



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



ROBSON DIAS DE SOUZA

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
Oocephalus nubicola* E *Leptohyptis macrostachys

Feira de Santana, BA
2014

ROBSON DIAS DE SOUZA

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
Oocephalus nubicola* E *Leptohyptis macrostachys

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

Orientadora: Prof. Dra. Angélica Maria Lucchese.
Co-orientadora: Prof. Dra. Marilene Lopes Rocha

Feira de Santana, BA
2014

ROBSON DIAS DE SOUZA

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
Oocephalus nubicola* E *Leptohyptis macrostachys

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

Banca examinadora:

Dra. Marilene Lopes da Rocha
Co-orientadora/UEFS

Dr. Paulo José Lima Juiz
Examinador externo/UFRB

Dra Raquel Guimarães Benevides
Examinador interno/UEFS

Feira de Santana – BA, 29 de Setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos irmãos de luz, obreiros do bem, por mais uma vitória; especialmente aos companheiros da ASECAL.

Dedico essa vitória aos meus pais e irmãos; à minha madrinha Lola e ao padrinho Olegário, por ser o maior promotor de nosso crescimento, e pela permanente certeza de que está vibrante neste momento. Devo agradecer também aos melhores tios(as) e primos(as) do mundo.

Angélica Lucchese, exemplo de gentileza, recebendo-me sempre com um sorriso. Obrigado por ter me adotado nos cinco anos da graduação e agora novamente no Mestrado. Agradeço também por ter me apresentado à Prof. Marilene Rocha, essa amiga que tanto colaborou. Que sorte tive com essa parceria!

Aos funcionários e colegas do Biotério e do LABEXA: Débora, Addla, Carol, Nataly, Junior, Tony, Serly e Edna, que contribuíram brilhantemente para o sucesso deste trabalho. Aos colaboradores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UEFS (PPGBiotec).

Aos amigos, que tornam nossa vida mais suave e nos engrandecem com palavras de encorajamento e ternura, com destaque para minha eterna companheira Elisabeth, amor das próximas vidas! Aos colegas de trabalho do Grupo Panpharma, especialmente minha chefe e amiga Marisa Lagares, pela generosidade e apoio durante os anos de estudo. Aos gerentes Sr. Mascarenhas, Wandvet Dantas e Márcio Odailton pela compreensão. Ao PanClube: Lucival, Nilde e Ely pelos momentos de descontração. Minha grande amiga Márcia Freire, pela amizade sincera e positividade, pelos lanches e gargalhadas!

E finalmente ao amor, que caminha ao meu lado, todos os **dias**, manifestando-se em cada passo dado por mim.

Curvo-me em agradecimento a vocês!

“A vida são as incessantes oportunidades que surgem pela frente, jamais os insucessos que ocorreram no passado”

Joanna de Ângelis

RESUMO

A família Lamiaceae tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, além de ser bem estudada do ponto de vista químico. Relatos de estudos farmacológicos também são extensos na literatura científica, pois as espécies desta família são encontradas em várias partes do mundo. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a composição química e a atividade antinociceptiva em camundongos dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Oocephalus nubicola* e *Leptohyptis macrostachys*. O material vegetal foi coletado na região do semiárido do Estado da Bahia. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação (3 h), em um aparelho do tipo Clevenger. Os óleos foram analisados por cromatografia capilar gasosa, usando detecção de ionização de chama e espectrometria de massas. Dois testes farmacológicos gerais foram aplicados para avaliação de possíveis efeitos das amostras no Sistema Nervoso Central dos animais: triagem farmacológica comportamental e teste da barra giratória. Para avaliação da atividade antinociceptiva foram empregadas duas metodologias: o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e o teste da formalina. Ambos os óleos apresentaram-se como uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que *Oocephalus nubicola* apresentou predominância dos constituintes sesquiterpênicos, enquanto que em *Leptohyptis macrostachys* os monoterpenos foram majoritários. As avaliações farmacológicas demonstraram que as amostras não afetam a coordenação motora dos animais, além de possuírem propriedades antinociceptivas nas três doses experimentais, com indícios de mecanismo de ação central.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva. Composição química. *Oocephalus nubicola*. *Leptohyptis macrostachys*. Óleo essencial.

ABSTRACT

The Lamiaceae family has great economic importance as a source of essential oils, in addition to being well studied from a chemical standpoint. Pharmacological studies reports are also extensive in the scientific literature because the specimens of this family are found in various parts of the world. This study aims to evaluate the chemical composition and antinociceptive activity in mice of the essential oils obtained from the leaves of *Oocephalus nubicola* and *Leptohyptis macrostachys*. The plant material was collected in the semiarid region of Bahia. The essential oils were obtained by hydrodistillation (3 h), on a Clevenger-type apparatus. The oils were analyzed by capillary gas chromatography using flame ionization detection and mass spectrometry. Two general pharmacological tests were used to assess possible effects of the extracts on the central nervous system of animals: the screening behavioral pharmacology and the rota-rod test. Antinociceptive effects were assessed using acetic acid-induced writhing test and formalin test. Both oils were presented as a mixture of monoterpenes and sesquiterpenes, and *Oocephalus nubicola* showed predominance of sesquiterpene components, while in the *Leptohyptis macrostachys* monoterpenes were major. The pharmacological evaluations demonstrated that the samples did not affect motor coordination of animals, besides their antinociceptive properties in the three experimental doses, with evidence of central effects.

Keywords: Antinociceptive activity. Chemical composition. *Oocephalus nubicola*. *Leptohyptis macrostachys*. Essential oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	18
Figura 2. Exemplos de fenilpropanóides de ocorrência em óleos essenciais	19
Figura 3. Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos de ocorrência em óleos essenciais	20
Figura 4. Lesão de tecido com ativação de nociceptores	27
Figura 5. Exsicatas depositadas no herbário. A) <i>Oocephalus nubicola</i> (Harley) Harley & J.F.P. Pastore, B) <i>Leptohyptis macrostachys</i> (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore	29
Figura 6. Determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 - Marte®)	30
Figura 7. Aparelho Rota Rod (modelo EFF 411 - INSIGHT®)	36
Figura 8. Caixa de contenção usada no teste da formalina	39
Figura 9. Teor de óleo essencial das espécies em estudo	40
Figura 10. Comparação entre a concentração dos monoterpenos e sesquiterpenos nas amostras de óleos essenciais	43
Figura 11. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>O. nubicola</i> (100, 200 e 400 mg/kg) no teste da barra giratória em camundongos	44
Figura 12. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>L. macrostachys</i> (100, 200 e 400 mg/kg) no teste da barra giratória em camundongos	45

Figura 13. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>O. nubicola</i> sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos	46
Figura 14. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>L. macrostachys</i> sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos	47
Figura 15. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>O. nubicola</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos	48
Figura 16. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>L. macrostachys</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da coleta	29
Tabela 2. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental	34
Tabela 3. Rendimento das hidrodestilações	40
Tabela 4. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>O. nubicola</i>	41
Tabela 5. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>L. macrostachys</i>	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Plantas medicinais	14
2.2	Óleos essenciais	16
2.2.1	Composição química e biogênese	17
2.2.2	Localização e funções biológicas	21
2.2.3	Propriedades farmacológicas	22
2.2.4	Métodos de extração	23
2.3	A família Lamiaceae	24
2.4	Dor e nocicepção	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Coleta e preparação do material vegetal	29
3.2	Determinação de umidade da biomassa	30
3.3	Extração dos óleos essenciais	30
3.3.1	Cálculo do teor de óleo	31
3.4	Análise da composição química	31
3.5	Animais de experimentação	32
3.6	Testes farmacológicos gerais	33
3.6.1	Triagem farmacológica comportamental	34
3.6.2	Teste da barra giratória	35
3.7	Avaliação da atividade antinociceptiva	36
3.7.1	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	37
3.7.2	Teste da formalina	38
3.8	Análise estatística dos dados	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Óleo essencial	40
4.2	Testes farmacológicos gerais	43
4.2.1	Triagem farmacológica comportamental	43
4.2.2	Teste da barra giratória	44
4.3	Avaliação da atividade antinociceptiva	45

	4.3.1	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	45
	4.3.2	Teste da formalina	47
5		DISCUSSÃO	50
6		CONCLUSÃO	55
		REFERÊNCIAS	56
		APÊNDICES	62
		ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido pela sua biodiversidade. Essa riqueza biológica torna-se ainda mais importante porque está aliada à sua sociodiversidade que envolve povos e comunidades, com visões, saberes e práticas culturais próprias. Na questão do uso terapêutico das plantas, esses saberes e práticas estão diretamente relacionados aos territórios e seus recursos naturais, como parte integrante da reprodução sociocultural e econômica destes.

Os recursos naturais, especialmente os vegetais, se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento, utilizadas nas mais variadas aplicações terapêuticas, graças à diversidade de sua constituição química. Os óleos essenciais, como produtos obtidos das diferentes partes vegetais, possuem diversas destas propriedades terapêuticas bem estabelecidas. Muitas plantas medicinais já tiveram suas ações terapêuticas validadas, tendo seu uso assegurado por estudos científicos realizados, estando inclusive incluídas no projeto Farmácias Vivas.

A investigação sobre produtos naturais com atividade antinociceptiva em nosso país tem aumentado significativamente nos últimos anos. Podemos observar uma crescente demanda para produtos naturais, tanto por indústrias farmacêuticas nacionais quanto internacionais, fato que vem impulsionando as investigações científicas e a busca por drogas naturais.

A dor pode ser conceituada como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais. Já o termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão. Baseado nestes conceitos, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional. Mesmo assim tornou-se uma convenção o uso do termo “dor” para pacientes humanos e animais (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

A proposta de investigação da composição química dos óleos essenciais de espécies de Lamiaceae, aliada a testes de atividade antinociceptiva, poderá levar à ampliação do conhecimento químico da família e identificação de substâncias bioativas. Além disso, a identificação e o isolamento desses novos compostos com atividade antinociceptiva poderão ser utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos ou como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Baseando-se nas justificativas acima, este estudo tem como tema central o estudo da composição química e da atividade antinociceptiva de óleos essenciais das folhas de *Oocephalus nubicola* (Harley) Harley & J.F.B. Pastore e *Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore oriundas do semiárido do estado da Bahia. Como objetivo geral, avaliar a composição química e a atividade antinociceptiva em modelos animais, dos óleos essenciais obtidos de *Oocephalus nubicola* e *Leptohyptis macrostachys* da região do semiárido do Estado da Bahia. Entre os objetivos específicos:

- Analisar a composição química de óleos essenciais obtidos das folhas de *Oocephalus nubicola* e *Leptohyptis macrostachys*;
- Avaliar os possíveis efeitos dos óleos essenciais sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos;
- Verificar o efeito sobre a coordenação motora em roedores tratados com os óleos essenciais;
- Investigar a atividade antinociceptiva dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Oocephalus nubicola* e *Leptohyptis macrostachys* em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Os homens primitivos, assim como outros animais, usavam as plantas medicinais através dos seus instintos de sobrevivência, com isso, observavam determinados efeitos nelas contidas que minimizavam suas enfermidades. Assim, foram acumulando conhecimentos a respeito dos seus efeitos sobre cada desordem. Esta prática milenar, por ter ultrapassado todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegado até os dias atuais, teve, portanto, seu devido reconhecimento da ciência e daqueles que a executam (CAMPOS, 2006).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta – em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade – que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. No entanto, embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2009).

O semiárido brasileiro está praticamente incluído no Nordeste do Brasil, compreendendo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, além do norte de Minas Gerais. Esta região corresponde a mais da metade da área do Nordeste e ocupa 11,5% do território nacional, incluindo 1116 municípios. A vegetação no semiárido nordestino apresenta uma grande variação fisionômica e florística, extremamente complexa e difícil de ser caracterizada nos grandes domínios morfoclimáticos brasileiros, que está relacionada à grande heterogeneidade do clima, solo e relevo. Estima-se haver oito mil espécies vegetais, sendo que destas, 318 espécies de 42 famílias botânicas são endêmicas da caatinga, ainda pouco estudadas em relação a descoberta de novas moléculas bioativas (NOVAIS *et al*, 2003; GIULIETTI; QUEIROZ, 2006).

Os fitoterápicos representam uma porção significativa do mercado mundial de medicamentos, com crescimento nas vendas de 15% ao ano contra 4% do setor de fármacos sintéticos. No Brasil, eles geram um faturamento de cerca de US\$ 160 milhões anuais, constituindo um mercado promissor e em franca expansão. Observa-se que grande parte dos fitoterápicos apresenta rentabilidade elevada, desmistificando a justificativa das empresas se manterem ilegais devido à pouca significância econômica desse mercado (CARVALHO, 2011).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente com agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Além disso, as pesquisas relacionadas estão cada vez mais recebendo apoio total do poder público, pois além do fator econômico, deve-se destacar a importância para a segurança nacional e preservação dos ecossistemas.

A partir do século XIX aprendeu-se a reconhecer as indicações terapêuticas de uma planta em função de seus compostos químicos. Muitos destes compostos podem hoje ser reproduzidos artificialmente por síntese; e durante um período estes compostos sintéticos pareciam querer superar a utilização dos fitoterápicos. Hoje se reconhece que muitos compostos químicos descobertos nas plantas e utilizados em medicina não podem ser reproduzidos por síntese, por outro lado, alguns produtos

de síntese só podem ser obtidos por meio de precursores vegetais (CARVALHO, 2004).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 88% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, principalmente plantas ou preparações destas. Esta prática está bem estabelecida especialmente em países da Ásia, América Latina e África, onde muitas dessas plantas não têm sido estudadas e ainda podem ser avaliadas quanto à ação antimicrobiana, em contraste com as plantas nativas da Europa, que já foram exaustivamente estudadas (DUARTE, 2006).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, compostos de misturas complexas de substâncias líquidas de aparência oleosa em temperatura ambiente, voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se assim dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. O aroma é frequentemente agradável e intenso, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Embora a constituição química dos óleos voláteis seja muito diferenciada, eles possuem uma série de propriedades físico-químicas em comum: densidade menor que a da água, alto índice de refração, são sensíveis à luz, ao ar, ao calor, à umidade e à presença de metais e a maioria é opticamente ativa. São relativamente fluidos, podendo solidificar-se a temperaturas mais baixas. No que se refere à cor, variam de totalmente incolores a fortemente dourados, passando por nuances

esverdeadas, ambarinas e amareladas. Possuem ainda sabor geralmente ácido e picante (CORAZZA, 2002).

2.2.1 Composição química e biogênese

As plantas apresentam, além do metabolismo primário, o chamado metabolismo secundário. Enquanto o primeiro é responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas e outras substâncias que realizam as principais funções dos vegetais, o metabolismo secundário origina substâncias de baixa massa molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades e responsáveis por funções nem sempre bem definidas, mas não menos importantes, e entre tais substâncias encontram-se os óleos voláteis. Os metabólitos secundários são compostos que possuem uma distribuição limitada na natureza, encontrados apenas em organismos específicos, expressando a individualidade das espécies – esta é a principal constatação que os distingue dos metabólitos primários (DEWICK, 2009).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Nesta mistura de compostos, normalmente um deles é o composto majoritário, ou seja, aquele que se apresenta em maiores quantidades, enquanto os outros estão presentes em menores teores; e alguns ainda aparecem em baixíssimas quantidades, nestes casos diz-se que este composto é um constituinte-traço (SIMÕES; SPITZER, 2007).

De um modo geral, a grande maioria dos óleos essenciais são constituídos de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos preponderam. Os metabólitos secundários são originados a partir da glicose por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, que por sua vez, formam os derivados fenilpropanóides e os terpenóides respectivamente (Figura 1) (AHARONI *et al*, 2006).

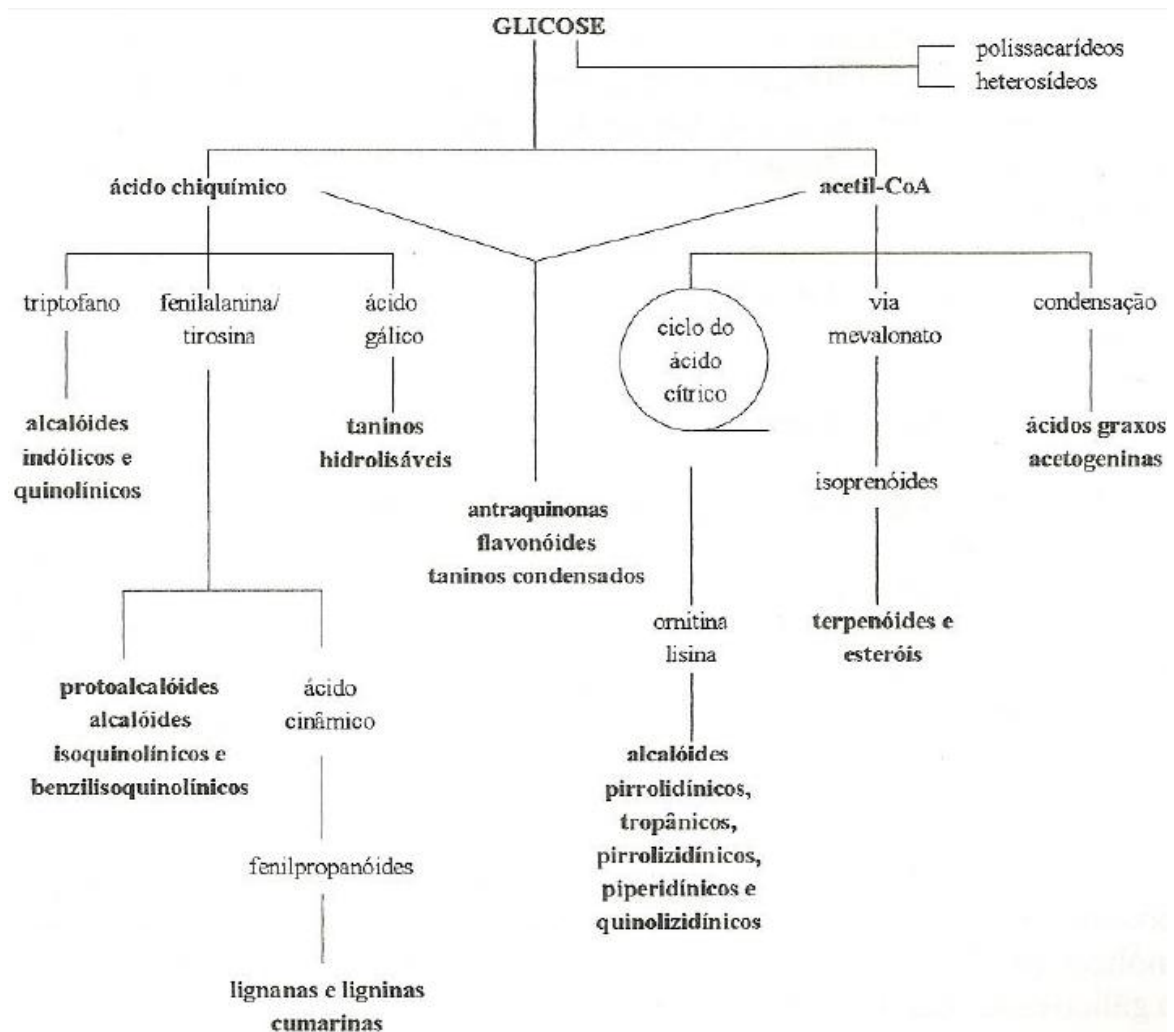


Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: SANTOS, 2007.

Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumarínico. Nas plantas, esses compostos têm origem nos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, respectivamente. Tais compostos, por meio de reduções enzimáticas, de oxidações com degradação das cadeias laterais e por meio de ciclizações enzimáticas intramoleculares, produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, aldeídos aromáticos e cumarinas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). A Figura 2 exemplifica alguns fenilpropanóides encontrados como constituintes de óleos essenciais.

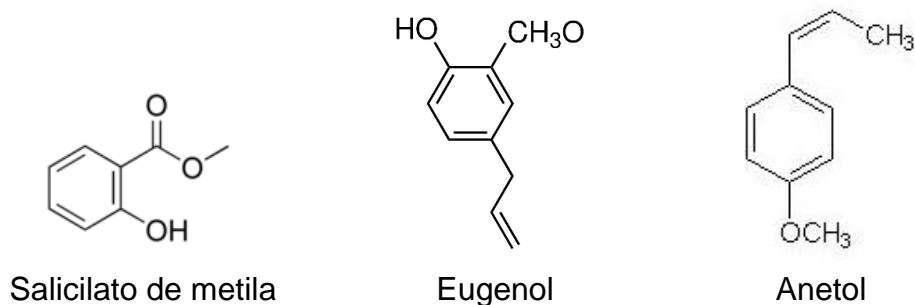


Figura 2 – Exemplos de fenilpropanóides de ocorrência em óleos essenciais.

Fonte: Autor, 2014.

Os terpenóides constituem todos os compostos cuja origem biossintética deriva das unidades do isopreno; a unidade isoprênica, por sua vez, origina-se do acetato por via do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas (unidades pentacarbonadas). Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores; além de ser encontrados também em fungos, organismos marinhos, feromônios de insetos e em suas secreções de defesa (SANTOS, 2007).

Dentre os terpenóides, os compostos mais frequentes em óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Os principais constituintes, dentre os monoterpenos, são: hidrocarbonetos acíclicos (mirceno, linalol), monocíclicos (α -terpineol, terpinoleno) e bicíclicos (α -pineno, cânfora). Em cada um desses subgrupos há outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona). Os sesquiterpenos podem ser acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico), bicíclicos (β -selineno, γ -bisaboleno) ou lactonas sesquiterpênicas – exemplos das estruturas de monoterpenos e sesquiterpenos de ocorrência em óleos voláteis podem ser visualizados na Figura 3 (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES; SPITZER, 2007).

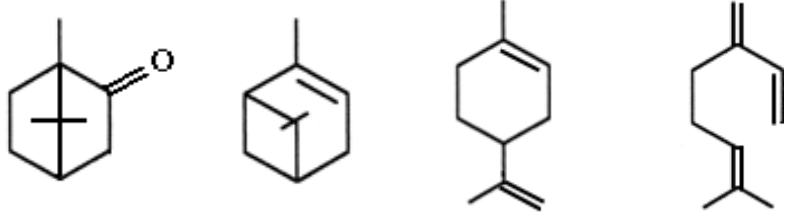
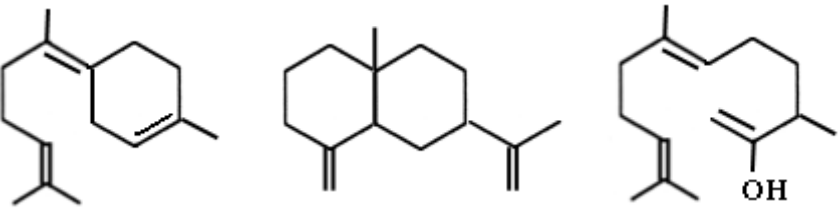
MONOTERPENOS	 <p>cânfora α-pineno limoneno mircenno</p>
SESQUITERPENOS	 <p>γ-bisaboleno β-selineno nerolidol</p>

Figura 3 – Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos de ocorrência em óleos essenciais.

Fonte: Autor, 2014.

A composição e a concentração dos constituintes do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento, porém, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve, a temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol, o regime dos ventos, a presença de micronutrientes no terreno e o tipo de cultivo, exercem uma influência direta sobre a composição química dos óleos (LIMA, KAPLAN, CRUZ, 2003).

O óleo essencial da espécie *Hyptis suaveolens*, por exemplo, já foi caracterizado quimicamente em vários estudos, tendo sido verificada elevada variabilidade na composição e notor dos constituintes majoritários. Estas diferenças foram atribuídas à origem geográfica das plantas. Portanto, a procedência distinta de plantas de *H. suaveolens* pode ser um fator de variabilidade genética, uma vez que a biodiversidade envolve o metabolismo das plantas e seus produtos, ou pode indicar um padrão de variação geográfica na composição do óleo essencial (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006).

O método de escolha para separação, determinação e caracterização de substâncias componentes de óleos voláteis é a cromatografia gasosa associada a técnicas de espectroscopia para aumentar a resolução e facilitar a identificação dos terpenos. A técnica de cromatografia gasosa é responsável pela separação e quantificação destas substâncias. No entanto, para se ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, método este que irá permitir, além da separação dos componentes, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massas, por sua vez, indica a massa molecular e o padrão de fragmentação: enquanto o primeiro informa a classe da substância, o segundo faz propostas de probabilidade quanto à identidade da substância analisada através de comparação com o banco de dados do equipamento (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A identificação de componentes de óleos voláteis tem feito o uso de CG e de CG-MS em associação com a determinação do índice de Kovats. Este procedimento vem sendo aplicado com sucesso na identificação de substâncias de estruturas conhecidas porque, em sua maioria, os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção (índice de retenção) obtidos em colunas de polaridades diferentes e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados (ADAMS, 2007).

2.2.2 Localização e funções biológicas

Os óleos essenciais são encontrados, especialmente, no grupo das Espermatófitas. Além disso, os gêneros capazes de produzir essas substâncias se reagrupam em um grupo bem restrito de famílias das Angiospermas, principalmente as dicotiledôneas, tais como as famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Rutaceae entre outros. São raramente encontrados em gimnospermas, e possuem ocorrência relativamente baixa nas angiospermas monocotiledôneas (FLORÃO, 2006; DUARTE *et al*, 2007).

De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos. Os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimais diferenciadas (Lauraceae), tubos oleaginosos chamados *vittae* (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizógenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem ainda estar estocados em diversos órgãos, tais como flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (BAKKALI *et al*, 2008).

Embora as diferentes partes vegetais de uma mesma planta possam acumular óleos voláteis, a composição química, as características físico-químicas e os odores destes podem ser bem distintos. Ainda mais, a composição química de um óleo extraído de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar de acordo com uma série de fatores ambientais, como a época da coleta, as condições climáticas e do solo, já citados anteriormente (SIMÕES; SPITZER, 2007).

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como um desperdício fisiológico, ou mesmo como produtos de desintoxicação. Porém, hoje já se sabe que a volatilidade e o odor marcante dos óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo um papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, na atração de insetos e outros agentes fecundadores, como inibidores da germinação, e também na proteção contra a perda de água e aumento de temperatura (SIANI *et al*, 2000).

2.2.3 Propriedades farmacológicas

Primeiramente deve-se salientar que as propriedades farmacológicas de uma droga vegetal rica em óleos voláteis não são as mesmas do óleo isolado desta mesma droga vegetal. Também deve-se levar em consideração que, se é possível estabelecer a atividade farmacológica de uma substância isolada, o mesmo não é tão fácil para um óleo volátil que, além de ser uma mistura complexa, pode ter sua composição química alterada por uma série de fatores.

Uma variedade de óleos voláteis fornecem compostos de partida para síntese de outras substâncias úteis nas indústrias química e farmacêutica; outros componentes têm propriedades farmacológicas e são usados como antibacterianos, analgésicos, sedativos, expectorantes, estimulantes e estomáquicos na composição de diversos medicamentos (ARRUDA *et al*, 2006; NUNES *et al*, 2006).

Simões e Spitzer (2007) também destacam as seguintes propriedades farmacológicas de óleos essenciais já estabelecidas: ação carminativa, antiespasmódica, cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, estimulante do sistema nervoso central, anti-inflamatória, anti-séptica entre outras. Já segundo Siani e outros (2000), são dignas ainda de menção as atividades inibidoras de crescimento de células neoplásicas e de alguns tipos de vírus, incluindo herpes simples tipo 1 e influenza.

2.2.4 Métodos de extração

Os métodos de extração de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. São basicamente cinco métodos de extração: enfloração, prensagem, extração com solventes orgânicos, extração por CO₂ supercrítico e arraste por vapor d'água.

Na destilação por arraste a vapor d'água, também chamada hidrodestilação, os óleos voláteis são arrastados pelo vapor d'água, por possuírem tensão de vapor mais elevado que a da água. Neste método, o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a temperatura de 100 °C, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos mais voláteis. A mistura de vapor esoluto passa por um condensador e, após a condensação, os compostos separam-se da fase aquosa por decantação (BIASI; DECHAMPS, 2009).

Neste método, em pequena escala, a Farmacopeia Brasileira V preconiza o uso de aparelhos do tipo Clevenger, e logo após a obtenção do óleo, e após separar-se da água, este deve ser seco com sulfato de sódio anidro. É uma técnica

de extremasimplicidade, facilidade de execução, bom rendimento e baixo custo (CORAZZA, 2002).

2.3 A FAMÍLIA LAMIACEAE

Esta família tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, além de ser bem estudada do ponto de vista químico. Extensiva literatura a respeito da composição química da família Lamiaceae apontam a presença efetiva de monoterpenos e sesquiterpenos em espécies de grande importância econômica. As inúmeras propriedades relatadas como características desta família, inclusive as medicinais e antimicrobianas, deve-se em grande parte à presença desses compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais dessas plantas (RICHARDSON, 1992). Em relação ao metabolismo especial, apresenta uma grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (MENEZES, 1994).

Segundo Cole (1992) os metabólitos secundários que ocorrem com maior frequência na família Lamiaceae são os flavonóides e os terpenóides, estes últimos em sua maioria, detentores de propriedades inseticidas, antimicrobianas e antifúngicas. Os terpenóides presentes nesta família também apresentam significativa importância taxonômica, haja visto que a divisão de Labiatae nas subfamílias Lamioideae e Nepetoideae de Erdtman é amparada em parte pela presença de iridóides em Lamioideae, e pela grande quantidade de óleo essencial em Nepetoideae em detrimento da outra subfamília, salvo algumas exceções de espécies de Lamioideae ricas em óleos essenciais. Assim sendo, juntamente com a morfologia, os terpenóides voláteis e os heterosídeos iridóides são úteis marcadores dessas subfamílias.

Espécimes desta família são encontrados em várias partes do mundo, seja em campos rasteiros, e regiões montanhosas sob climas tropical, sub-tropical e temperado (FALCÃO; MENEZES, 2003). Segundo Harley (1996), esta família tem preferência por savanas e montanhas, contudo algumas espécies do gênero

Hyptis vivem em áreas mais úmidas. O gênero *Hyptis*, pertencente à tribo Ocimeae e à subtribo Hyptidinae, era considerado um dos maiores gêneros desta família, sendo formado por aproximadamente 400 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Composto por ervas, sub-arbustos, arbustos ou raramente árvores pequenas, suas espécies apresentam geralmente caules quadrangulares, folhas opostas, simples ou raramente partidas, pecioladas, sésseis ou curtamente pedunculadas.

Recentemente Harley e Pastore (2012), através de evidências cromossômicas e anatômicas, sugeriram alterações na subtribo Hyptidinae (Lamiaeae), criando novos gêneros e redefinindo outros, deixando-os morfologicamente mais homogêneos e mais estritamente definidos. Desta forma, as duas espécies aqui investigadas e que pertenciam ao gênero *Hyptis* passam a ser denominadas de *Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore e *Oocephalus nubicola* (Harley) Harley & J.F.B. Pastore.

Leptohyptis macrostachys (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinonímia *Hyptis macrostachys* Bentham, *Mesosphaerum macrostachyum* (Benth) Kuntze) é um arbusto ramificado na base com até 2 m de altura, possuindo flores brancas, e popularmente conhecida como “alfavaca-brava” ou “hortelã do mato”. Na medicina popular, o chá das partes aéreas é usado para aliviar sintomas da asma, tosse e bronquite (AGRA *et al*, 2008). De Souza e outros (2013) demonstraram que o extrato etanólico das partes aéreas desta espécie apresenta um efeito espasmolítico em camundongos.

Oocephalus nubicola (Harley) Harley & J.F.B (sinonímia *Hyptis nubicola* Harley) caracteriza-se como um arbusto com até 1 m de altura. Folhas arredondadas a reniformes, fortemente perfumadas. Flores com corola lilás a rosa, reunidas em inflorescência terminal de cimeiras pequenas. Ocorre nos campos rupestres das regiões mais elevadas da Chapada Diamantina (GIULIETTI *et al*, 2009), sem relatos de estudos químicos ou farmacológicos na literatura.

2.4 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é conceituada pelo Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou descrita em termos de lesões teciduais, que apresentam caráter subjetivo e abstrato (BASBAUM; BUSHNELL, 2002).

A partir de suas características fisiopatológicas, a dor pode ser classificada como nociceptiva, neuropática e/ou psicogênica, como também pode ser mista, envolvendo mais de um destes três mecanismos. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação, a exemplo da dor pós-operatória e da queimadura. Já a dor neuropática é decorrente de alteração ou lesão do sistema nervoso central ou periférico, e manifesta-se na ausência de agressões teciduais; e a dor psicogênica seria aquela em que o estímulo psíquico seria responsável por seu eliciar (ALVES NETO, 2009; KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

Nociceção é o mecanismo que resulta na dor nociceptiva, é um termo neurofisiológico que se refere aos mecanismos neurológicos mediante os quais um estímulo lesivo é detectado. O primeiro passo na sequência de eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais, físicos ou químicos intensos em potenciais de ação, que são transferidos das fibras nervosas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) para o SNC. O processo de transdução dos eventos térmicos, mecânicos e/ou químicos intensos em potenciais de geração e de ação nos aferentes primários é limitado à região da membrana axonal, que ocupa poucas centenas de micrômetros de terminação axonal distal e que constitui o nociceptor ou a terminação nervosa livre (TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

A partir de um potencial gerado nos nociceptores, o estímulo seguirá pelas fibras aferentes primárias até a medula espinhal e, através das vias ascendentes, será projetado no córtex onde ocorre a percepção consciente da dor, após conexões com estruturas com tálamo e formação reticular. A lesão tissular provoca formação e liberação de substâncias que sensibilizam e ativam os nociceptores (Figura 4),

seguidas de transmissão do impulso para a medula espinhal e para os centros supra-espinhais (SAKATA; ISSY, 2004).

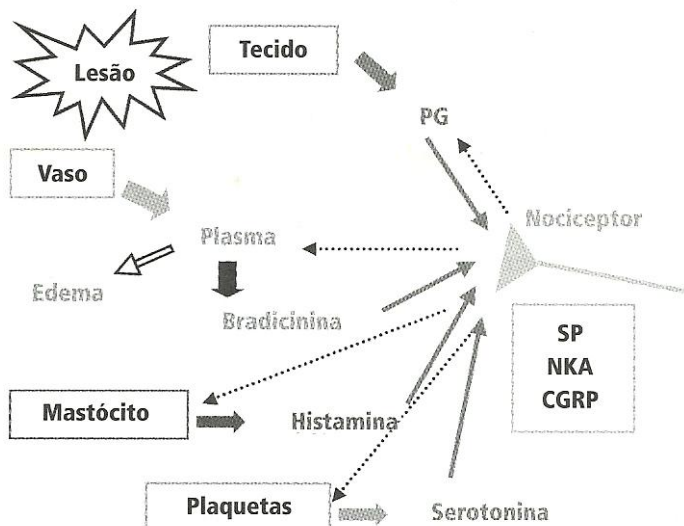


Figura 4 – Lesão de tecido com ativação de nociceptores.

Fonte: SAKATA; ISSY, 2004.

A pesquisa da etiologia e da nosologia da dor, e a quantificação e qualificação da sensação dolorosa são fundamentais para a instalação das medidas terapêuticas apropriadas. Várias classes de fármacos são utilizados para o tratamento da dor: o tratamento farmacológico da dor nociceptiva envolve o uso de analgésicos antipiréticos, anti-inflamatórios não-hormonais e esteroidais ou opióides. Fármacos antidepressivos e neurolépticos, anticonvulsivantes, antineurálgicos e miorrelexantes são os mais eficazes para o tratamento dos demais tipos de dores (TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001). Atualmente, pesquisas são realizadas no intuito de elucidar os mecanismos fisiológicos e emocionais da dor, visando à descoberta de novos fármacos que possam reduzir ou até eliminar o processo doloroso.

O estudo da atividade antinociceptiva de óleos essenciais de plantas nativas é bastante encontrado na literatura científica, tendo sido relatado em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia e México, que possuem uma flora diversificada associada com uma rica tradição na utilização de plantas medicinais. Pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de óleos essenciais como terapêuticos são

constantemente estimuladas para além do intuito de criar novas drogas, como também para aperfeiçoar as já existentes.

A atividade biológica dos óleos essenciais está diretamente ligada aos seus componentes químicos, a configuração estrutural e os grupos funcionais dos componentes, e ainda à possibilidade de interações sinérgicas entre os componentes. Em relação às particularidades do óleo, algumas pesquisas a respeito de sua composição mostram que fatores ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco) e técnica de extração, afetam a composição química deles, podendo provocar também alterações na atividade antinociceptiva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As plantas foram coletadas na região do semiárido do estado da Bahia. Todo o tratamento convencional de herborização seguiu o descrito em MORI *et al.* (1989). As exsicatas foram depositadas no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde foram identificadas pelo Prof. Dr. José Floriano Barêa Pastore (Figura 5). Os locais de coleta, período e a identificação no herbário estão apresentados abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados da coleta.

Espécie	Local	Período	Identificação
<i>Leptohyptis macrostachys</i>	Mucugê	15/08/2011	HUEFS-184484
<i>Oocephalus nubicola</i>	Rio de Contas	15/09/2011	HUEFS-184495

Fonte: Pesquisa Experimental.

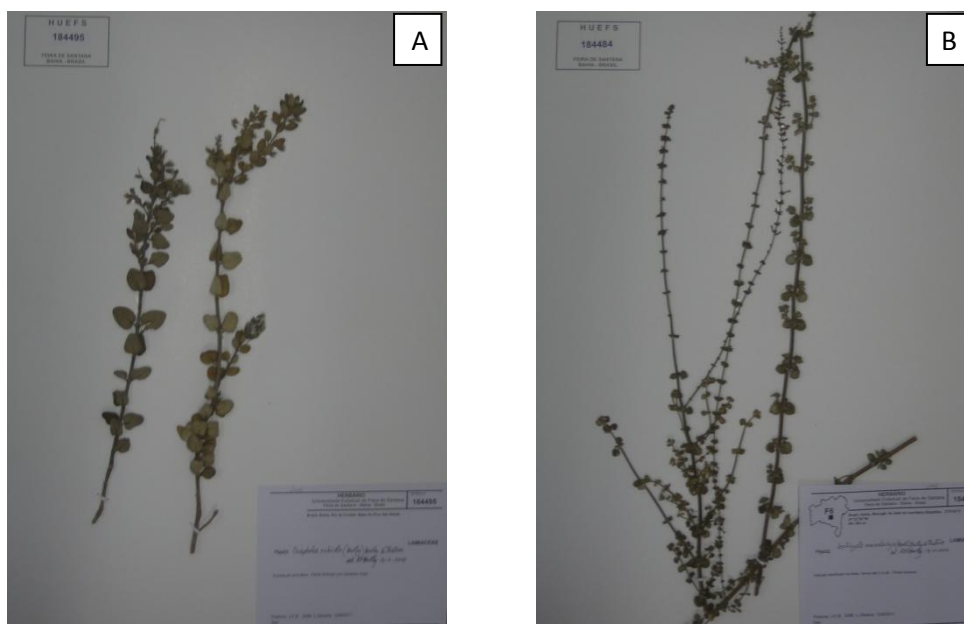


Figura 5 – Exsicatas depositadas no herbário. A) *Oocephalus nubicola* (Harley) Harley & J.F.P. Pastore, B) *Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore.

Fonte: Pesquisa Experimental

3.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DA BIOMASSA

Para a obtenção do teor de umidade presente nas folhas das espécies em estudo, aproximadamente 1g do material vegetal fresco foi pesado e submetido a um determinador de umidade com fonte de calor infravermelho (Figura 6). O teste foi realizado em triplicata e a média aritmética dos resultados foi utilizada como resultado.

A determinação de umidade auxiliará na determinação do rendimento da extração dos óleos essenciais, pois o desconhecimento da quantidade de umidade presente na biomassa pode concorrer para diminuir drasticamente o valor real do teor de óleo presente na biomassa.



Figura 6 – Determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 - Marte®)

3.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Após trituração das folhas, o óleo essencial foi extraído por meio da hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger, conforme especificação da Farmacopeia Brasileira V (2010), com duração de três horas. Ao óleo bruto foi adicionada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, para absorver as moléculas de água que possam estar presentes no óleo; e por fim este foi

armazenado em baixa temperatura, para evitar a degradação e manter a reprodutibilidade das análises.

3.3.1 Cálculo do teor de óleo

Para o cálculo do teor de óleo essencial, utilizou-se a relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal livre de umidade, conforme a equação abaixo:

$$TO = \frac{Vo}{Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100}\right)} \times 100$$

onde,

TO = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração (%).

Vo = volume de óleo extraído (mL).

Bm = biomassa (g)

$\frac{Bm \times U}{100}$ = quantidade de umidade ou água presente na biomassa.

O valor calculado expresso em porcentagem corresponde ao volume (mL de óleo essencial por 100 g de biomassa seca) e indica o valor correto do teor de óleo contido na biomassa seca.

3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os óleos essenciais foram analisados por GC/MS no sistema Shimadzu QP5050A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com um amostrador automático AOC-20i sob as seguintes condições: J&W Scientific DB-5MS com coluna capilar sílica (espessura: 30 m x 0,25 mm i.d., x 0,25 µm, composta de 5%-fenil-95%-metilpolisiloxano) operando no modo elétrico de impacto a 70 eV. Hélio (99.999%) como gás arrastador a um fluxo constante de 1.2 mL/min. O volume de injeção foi 0.5 µL (proporção de 1:100), a temperatura de injeção foi de 250 °C e a

temperatura da fonte-íon foi de 280 °C. A temperatura do forno foi programada para 50°C (isotérmica para 1.5 min), com um aumento de 4 °C/min para 200 °C, então 10 °C/min para 300 °C, finalizando com 10 min. isotérmico para 300 °C. Espectros de massa foram tomados a 70 eV com intervalos de varredura de 0,5 s e fragmentos de 40 a 500 Da.

Análise quantitativa dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID), usando um aparelho Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar ZB-5M5 (5%-fenil-arileno-95%-metilpolisiloxano) coluna capilar sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de espessura), sob as mesmas condições relatadas para o CG-MS. A quantificação de cada constituinte foi estimada por área de normalização (%). As concentrações de componentes foram calculadas de áreas de pico de CG e foram organizadas pela ordem de eluição de CG.

A identificação de componentes individuais dos óleos essenciais foi realizada por correspondência informatizada adquirida para espectro de massa com aquelas armazenadas em bibliotecas de espectro de massa WILEY8, NIST107 e NIST21 do sistema de dados do GC/MS. Índices de retenção (RI) para todos os componentes foram determinados de acordo com a literatura como previamente descrito (ADAMS, 2007).

3.5 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) machos, adultos, com aproximadamente dois meses de idade, peso corporal variando entre 25 a 35g, provenientes da colônia do Biotério Central da UEFS.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de cama de serragem selecionada, com garrafa acoplada a um bico de inox para água, e cocho para ração do tipo peletizada. Os animais tiveram livres acesso a alimentação e

água. A sala foi mantida a uma temperatura de 20 a 22° C e com ciclos de 12 h claro / 12 h escuro, de acordo com os padrões recomendados para roedores (GHIRALDINI, 1995; MERUSSE; LAPICHICK, 1996).

As gaiolas foram transferidas para a sala de experimentação com pelo menos um hora antes do início dos experimentos, a fim de promover uma adaptação do animal ao novo ambiente e evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes do estresse causado pela remoção e manuseio dos animais.

Antes da realização dos experimentos, as bancadas e aparelho foram higienizados com uma solução de etanol a 70%, para evitar qualquer tipo de influência nos resultados.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da UEFS, sob o protocolo n.º 006/2012/CEUA/UEFS (Anexos A e B).

3.6 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS

Para a triagem farmacológica foram utilizados 24 camundongos divididos em quatro grupos de seis animais, já para o teste da barra giratória utilizou-se 60 camundongos divididos em cinco grupos de doze animais. Ambos os testes foram formados por: três grupos tratados com OE nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg; e um grupo controle que recebeu o veículo (NaCl a 0,9% 10 mL/Kg). A droga padrão, utilizada em um dos grupos do teste da barra giratória, foi o Diazepam na dose de 1,5mg/kg de peso corporal.

3.6.1 Triagem farmacológica comportamental

A partir do método descrito por Almeida e Oliveira (2006), onde são estabelecidos critérios comparativos para uma série de comportamentos normalmente exibidos pelos animais (Tabela2), foi realizada a análise dos parâmetros estabelecidos no protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental para observação de possíveis alterações induzidas pelos OE e que possam estar relacionadas com a atividade no SNC.

Após a administração intraperitoneal dos OE e do veículo, os animais foram observados aos 30, 60, 120 e 240 minutos, seguindo o protocolo experimental padrão de comportamento. Após as quatro primeiras horas do experimento, os animais foram mantidos em observação por um período de até 72 horas, para registro da possível ocorrência de mortes.

Tabela 2 - Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (1) (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					

c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTES					
Observações complementares:					

Fonte: ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006.

3.6.2 Teste da barra giratória

O teste da barra giratória foi realizado para verificar uma possível interferência sobre a coordenação motora dos roedores após administração dos óleos essenciais. O aparelho *Rota Rod* é constituído de uma barra giratória não escorregadia, com 5cm de diâmetro, dividida em quatro segmentos iguais, distante 40 cm de pranchas que interrompem automaticamente o contador digital de tempo, quando em contato com os animais que caem da barra. A velocidade de rotação do cilindro por minuto (r.p.m.), o tempo de permanência dos animais na barra, bem como o número de possíveis quedas são controlados e registrados por dispositivos que integram o aparelho (Figura 7).



Figura 7 – Aparelho Rota Rod (modelo EFF 411 - INSIGHT®)

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

No dia seguinte, os camundongos pré-selecionados foram tratados com os óleos essenciais, o veículo e a droga padrão, e submetidos ao teste 60 minutos após o tratamento, para registro do tempo de permanência de cada animal na barra giratória nas mesmas condições do pré-teste.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Para os testes de avaliação da atividade antinociceptiva dos OE foram utilizados 60 camundongos divididos em cinco grupos de doze animais: três grupos tratados com OE nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg; um grupo controle, que recebeu o veículo (NaCl a 0,9% 10 mL/Kg) e um grupo padrão, tratado com indometacina na dose de 10 mg/kg de peso corporal. A indometacina é um fármaco derivado do ácido indolacético que apresenta importantes atividades analgésica, anti-inflamatória e antipirética. É um dos fármacos mais utilizados para o tratamento

da dor leve ou moderada, aguda ou crônica, e das inflamações associadas a diversas síndromes dolorosas (SAKATA; ISSY, 2008).

A escolha das dosagens dos óleos utilizados neste trabalho foi baseado em artigos científicos de antinocicepção (MENEZES, *et al.* 2007; ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008). Os óleos e o veículo foram diluídos com adição de *Tween* 80 a 0,2%, como agente solubilizador.

Após 30 minutos da administração intraperitoneal, os animais entraram em contato com os indutores de nocicepção (químicos), dando início à observação para registro dos parâmetros específicos de cada metodologia. A preparação das doses administradas foi realizada imediatamente antes da realização dos experimentos, utilizando técnicas de solubilização e solventes adequados para cada substância utilizada.

3.7.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Neste teste foi adotada, com algumas alterações, a metodologia descrita por Koster; Anderson; Debeer (1959). O experimento baseia-se na indução de uma resposta nociceptiva por irritação peritoneal, após administração intraperitoneal de ácido acético (0,85%), sendo o efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores.

O ácido acético é considerado um agente químico que irrita a membrana peritoneal do animal provocando comportamentos caracterizados com contrações abdominais, movimentos do corpo como um todo (especialmente das patas traseiras), torção dos músculos abdominais e a redução da coordenação motora (COLLIER *et al.* 1968).

Após trinta minutos da administração intraperitoneal dos óleos essenciais, do veículo e da droga padrão, os animais receberam a administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,85% (0,1 mL/10 g), seguido de um intervalo de 10

minutos para início da observação dos animais por um período de 10 minutos, para registro do número de contorções abdominais exibidas por cada indivíduo.

3.7.2 Teste da formalina

O teste da formalina é um método válido e seguro para o estudo da atividade antinociceptiva em camundongos, sendo considerado um modelo bifásico de comportamento indicativo de dor persistente, produzida pela injeção intraplantar do agente nociceptivo (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

O teste possui duas fases distintas, possivelmente refletindo diferentes tipos de dor: a de origem neurogênica (fase inicial) e a de origem inflamatória (fase tardia). A primeira fase acontece com início imediato, logo após a injeção de formalina com duração de 0 a 5 minutos, na qual há estímulos dos nociceptores locais, principalmente as fibras C (HEAPY, JAMIESON, RUSSEL, 1987). Nessa fase, o animal apresenta sacudidas da pata que recebeu a injeção bem como o comportamento de lambear e/ou dar leves mordidas na região. Em seguida, existe um período de 10 a 15 minutos no qual os animais mostram pouquíssimo comportamento nociceptivo, envolve um período de sensibilização durante o qual a inflamação ocorre. Ela está associada à liberação de diferentes mediadores, como óxido nítrico, substância P, glutamato, entre outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Este teste sugere que drogas analgésicas com mecanismo de ação central inibem ambas as fases, enquanto drogas que atuam periféricamente inibem apenas a segunda fase (OLIVEIRA, DE SOUZA, ALMEIDA, 2008).

Trinta minutos após a administração intraperitoneal dos óleos essenciais, da droga padrão ou do veículo, os animais receberam uma injeção de 20 µL de formalina (solução de formaldeído 2,5%) na região intraplantar da pata posterior direita. Em seguida, foram individualmente colocados na caixa de observação para registro do tempo de lambida da pata (em segundos) por cinco minutos (primeira fase). Após um intervalo de 10 minutos, esse mesmo parâmetro foi registrado durante 15 minutos (segunda fase).

O dispositivo de contenção do animal apresenta uma base triangular, com uma parede de vidro transparente e duas paredes espelhadas, com lados e altura medindo 30 cm e dispostas de forma a propiciar um bom campo de visão para o observador (Figura 8).

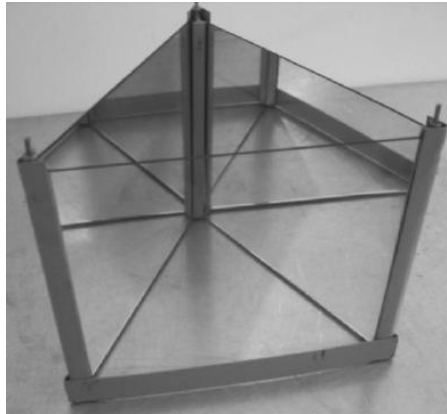


Figura 8 – Caixa de contenção usada no teste da formalina.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett, Foram considerados significativos os resultados quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o *GraphPad Prism* versão 5.0, para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

4. RESULTADOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

A Tabela 3 demonstra o rendimento das hidrodestilações para cada espécie, considerando-se ONU: folhas de *Oocephalusnubicola* e LMA: folhas de *Leptohyptis macrostachys*.

Tabela 3 - Rendimento das hidrodestilações.

Amostra	Massa (g)	Óleo coletado (mL)
ONU	107,41	3,8
LMA	228.40	1,5

ONU = *O. nubicola*; LMA = *L. macrostachys*.
Fonte: Pesquisa Experimental.

As folhas de *O. nubicolae* *L. macrostachys* apresentaram, respectivamente, umidade de 10,91% e 8,12%. A Figura 9 apresenta o comparativo do teor de óleo para as espécies em estudo, indicando que as folhas de *O. nubicola* possuem um maior teor de óleo essencial (volume de óleo para cada 100g de biomassa seca).

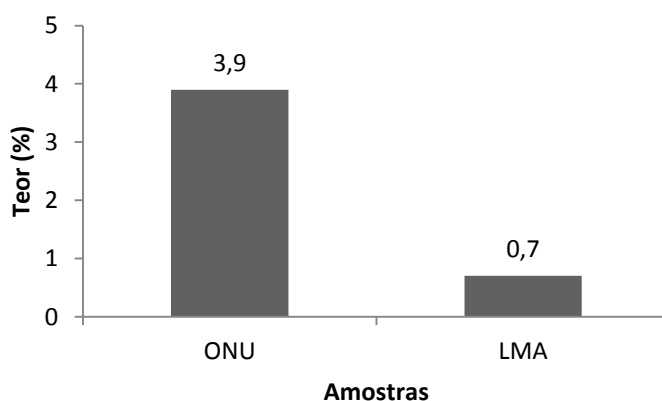


Figura 9—Teor de óleo essencial das espécies em estudo.

ONU = *O. nubicola*; LMA = *L. macrostachys*.
Fonte: Pesquisa Experimental.

Os resultados da avaliação da composição química dos óleos estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Composição química do óleo essencial das folhas de *O. nubicola*.

Pico	Composto	AI_{calc}^a	AI_{lit}^b	%^c
1	α-pineno	936	932	0,95
2	sabineno	976	969	0,35
3	β-pineno	979	974	1,34
4	mirreno	993	988	0,45
5	limoneno	1031	1024	2,13
6	1,8-cineol	1034	1026	7,20
7	fenchona	1093	1083	16,09
8	cânfora	1150	1141	0,54
9	α-gurjuno	1424	1409	0,61
10	E-cariofileno	1432	1417	39,15
11	aromadendreno	1450	1439	1,38
12	α-humuleno	1466	1452	13,23
13	viridifloreno	1506	1496	3,11
14	NI	1549	-	3,10
15	óxido de cariofileno	1598	1582	2,70
16	epóxido de humuleno II	1625	1608	0,41
17	NI	1677	-	7,26
Total de picos identificados				89,64
Total de picos não identificados				10,36

^a Índice Aritmético calculado; ^b Índice Aritmético literatura; ^c Percentual calculado pela área através do método da normalização no cromatograma do CG/FID.

Fonte: Pesquisa Experimental.

O óleo essencial das folhas de *O. nubicola* é composto por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos. Na fração monoterpênica, fenchona é o constituinte majoritário (16,09 %), enquanto que na fração sesquiterpênica E-cariofileno é o composto majoritário (39,15 %), seguido pelo α-humuleno (13,23 %).

Tabela 5 - Composição química do óleo essencial das folhas de *L. macrostachys*.

Pico	Composto	AI_{calc}^a	AI_{lit}^b	%^c
1	α -pineno	936	932	12,27
2	sabineno	976	969	1,79
3	β -pineno	980	974	2,06
4	mirceneno	994	988	28,52
5	ρ -menta-1(7),8-dieno	1007	1003	1,36
6	ρ -cimeno	1027	1020	0,61
7	β -felandreno	1032	1025	14,86
8	1,8-cineol	1034	1026	5,96
9	(Z)- β -ocimeno	1039	1032	0,64
10	(E)- β -ocimeno	1050	1044	3,89
11	γ -terpineno	1062	1054	0,37
12	Terpinoleno	1092	1086	0,79
13	terpinen-4-ol	1182	1174	0,50
14	Timol	1305	1289	0,68
15	α -copaeno	1384	1374	0,34
16	β -elemeno	1399	1389	1,14
17	E-cariofileno	1430	1417	5,57
18	(Z)- β -farneseno	1461	1440	0,84
19	α -humuleno	1465	1452	0,63
20	trans-muurola-4(14),5-dieno	1493	1493	11,62
21	biciclogermacreno	1508	1500	3,72
22	δ -amorfeno	1533	1511	0,40
23	espatulenol	1591	1578	1,43
Total de picos identificados				99,99

^a Índice Aritmético calculado; ^b Índice Aritmético literatura; ^c Percentual calculado pela área através do método da normalização no cromatograma do CG/FID.

Fonte: Pesquisa Experimental.

O óleo essencial das folhas de *L. macrostachys* também é composto por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que houve um aumento considerável na proporção dos constituintes mais voláteis, os monoterpenos, nas folhas desta espécie (Figura 10). Na fração monoterpênica, mirceno é o constituinte majoritário (28,52 %), seguido pelo β -felandreno (14,86 %); já na fração sesquiterpênica trans-muurola-4(14),5-dieno é o composto majoritário (11,63 %).

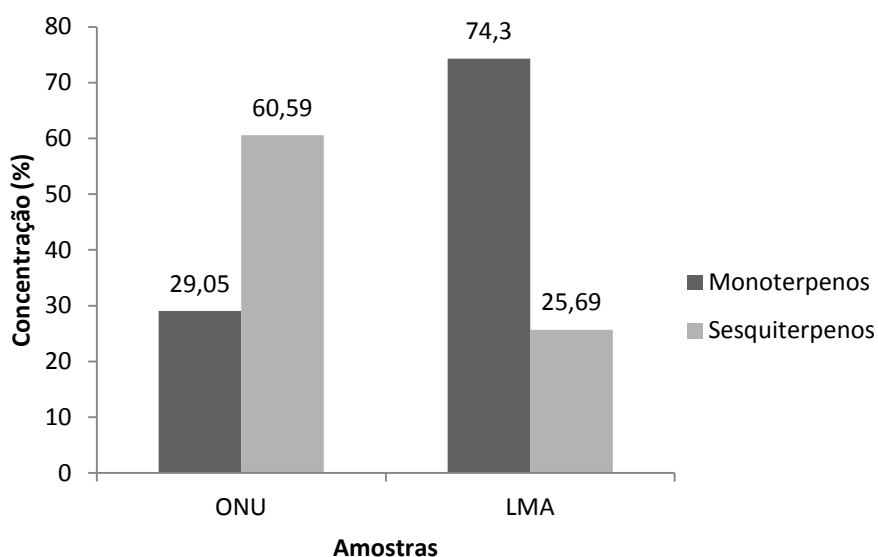


Figura 10 – Comparação entre a concentração dos monoterpenos e sesquiterpenos nas amostras de óleos essenciais.

ONU = *O. nubicola*; LMA = *L. macrostachys*.
Fonte: Pesquisa Experimental.

4.2 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS

4.2.1 Triagem farmacológica comportamental

De acordo com os parâmetros descritos no protocolo utilizado neste experimento, pode-se observar que após a administração dos óleos houve diminuição na hiperatividade e irritabilidade dos animais, bem como notou-se a presença de um efeito analgésico, nas três doses experimentais. Este último efeito, após 60 minutos

de observação, foi mais acentuado quando administrado o óleo de *L. macrostachys*, em comparação ao óleo de *O. nubicola*.

Os animais não demonstraram nenhuma mudança em relação aos demais parâmetros presentes no protocolo. É importante também ressaltar que, em até 72 horas de observação, nenhuma morte foi registrada, bem como nenhum sinal clínico de toxicidade.

4.2.2 Teste da barra giratória

Os animais tratados com os óleos não mostraram alterações no desempenho motor, permanecendo na barra giratória em sessões de 3 minutos de duração. As figuras 11 e 12 mostram o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória (em segundos). Conforme esperado, o diazepam, droga depressora do SNC, diminuiu significativamente o tempo de permanência dos animais no aparelho.

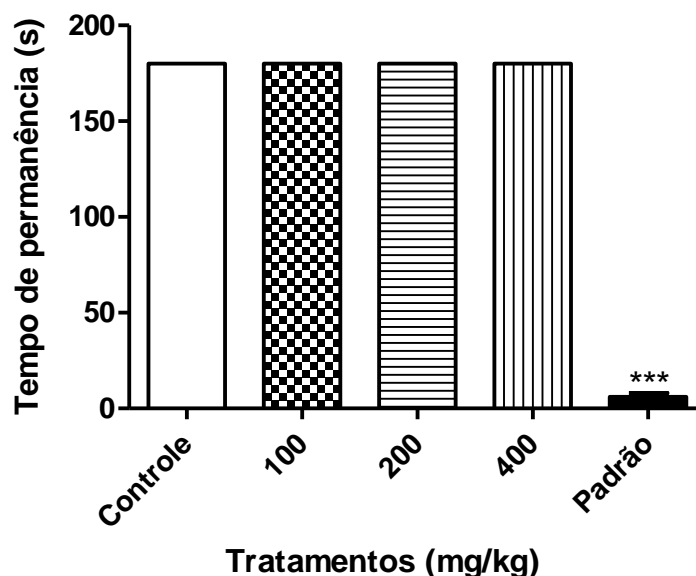


Figura 11 – Efeito do óleo essencial das folhas de *O. nubicola* (100, 200 e 400 mg/kg) no teste da barra giratória em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

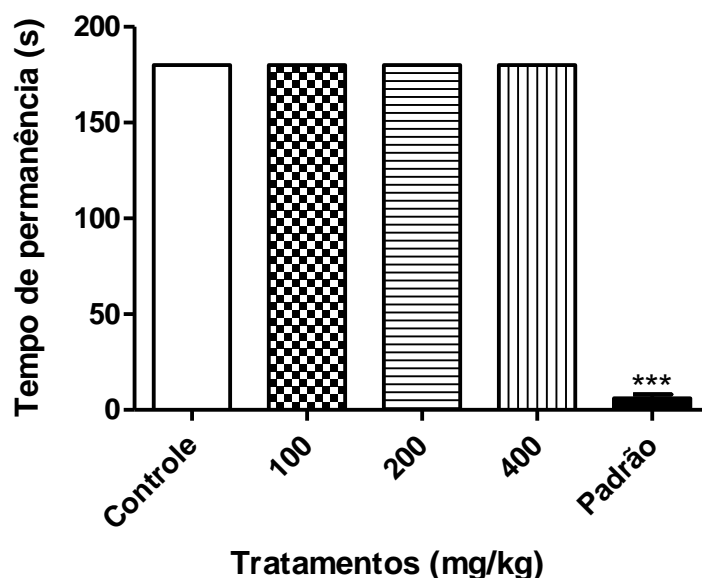


Figura12 – Efeito do óleo essencial das folhas de *L. macrostachys* (100, 200 e 400 mg/kg) no teste da barra giratória em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m.*** $p < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

4.3.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os resultados obtidos por meio do teste demonstraram que os óleos das folhas de *O. nubicola* e *L. macrostachys* apresentaram efeito significativo de antinocicepção em camundongos.

Após o tratamento dos animais com o óleo de *O. nubicola* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg ocorreu uma redução significativa nas contorções abdominais, apresentando valores de $14,2 \pm 3,7$; $2,6 \pm 1,5$ e $9,8 \pm 1,8$ respectivamente, quando comparados ao grupo controle, que apresentou valor de $36,5 \pm 3,6$ contorções (Figura 13).

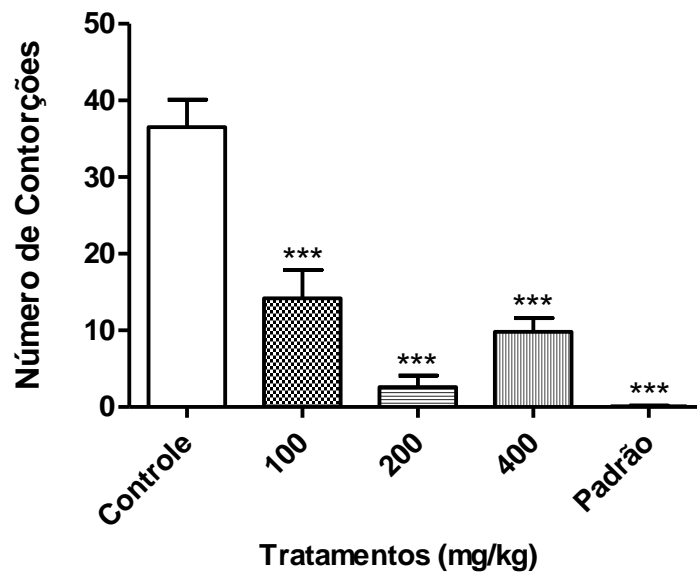


Figura 13 – Efeito do óleo essencial das folhas de *O. nubicola* sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

Os estudos envolvendo o óleo de *L. macrostachys* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg também provocou uma redução significativa nas contorções abdominais nos animais tratados, apresentando valores de $0,4 \pm 0,4$; 0 ± 0 e 0 ± 0 respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle com valor de $31,5 \pm 1,9$ contorções (Figura 14).

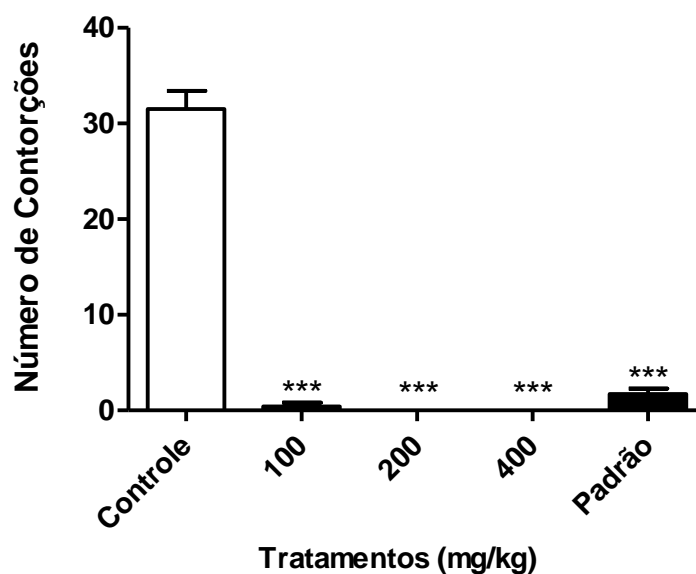


Figura 14 –Efeito do óleo essencial das folhas de *L. macrostachys* sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $P < 0,001$.(ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

A indometacina, droga padrão utilizada no experimento, conforme esperado, reduziu de forma significativa as contorções abdominais nos animais, com valores de $0,1 \pm 0,1$ e $1,7 \pm 0,6$ contorções para os óleos de *O. nubicola* e *L. macrostachys* respectivamente.

4.3.2 Teste da formalina

Com o intuito de confirmar a atividade antinociceptiva dos óleos essenciais, assim como investigar uma possível atividade anti-inflamatória dos mesmos, foi realizado o teste da formalina.

A Figura 15 traz os resultados para os animais tratados com os óleos de *O. nubicola*, mostrando uma redução significativa no tempo de lambida da pata nas três doses experimentais quando comparados ao grupo controle. Na primeira fase (painel A), o tempo de lambida apresentou valores de $10,9 \pm 1,8$; $2,1 \pm 0,7$ e $14,7 \pm$

2,2 segundos para as doses de 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente. Na segunda fase (painel B) este mesmo parâmetro apresentou valores de $27,2 \pm 5,6$; 0 ± 0 e $16,9 \pm 2,8$ segundos nas doses acima. O grupo controle apresentou valores de $37,9 \pm 2,0$ e $94,6 \pm 9,8$ na primeira e segunda fase respectivamente.

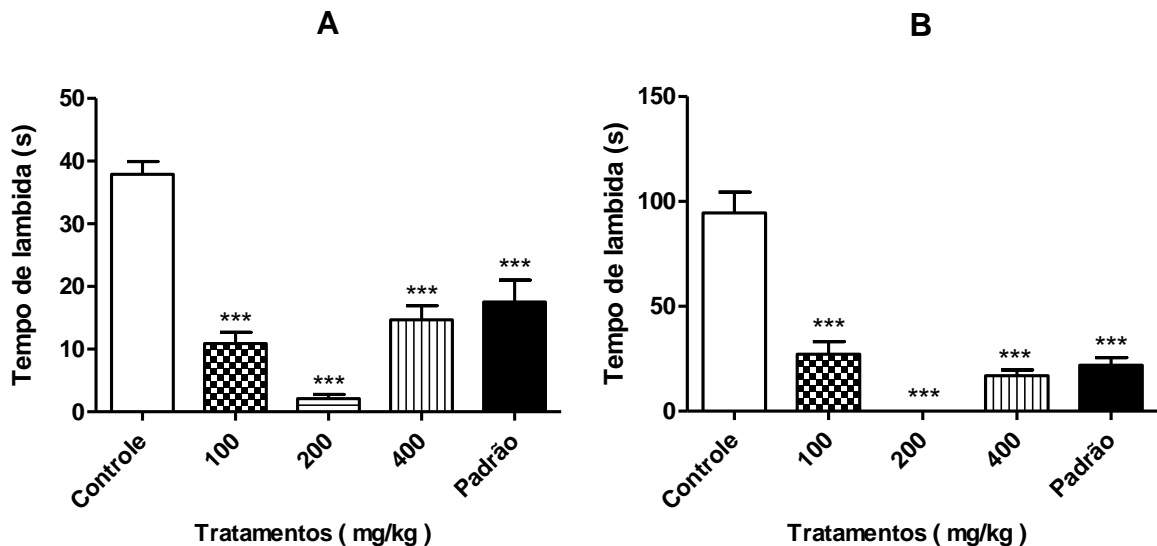


Figura 15 – Efeito do óleo essencial das folhas de *O. nubicola* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos. A nocicepção foi observada na primeira fase (0-5 min painel A) e na segunda fase (15-30 min painel B). Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

O óleo de *L. mascrostachys* também reduziu o tempo de lambida da pata dos animais tratados de forma significativa, nas três doses experimentais e em ambas as fases, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 16). Na primeira fase (painel A) o tempo de lambida foi de $5,9 \pm 0,7$; $7,6 \pm 1,0$ e $22,7 \pm 1,9$ segundos nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente, enquanto que o grupo controle apresentou valor de $43,7 \pm 2,5$ segundos. Já na segunda fase (painel B), este mesmo parâmetro variou entre $2,7 \pm 0,7$; $1,2 \pm 0,6$ e $21,9 \pm 4,1$ segundos nas doses acima relatadas. O grupo controle nesta fase apresentou o valor de $109,6 \pm 2,3$ segundos.

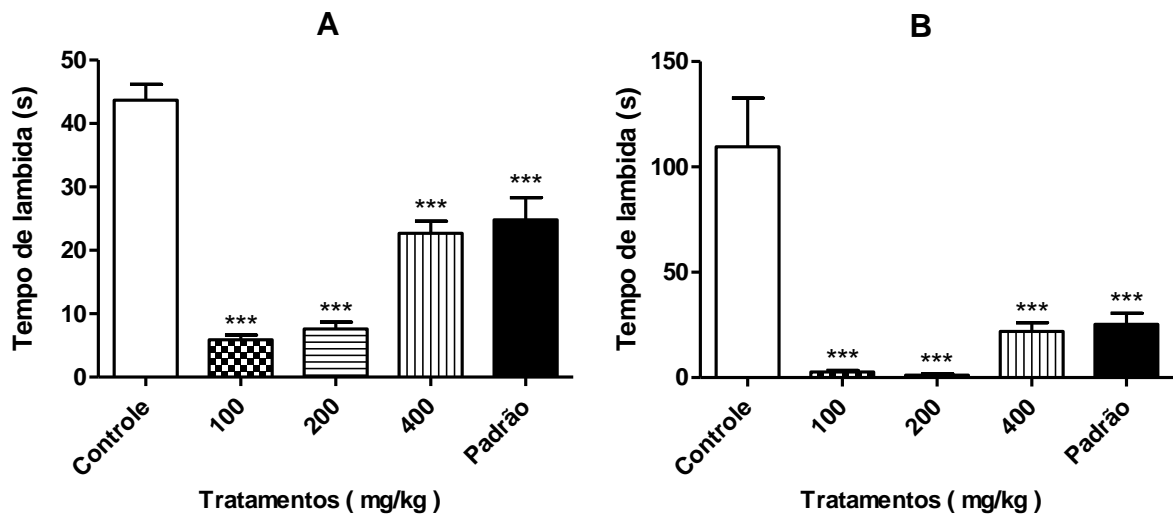


Figura 16 – Efeito do óleo essencial das folhas de *L. macrostachys* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos. A nocicepção foi observada na primeira fase (0-5 min painel A) e na segunda fase (15-30 min painel B). Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Fonte: Pesquisa Experimental.

5. DISCUSSÃO

Há diversos estudos na literatura que demonstram as ações de terpenos sobre a nocicepção. Por exemplo, terpenos do tipo cetona (carvona), aldeído (citronelal), ácido carboxílico (ácido kaurenóico) e éster (jasmonato de metila) apresentam significativa atividade antinociceptiva em roedores (BLOCK *et al*, 2008).

As análises químicas das espécies neste estudo também seguem o padrão de compostos comumente identificadas em óleos essenciais. Os compostos químicos das espécies investigadas neste trabalho estão, em sua grande maioria, de acordo com os relacionados na literatura para subtribo Hyptidinae. Compostos como α -pineno, sabineno, β -pineno, mirceno, p-cimeno, 1-8-cineol, limoneno, γ -terpineno, α -copaeno e espatulenol também foram identificados por Franco e outros (2011) em *Eplingiella fruticosa*. Terpinen-4-ol, fenchona, aromadendreno, α -humuleno e cânfora foram relatados por Martins e outros (2006) em um estudo de variação química do óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens*.

A triagem farmacológica comportamental, primeiro teste farmacológico aplicado aos óleos das espécies em estudo, e importante para avaliação de possíveis efeitos destes no SNC, mostrou alterações comportamentais sugestivas e relevantes, pois diminuiu alguns sinais estimulantes como irritabilidade e hiperatividade. Esse procedimento é útil para determinação de procedimentos específicos a serem realizados para a correta avaliação dos efeitos de uma droga.

Notou-se também, através deste experimento, a presença de um efeito analgésico nas três doses experimentais, em ambas as espécies, sendo mais acentuado quando administrado o óleo de *L. macrostachys* em comparação ao óleo de *O. nubicola*. Esta importante observação, embora primária, já nos aproxima de alguns dos objetivos traçados no estudo.

O teste no aparelho *Rota Rod*, que avalia a influência das drogas na coordenação motora em roedores, trata-se de um método eficiente para avaliar a integridade do sistema motor possibilitando detectar enfraquecimento neurológico,

incluindo ataxia e relaxamento muscular, efeitos característicos de neurotoxicidade provocados pelas drogas depressoras sobre o SNC (PULTRINI, GALINDO, COSTA 2006). As espécies em estudo não promoveram nenhuma alteração na coordenação motora dos animais submetidos ao teste, sugerindo ausência de atividade miorrelaxante.

A partir das constatações observadas nos testes farmacológicos acima, seguiu-se a avaliação da atividade antinociceptiva por meio do teste das contorções abdominais. Os estudos de nocicepção utilizam modelos animais de laboratório para verificar a atividade analgésica de compostos sintéticos ou naturais. De uma maneira geral, tais modelos apresentam características próprias, como simplicidade, boa reprodutibilidade e viabilidade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos(ROCHA, 2010).

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético tem sido amplamente utilizado como um modelo da nocicepção visceral quimicamente induzida. A injeção intraperitoneal de ácido acético induz hiperalgesia mecânica e tem demonstrado que os eicosanóides e aminas simpatomiméticas estão envolvidas na geração da dor neste modelo. Além disso, o ácido acético intraperitoneal induz a liberação de citocinas, que têm demonstrado desempenhar um papel importante no desenvolvimento de processos inflamatórios locais e sistêmicos, tais como a migração das células, edema, e hiperalgesia (HONORE, 2002). A eficácia dos anti-inflamatórios não-hormonais (AINES) em reduzir a dor é resultado da capacidade em inibir as ciclooxigenases 1 e 2, enzimas importantes na síntese das prostaglandinas, que contribuem para a sensibilização do nociceptor (RODRIGUES; FRACASSO; SIQUEIRA, 2007).

Utilizando a metodologia do ácido acético, foi possível verificar que ambos os óleos evidenciaram uma ótima atividade antinociceptiva. O efeito inibitório nas contorções abdominais provavelmente ocorreu pela inibição direta da liberação dos mediadores inflamatórios. No entanto, apesar deste teste ser uma boa ferramenta em ensaios farmacológicos, ele apresenta baixa especificidade, uma vez que diferentes classes de drogas podem inibir as contorções (VANE; BOTTING, 1998).

Para confirmar o efeito antinociceptivo dos óleos foi realizado o teste da formalina. Este segundo teste possui interpretação em duas diferentes fases, que caracterizam tipos diferentes de dor: a de origem neurogênica (primeira fase), resulta da estimulação química direta das fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas (fibras C), e a de origem inflamatória (segunda fase) que resulta da ação de mediadores inflamatórios liberados no tecido periférico. É considerado ainda um teste mais específico, uma vez que os analgésicos de ação central inibem as duas fases, enquanto que drogas de ação periférica, como os anti-inflamatórios e corticóides, inibem somente a segunda fase (OLIVEIRA, DE SOUZA, ALMEIDA, 2008).

Como os óleos essenciais das folhas das duas espécies em estudo inibiram ambas as fases, podemos deduzir que o mecanismo analgésico observado é de ação central. Além disso, como a segunda fase é caracterizada por um processo inflamatório, a qual tem alta sensibilidade aos AINES, como a indometacina, os resultados observados nessa fase fornecem fortes indícios também de ação anti-inflamatória.

A diminuição do efeito antinociceptivo quando aumentada a dose administrada, fenômeno observado em ambos os testes farmacológicos aplicados, pode ser explicado pelo chamado efeito *hormesis*. Este fenômeno caracteriza a dose-resposta como estimuladora em baixas doses e inibidora em doses elevadas, conduzindo a uma curva bifásica, ou em forma de “U” (BALDWIN; CALABRESE, 2001).

Outras espécies pertencentes a subtribo Hyptidinae já mostraram atividade antinociceptiva frente a modelos animais, como o óleo essencial e o extrato aquoso de *H. Fruticosa* (MENEZES *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2006). O óleo essencial de *Hyptis pectinata* apresentou efeito antinociceptivo, provavelmente mediado por opióides e receptores colinérgicos, além de atividade anti-inflamatória através da inibição do óxido nítrico e produção de prostaglandinas PGE2 (ARRIGONI-BLANK *et al*, 2008; RAYMUNDO *et al*, 2011). Bravim (2008) demonstrou que o óleo de *Hyptis crenata* apresenta atividade antinociceptiva provavelmente através da ação direta

sobre as fibras nociceptivas, além de sugerir uma atividade anti-inflamatória de origem periférica.

Muitos metabólitos secundários derivados de plantas já foram descritos na literatura por possuírem efeito terapêutico benéfico em diferentes desordens da dor (FALCÃO *et al*, 2005; RODRIGUES, DUARTE-ALMEIDA, PIRES, 2010; ZHAO *et al*, 2012). Alguns dos compostos identificados nas espécies em estudo já foram descritos na literatura por apresentar importantes atividades analgésicas e/ou anti-inflamatórias, corroborando desta forma com os resultados encontrados nas análises farmacológicas deste trabalho.

O monoterpeno limoneno, comumente encontrado em plantas medicinais, mostrou inibição significativa da nocicepção induzida pelo ácido acético intraperitonal e na segunda fase do teste da formalina em camundongos (AMARAL *et al*, 2007). O monoterpeno p-cimeno também já apresentou propriedades farmacológicas relacionadas à inflamação e processos relacionados à dor, sendo potencialmente útil no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, foi o que constatou Quintans-Júnior e outros (2013) através de testes específicos em camundongos.

Estudos recentes já definiram, inclusive, um possível mecanismo de ação do monoterpeno α -felandreno no efeito antinociceptivo em camundongos, envolvendo os sistemas glutamatérgicos, opióides, nitrérgicos, colinérgicos e adrenérgicos(LIMA *et al*, 2012). Mirceno, o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *L. macrostachys* neste estudo, já teve seu potencial antinociceptivo descrito por Lorenzetti e outros (1991), sendo seu efeito semelhante aos opiáceos de ação periférica ou dipirona (CALIXTO *et al*, 2000).

Tendo em vista os resultados obtidos, são necessários mais estudos que realizem a correlação entre a constituição química das espécies, a atividade antinociceptiva e seu mecanismo de ação, possibilitando assim uma melhor compreensão da influência dos compostos na atividade, inclusive com a determinação do(s) composto(s) responsável(eis) pela mesma.

Nenhum dado etnofarmacológico foi encontrado na literatura para a espécie *O. nubicola*, ao passo em que foram encontradas algumas evidências de uso de *L. macrostachys* na medicina popular, especialmente no tratamento de patologias associadas às vias respiratórias. Desta forma, os resultados evidenciados neste trabalho, poderão abrir novas perspectivas no campo da pesquisa com óleos essenciais extraídos de plantas oriundas do semiárido do Estado da Bahia.

É interessante, portanto, que estudos na área de produtos naturais de uma maneira geral sejam estimulados no intuito de se conhecerem melhor suas atividades biológicas, uma vez que, além da sua atividade individual, podem ser associados a outros produtos, auxiliando então no desenvolvimento de novos fármacos.

6. CONCLUSÃO

- Os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies em estudo são compostos por misturas de monoterpenos e sesquiterpenos, com variações quantitativas e qualitativas entre si.
- Os óleos causaram alterações comportamentais em três parâmetros estabelecidos no protocolo experimental utilizado: diminuição da hiperatividade e irritabilidade, além de uma considerável atividade analgésica;
- Os óleos essenciais não afetaram a coordenação motora dos animais, diante do teste da barra giratória.
- O estudo sugere que ambos os óleos possuem propriedades antinociceptivas, nas três doses experimentais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGRA, M. F. *et al.* **Levantamento das plantas medicinais usadas na região Nordeste do Brasil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AHARONI A. *et al.* Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5: p. 49-58, 2006.
- ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ALVES NETO, O. *et al.* **Dor: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- AMARAL, J. F. *et al.* Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v.15, p. 334-339, 2008.
- ARRUDA, T. A. *et al.* Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 307-311, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALDWIN, L. A.; CALABRESE, E. J. Hormesis: U-shaped dose response and their centrality in toxicology. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 6, 2001.
- BASBAUM, A.; BUSHNELL, M. C. Pain: basic mechanisms. In: GUAMBERARDINO, M. A. **Pain: an updated review**. International Association for the Study of Pain. Seattle: IASP Press, 2002.
- BIASI, L. A.; DECHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1 ed. Curitiba: Layer Studio Grafico e Editora, 2009.

BLOCK, L. C. *et al.* Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85-89, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRAVIM, L. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth**, 2008. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará.

CALIXTO, J. B *et al.* Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants, **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-428, 2000.

CAMPOS, N. **Aprendendo com a mãe terra**: plantas medicinais, aromáticas e condimentares. São Paulo: Arte & Ciência, 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CARVALHO A. C. B. *et al.* Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 467-473, 2011.

COLE, M. D. The significance of the terpenóides in the Labiatae. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 315-324, 1992.

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

CORAZZA, S. **Aromacologia**: uma ciência de muitos cheiros. São Paulo: SENAC, 2002.

DE SOUZA, I. L. L. *et al.* **Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae)**. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 7, p. 2436-2443, 2013.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 2009.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, n. 7, out. 2006.

DUARTE, M. C. *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-202, 2007.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 84, p. 69-74, 2003.

FALCÃO, H. S. *et al.* Review of plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 381-391, 2005.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FLORÃO, A. **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de Baccharis, Asteraceae**, 2006. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

FRANCO, C. R. P. *et al.* Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 24-32, 2011.

GHIRALDINI, M. A. **Curso: Animais de experimentação**. São Paulo. 70 p. 1995

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. O instituto do milênio do semi-árido (Insear), Brasil (2002-2006). In: GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. (Ed.). **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, v. 1, 2006.

GIULIETTI, A. M. *et al.* **Plantas raras do Brasil**. Conservação Internacional: Belo Horizonte, 2009.

HARLEY, R. M. The Labiatae of Bahia: a preliminary check-list. **Sitientibus**. Feira de Santana, n. 15, p. 11-21, 1996.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological review. **Phytotaxa**, v. 58, p.1-55, 2012.

HEAPY, C. G.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N. J. W. Afferent C-fibres and Adelta activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 90, p. 164-170, 1987.

HONORE, P. *et al.* TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acid-induced abdominal contraction in mice: comparison with reference analgesics. **Pain**, v. 96, p. 99-105, 2002.

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

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 1-12, 2008.

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

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LIMA, D. F. *et al.* Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 284-292, 2012.

LORENZZETI, B. B. *et al.* Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 43-48, 1991.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1203 a 1209, 2006.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 462-471, 2002.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiaceae**, 1994. Dissertação (Mestrado). Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: LUCA, R. R. *et al.* eds. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação animal, 1996. cap. 3, p. 15-25.

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

NOVAIS, T. S. *et al.* Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 5-8, 2003.

NUNES, X. P. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.642-644, 2006.

OLIVEIRA, F. S.; DE SOUSA D. P.; ALMEIDA R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 588-591, 2008.

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

QUINTANS-JÚNIOR, L. *et al.* Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, p-cymene and geranyl acetate in experimental models. **ISNR Toxicology**, v. 2013, 2013.

RAYMUNDO, L. R. P. *et al.* Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 725-732, 2011.

RICHARDSON, P. M. The chemistry of Labiatae: an introduction and overview. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 291-297, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROCHA, M.L. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do monoterpeno α,β -Epoxi-carvona e seu efeito sobre a neurotransmissão glutamatérgica**, 2010. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F.; SIQUEIRA, C. E. Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2007.

RODRIGUES, E., DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos cablocos do Parque Nacional de Jaú (AM)

como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 981-991, 2010.

SAKATA, R. K. ISSY, A. M. **Guia de dor**. 1. ed. Barueri: Manole, 2004.

SAKATA, R. K. ISSY, A. M. **Fármacos para tratamento da dor**. 1. ed. Barueri: Manole, 2008.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007.

SIANI, A. C. *et al.* Óleos Essenciais: Potencial Antiinflamatório. **Biociência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, A. B. L. *et al.* Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, 475-479, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007.

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007.

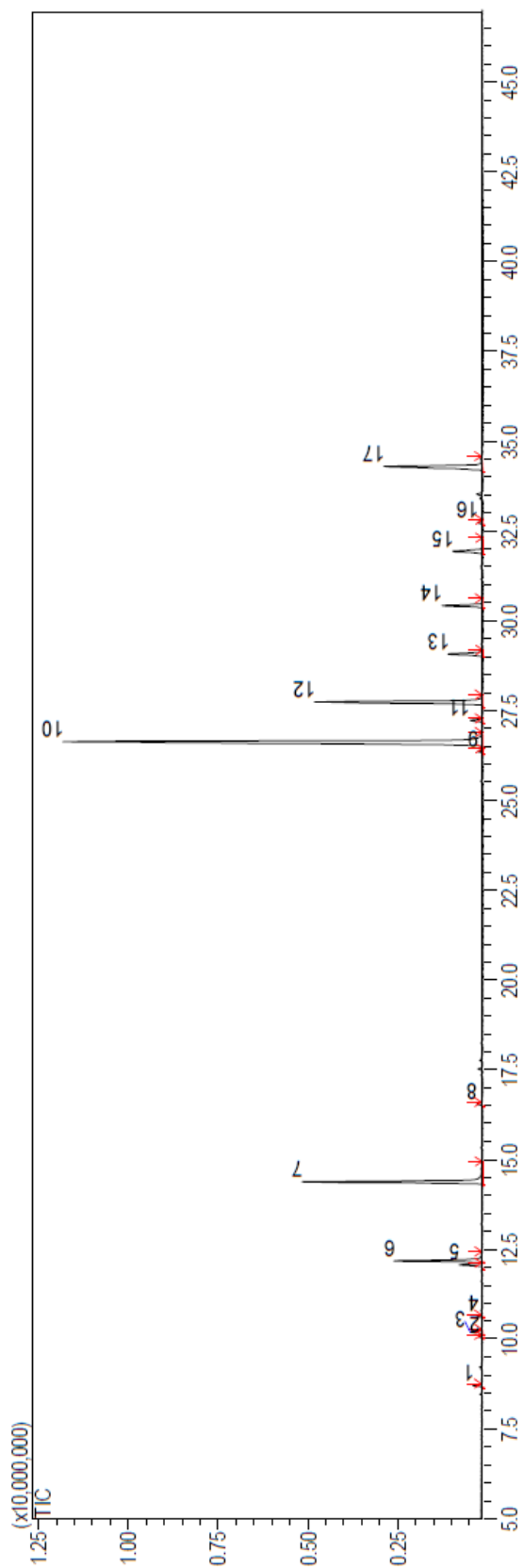
TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, 2001.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **International Journal Tissue Reactions**, v. 20, p. 3-15, 1998).

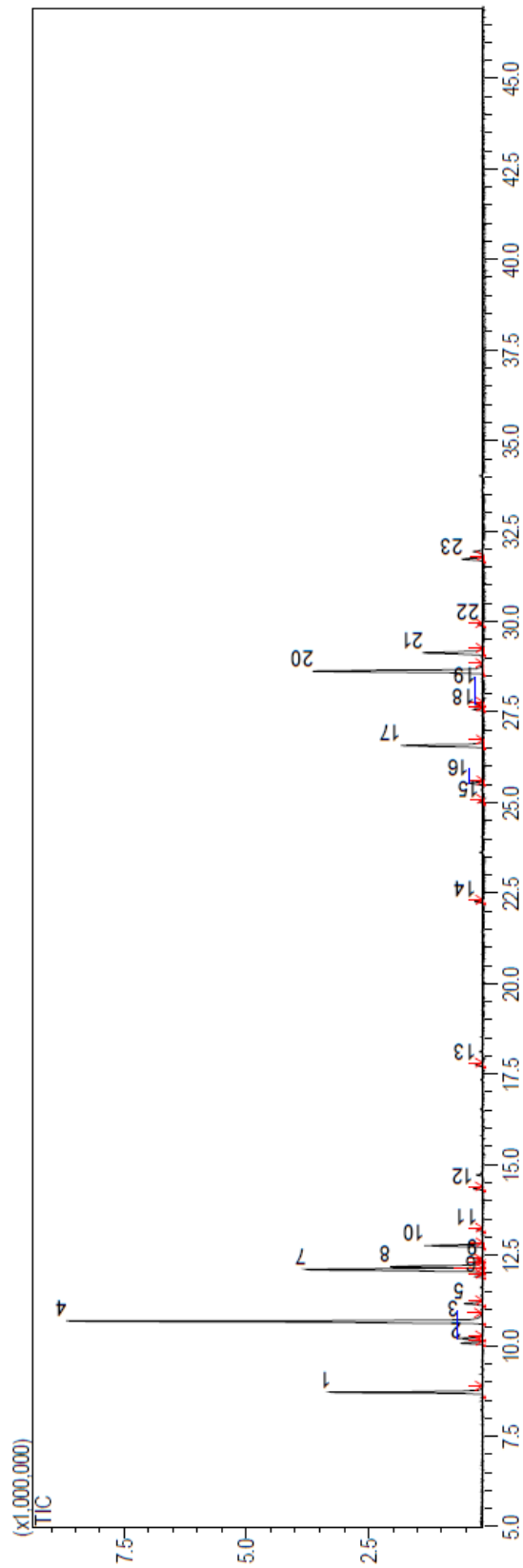
VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

ZHAO, J. *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 367-373, 2012.

APÊNDICE A – Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *O. nubicola*



APÊNDICE B – Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *L. macrostachys*



Anexo A – Declaração da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o projeto de pesquisa: “**Rede de pesquisa em bioprospecção e uso sustentável de espécies vegetais nativas do semiárido para a produção de compostos bioativos**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira e Profª Drª Marilene Lopes da Rocha e Profª Drª Angelica Maria Lucchese e Profª Carla Cardeal Mendes, deu entrada na CEUA/UEFS, para ser analisado, em novembro de 2012, tendo sido registrado sob protocolo de número 006/2012. Entretanto, a conclusão da sua análise só foi possível após os responsáveis pelo projeto terem enviado em 13 de junho de 2013, os esclarecimentos, retificações e justificativas sobre o número de animais a serem utilizados no projeto e nos subprojetos. **Subprojeto 1:** Avaliação da atividade antinociceptiva e inflamatória do extrato e frações de *Hyptis leucocephala* Marth (LAMIACEAE) em modelo animal. (orientanda: Valéria Silva Goes). **Subprojeto 2:** Estudo da composição química e da atividade antinociceptiva dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Hyptis*. Orientando: (Robson Dias). **Subprojeto 3:** Investigação de atividade química e biológica de plantas do gênero *Lippia*. (Orientanda: Carine Oliveira dos Santos). Os termos de compromisso e as folhas de rosto foram assinadas e entregues na CEUA em 08 de julho de 2013, a fim de que todas as pendências tivessem sido atendidas pelos pesquisadores para a finalização do parecer.

Esta declaração vai por mim assinada, visto que o parecerista foi favorável à execução do projeto.

PARECER FAVORÁVEL À EXECUÇÃO DO PROJETO, pois está em consonância com as normas éticas no uso de animais na experimentação, assim como foi considerado relevante por ser um projeto amplo, interinstitucional e multidisciplinar, que irá gerar conhecimento. O parecer foi aprovado pela CEUA *ad referendum* em 05 de agosto de 2013.//

Feira de Santana, 05 de agosto de 2013.

Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora em exercício da CEUA-UEFS

Portaria nº 878/2012

Anexo B – Parecer final da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS)

PARECER FINAL

Protocolo nº 006/2012

Ao analisarmos o projeto de pesquisa: **“Rede de pesquisa em bioprospecção e uso sustentável de espécies vegetais nativas do semiárido para a produção de compostos bioativos”** e seus subprojetos, verificamos que a pesquisa está em consonância com as normas éticas no uso de animais na experimentação, assim como consideramos que o projeto é relevante por ser um projeto amplo, interinstitucional e multidisciplinar, que vai gerar conhecimentos, formar jovens pesquisadores. Além de serem exequíveis, seus objetivos buscam responder cientificamente se as espécies vegetais nativas do semiárido têm potencial para a produção de compostos bioativos para alívio da dor. Pelo exposto, salvo melhor juízo, sou **FAVORÁVEL** à execução do projeto.//

