,595
OEP	200mg/mL	116,1± 13,22
OEP+INDO	-	28,53± 5,073

Valores expressos em média ± E.P.M. (P < 0,001); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls). PE: Percentual de Edema

Anexo 5: Efeito do OEP sobre o edema induzido pela aplicação de histamina

Tratamento	Histamina	
	Dose	PE (%)
Salina	-	55,54± 7,441
Dexametasona	4mg/mL***	12,95± 2,729
Fenergan	200mg/mL	8,800± 1,654
OEP	200mg/mL	11,86±1,756
Fenergan+OEP200	-	2,454±0,2348

Valores expressos em média ± E.P.M. (P < 0,001); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls). PE: Percentual de Edema

Anexo 06: Efeito do OEP sobre a nocicepção visceral induzida por ácido acético

Tratamento	Observação durante trinta minutos	
	Média ± E.P.M	Inibição (%)
Veículo	51,20± 1,855	-
Morfina	18,60±1,208***	63,68%
OEPM 100	30,40± 2,502***	40,62%
OEPM 200	29,80± 1,393***	41.79%

Valores expressos em média±E.P.M. (***)p<0,001 vs veículo); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls).

Anexo 07: Efeito do OEPM sobre a nocicepção cutânea induzida por formalina

Tratamento	1ª Fase (0-5min)		2ª Fase (15-30min)	
	Média ±E.P.M (%)	Inibição (%)	Média ±E.P.M	Inibição
Controle	1,183± 0,048	-	1,137± 0,029	-
Morfina	0,231± 0,027***	80,47%	0,141± 0,023***	82,88%
OEPM 100	0,603± 0,085***	49,02%	0,626± 0,079***	44,94%
OEPM 200	0,378± 0,042***	68,04%	0,610± 0,081***	46,35%
Naloxona	1,142± 0,045	-	0,986± 0,083	-
Naloxona+morfina	1,063± 0,017	-	1,092± 0,024	-
Naloxona+OEPM	1,123± 0,034	-	1,080± 0,018	-

Valores expressos em média±E.P.M. (***p<0,001vs veículo); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls).

Anexo 08: Efeito do OEPM sobre a nocicepção térmica induzida pela placa quente

Tratamento	Latência (s) – Média ± E.P.M			
	0 min	30 min	60 min	90 min
Controle	12,88±0,136	13,13±0,136	11,50 ± 0,749	11,13 ± 0,953
Morfina	12,63±8,311	27,88±8,311***	29,25± 9,06***	27,13± 7,90***
OEPM 100	9,125±7,629	23,13±7,629***	23,63 ± 7,90***	22,88 ± 7,49***
OEPM 200	12,13±5,995	23,76±5,995***	23,75 ± 6,33***	21,88 ± 5,31***
Nalox+OEPM	10,13±1,771	13,38±1,771	14,50 ± 2,38	13,63 ± 1,90
Nalox+morf	12,88±0,136	12,63±0,136	13,75± 0,47	14,25 ± 0,74

Valores expressos em média±E.P.M. (***p<0,001vs veículo); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls).

Anexo 09: Efeito do OEPM sobre a nocicepção induzida por capsaicina

Tratamento	Observação durante os cinco primeiros minutos	
	Média ± E.P.M	Inibição (%)
Controle	1,072± 0,023	-
Morfina	0,030± 0,007***	95,20%
OEPM 100	0,536± 0,020***	50%
OEPM 200	0,463± 0,018***	56,80%
Naloxona	1,107± 0,024	-
Nalox+morfina	1,032± 0,010	-
Nalox+OEPM	0,980± 0,081	-

Valores expressos em média±E.P.M. (***) $p < 0,001$ vs veículo); (ANOVA e teste de Student – Newman – Keuls).