

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Atividade Antiinflamatória, Antinociceptiva e
Gastroprotetora do Óleo Essencial de
Croton sonderianus Muell. Arg.**

JEFERSON FALCÃO DO AMARAL

FORTALEZA-CE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Atividade Antiinflamatória, Antinociceptiva e
Gastroprotetora do Óleo Essencial de
Croton sonderianus Muell. Arg.**

Jeferson Falcão do Amaral

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos

2004

A514a Amaral, Jeferson Falcão do

Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. / JEFERSON FALCÃO DO AMARAL – Fortaleza, 2004.

150f. il.

Orientadora: Profª. Dra. Flávia Almeida Santos

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Mediadores da inflamação - farmacologia 2. Croton 3. Mediação da dor 4. Úlcera - terapia

I. Santos, Flávia Almeida (Orient.) II. Título.

Atividade Antiinflamatória, Antinociceptiva e Gastroprotetora do Óleo Essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Data da defesa: 21 / 05 / 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos

Prof^ª. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

Prof^ª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

A Deus, por permitir a realização deste trabalho

*Aos meus pais José Maria Pereira do Amaral
e Maria das Graças Falcão do Amaral, pela
dedicação de uma vida em prol dos meus estudos*

Aos meus irmãos Glaydson e Amanda

*A minha esposa Rejane Campos do Amaral
pelo Amor, incentivo e colaboração*

Aos amigos Lúcia Campos e Edilson Campos

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Flávia Almeida Santos pela paciência, objetividade e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao pela co-orientação e pela contribuição a este trabalho.

*Ao Prof. Edilberto Rocha Silveira e ao Doutorando Cláudio Costa dos Santos pelo fornecimento e análise fitoquímica do material, o óleo essencial de *Croton sonderianus*.*

À Farmacêutica-bioquímica Regilane Matos da Silva pela amizade, apoio e incentivo de sempre.

Ao Prof. Francisco de Assis Oliveira pela amizade, incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais: Prof^ª. Luilma Gurgel, Prof^ª. Adriana Rolim, Laura Andrea, Karina Moreira e Roberto César.

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Produtos Naturais: Apoliana, Hermes, Rafaela, Fabrício, Ítalo, Kelcyana, Alana, Soraya, Wilcare e Cinthia pela colaboração na realização dos experimentos.

Aos amigos Jocília, Onofre, Riana e Clerton pelo incentivo e colaboração durante a minha vida estudantil.

Aos meus amigos (“irmãos”) Pedro Jorge, Katiuscia, Georgia, Marcos, Alysson, Alexsandro, Emmanoel, Helaine, Nádia, Fernanda, André, Greysiani, Yolanda, Aurenívea e Viviane pela amizade indispensável.

A Prof^ª. Rejane Campos do Amaral pela correção ortográfica deste trabalho.

A Sílvia e Áurea, Secretárias da Pós-Graduação, pela disponibilidade necessária no decorrer do curso.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia desta Universidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Um especialista é um homem que sabe
cada vez mais sobre cada vez menos.”

Dr. William J. Mayo

SUMÁRIO

Lista de Siglas	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvii
RESUMO	xix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Óleos essenciais	5
1.3. Composição química dos óleos essenciais	9
1.4. Farmacologia de óleos essenciais	12
1.5. O gênero <i>Croton</i>	15
1.6. <i>Croton sonderianus</i> Muell. Arg.	17
1.6.1. Descrição botânica, distribuição geográfica e aspectos gerais	17
1.6.2. Análise química	19
1.6.3. Constituintes químicos: química e farmacologia	24
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS	37
3.1. Material botânico	37
3.2. Animais experimentais	37
3.3. Reagentes e drogas	39
3.4. Equipamentos	40

4. MÉTODOS	42
4.1. Obtenção do óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i>	42
4.2. Toxicidade aguda	44
4.3. Atividade Antiinflamatória	44
4.3.1. Edema de pata induzido por Carragenina	44
4.3.2. Edema de pata induzido por Dextrana	45
4.3.3. Edema de Orelha induzido por Óleo de <i>Croton</i>	45
4.4. Atividade Antinociceptiva	46
4.4.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	46
4.4.2. Teste da Formalina	46
4.4.3. Teste da Placa Quente	47
4.4.4. Teste da nocicepção induzida por capsaicina	47
4.4.5. Tempo de Sono induzido por Pentobarbital	48
4.4.6. Atividade motora espontânea	49
4.5. Atividade sobre o Trato Gastrintestinal	50
4.5.1. Avaliação do efeito na Motilidade Intestinal	50
4.5.2. Úlcera gástrica induzida por Etanol	51
4.5.3. Úlcera gástrica induzida por indometacina	51
4.6. Análise estatística	52

5. RESULTADOS	54
5.1. Obtenção e composição química do óleo essencial de <i>C.sonderianus</i>	54
5.2. Toxicidade aguda do OECS	55
5.3. Atividade Antiinflamatória	55
5.3.1.Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos	55
5.3.2.Efeito do OECS no edema de pata induzido por Dextrana em camundongos	55
5.3.3.Efeito do OECS no edema de orelha induzido por Óleo de <i>Croton</i> em camundongos	56
5.4. Atividade antinociceptiva	63
5.4.1.Efeito do OECS na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	63
5.4.2.Efeito do OECS na nocicepção induzida por formalina em camundongos	63
5.4.3.Efeito do OECS no teste da Placa Quente em camundongos	64
5.4.4.Efeito do OECS na nocicepção induzida por Capsaicina em camundongos	65
5.4.5.Efeito do OECS no tempo de sono induzido por Pentobarbital em camundongos	75
5.4.6.Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos	75
5.5. Atividade sobre o Trato Gastrintestinal	80
5.5.1.Efeito do OECS sobre a Motilidade Intestinal em camundongos	80

5.5.2.Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Etanol em camundongos	80
5.5.3.Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos	85
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	105
SUMMARY	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
AAS	Ácido acetilsalicílico
abs	Absoluto
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cm	Centímetro (s)
<i>C. sonderianus</i>	<i>Croton sonderianus</i>
DAINES	Drogas Antiinflamatórias Não-Estereoidais
E.P.M.	Erro Padrão da Média
et al.	...e colaboradores
eV	Eletrovolt (s)
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma (s)
h	Hora (s)
5-HT	Serotonina
HCl	Ácido clorídrico
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal

K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
Kg	Kilograma (s)
m	Metro (s)
mg	Miligrama (s)
MHz	Megahertz
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
n ou n ^o	Número
ns	Não significativo
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Grau (s) centígrado (s)
OECS	Óleo Essencial de <i>Croton sonderianus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORL1	Opioid receptor like 1
P.A.	Para análise
PGs	Prostaglandinas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s.c.	Subcutânea
seg.	Segundo (s)
SNC	Sistema Nervoso Central
sp.	Espécies
t	Tempo
UFC	Universidade Federal do Ceará
USA	United States of America

UVA	Ultravioleta
v.o.	Via oral
vs	Versus
v/v	Volume por volume

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
TABELA 1	Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos	57
TABELA 2	Efeito do OECS no edema de pata induzido por dextrana em camundongos	59
TABELA 3	Efeito do OECS no edema de orelha induzido por óleo de <i>Croton</i> em camundongos	61
TABELA 4	Efeito do OECS no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	66
TABELA 5	Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos	68
TABELA 6	Efeito do OECS no teste da placa quente em camundongos	71
TABELA 7	Efeito do OECS no teste da nocicepção induzida por capsaicina em camundongos	73
TABELA 8	Efeito do OECS sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	76
TABELA 9	Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos	78
TABELA 10	Efeito do OECS no trânsito intestinal em camundongos	81

TABELA 11	Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	83
TABELA 12	Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		Página
FIGURA 1	Áreas ocupadas com (<i>Croton sonderianus</i>) no Nordeste	20
FIGURA 2	Aspecto geral da planta (<i>C. sonderianus</i>)	21
FIGURA 3	Aspecto dos ramos de <i>C. sonderianus</i>	22
FIGURA 4	Estruturas químicas dos constituintes voláteis do óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i> Muell. Arg.	23
FIGURA 5	Aspectos da excicata nº 31423 de <i>C. sonderianus</i>	38
FIGURA 6	Método de extração do óleo essencial de <i>C. sonderianus</i>	43
FIGURA 7	Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos	58
FIGURA 8	Efeito do OECS no edema de pata induzido por dextrana em camundongos	60
FIGURA 9	Efeito do OECS no edema de orelha induzido por Óleo de <i>Croton</i> em camundongos	62
FIGURA 10	Efeito do OECS sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	67
FIGURA 11A	Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos	69
FIGURA 11B	Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos	70
FIGURA 12	Efeito do OECS no teste da Placa Quente em camundongos	72
FIGURA 13	Efeito do OECS no teste da Capsaicina em camundongos	74
FIGURA 14	Efeito do OECS sobre o tempo de sono induzido por Pentobarbital em camundongos	77

- FIGURA 15** Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos 79
- FIGURA 16** Efeito do OECS sobre o trânsito intestinal em camundongos 82
- FIGURA 17** Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Etanol em camundongos 84
- FIGURA 18** Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos 87

RESUMO

Atividade Antiinflamatória, Antinociceptiva e Gastroprotetora do Óleo Essencial de *Croton Sonderianus* Muell. Arg. Jeferson Falcão do Amaral. Orientadora: Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2004. O *Croton sonderianus*, conhecido como marmeleiro-preto, é popularmente empregado no tratamento de hemorragia uterina, dores de estômago, vômitos e diarreia. No presente estudo, o óleo essencial (OECS), extraído das folhas de *Croton sonderianus*, foi avaliado em modelos animais de inflamação aguda, nocicepção e nos testes de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina; todos os experimentos foram realizados em camundongos machos. Em modelos de inflamação aguda, OECS não foi eficaz em inibir o edema de pata induzido por carragenina, no entanto, indometacina inibiu significativamente o edema. O OECS 200 mg/Kg (v.o.) foi capaz de reduzir o edema de pata, induzido por dextrana, de maneira similar a ciproptadina, um antagonista H₁ e 5-HT. Em adição, OECS 100 e 200 mg/Kg (v.o.) foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de *Croton*. Estes resultados sugerem que a atividade antiinflamatória de OECS pode estar relacionada a inibição da liberação de mediadores inflamatórios, tais como histamina e serotonina, mais do que a inibição da síntese e/ou liberação de PGs. O OECS mostrou efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg (v.o.), de maneira similar ao AAS. No teste da formalina, OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.) exerceu significativa (p<0,01) atividade antinociceptiva nas duas fases do teste; morfina 7,5 mg/Kg (i.p.) exibiu um significativo (p<0,01) efeito antinociceptivo em ambas as fases. A naloxona 1 mg/Kg (s.c.), um antagonista opióide, não foi capaz de reverter a antinocicepção induzida por OECS 100 mg/Kg (v.o.); contudo, a glibenclamida 2 mg/Kg (i.p.), um antagonista dos canais K_{ATP}, reverteu significativamente (p<0,05) a antinocicepção induzida por OECS 100 mg/Kg (v.o.) nas duas fases do teste. Em adição, OECS 50, 100 e 200 mg/Kg (v.o.) exibiu um significativo efeito antinociceptivo no teste da nocicepção induzida por capsaicina; um modelo semelhante a 1^a fase do teste da formalina. Naloxona não reverteu a antinocicepção induzida por OECS 100 mg/Kg (v.o.); no entanto, glibenclamida reverteu significativamente este efeito no teste da capsaicina. Estes resultados sugerem a participação dos receptores órfãos do tipo (ORL1) no efeito do OECS; estes receptores possuem 60% de homologia com receptores opióides, são associados à canais de K_{ATP} e são sensíveis a glibenclamida, mas insensíveis a naloxona. OECS parece exercer ação analgésica periférica e/ou espinal mais do que supraespinal, já que OECS não aumentou o tempo de latência à placa quente (51 ± 0,5 ° C). No teste do tempo

de sono induzido por pentobarbital, OECS falhou em prolongar o período de sono; OECS, também, não alterou a frequência de locomoção dos animais, sugerindo que OECS não exerce atividade antinociceptiva por ação sedativa/depressora do SNC. Nas lesões gástricas induzidas por etanol, OECS 50 e 200 mg/Kg (v.o.) inibiu as lesões de maneira similar a capsaicina 5 mg/Kg (v.o.), um estimulante da produção de muco, e a NAC 750 mg/Kg (v.o.), um antioxidante celular. O OECS 50 mg/Kg (v.o.) reduziu lesões gástricas, induzidas por indometacina 20 mg/Kg, v.o., de maneira similar a cimetidina 100 mg/Kg (v.o.), um antagonista H₂. O OECS não alterou o trânsito intestinal e, também, não alterou padrões fisiológicos ou comportamentais e não induziu mortalidade, aos animais, no modelo de toxicidade aguda. Em conclusão, OECS exerceu atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora; os dados obtidos no presente estudo, adicionados aos dados da literatura, sugerem que guaiazuleno, β -cariofileno e 1,8-cineol possam estar contribuindo para os efeitos farmacológicos observados com o OECS.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

A arte dos benzedores, curandeiros e xamãs, herdada dos magos e feiticeiros de outrora, caracterizada pela utilização de recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, é tão antiga quanto a espécie humana (Di Stasi, 1996).

Os usos das plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram acumuladas durante séculos, e muito desse conhecimento empírico se encontra disponível atualmente. O conhecimento sobre plantas medicinais representou e ainda representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (Di Stasi, 1996).

Durante a última parte do século XX a prática da Fitoterapia tornou-se difundida por todo mundo. Isto é suficiente, em parte, para o reconhecimento do valor do sistema de medicina tradicional e a identificação de plantas medicinais; que têm mostrado um significativo poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (Elvin-Lewis, 2001).

Assim, as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novas drogas e compostos com atividade terapêutica (Evans, 1996).

Existem 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), das quais 11% são exclusivamente originadas de plantas e uma quantidade significativa são drogas sintéticas obtidas a partir de precursores naturais. Exemplos de importantes drogas obtidas a partir de plantas são digoxina (*Digitalis* sp.), quinina e quinidina (*Chinchona* sp.), vincristina e vimblastina (*Catharanthus roseus*), atropina (*Atropa belladonna*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*), ácido salicílico (*Salix alba*), cafeína (*Coffea arabica*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*) e taxol (*Taxus brevifolia*) (Campos, 2002).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas; extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, as quais se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento (Di Stasi, 1996).

Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado, seguro e eficaz (Di Stasi, 1996).

O desenvolvimento desta linha de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a inter-relação cada vez maior de profissionais de diversas áreas de conhecimento (agronomia, botânica, química, farmacognosia, farmacologia, toxicologia e outras) que compõe o estudo das plantas medicinais (Di Stasi, 1996).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (Matos, 1989).

Apesar da rica flora brasileira representar mais de 20% das espécies de plantas medicinais conhecidas no mundo, pouco tem sido feito para estudar o seu potencial como fonte de novas moléculas ou de matérias-primas para preparações farmacêuticas. Cerca de 70% dos recursos fitofarmacêuticos não foram suficientemente estudados, a fim de se obter a confirmação necessária sobre eficácia e segurança (Petrovick, 1999).

Nesse aspecto, deve-se suscitar discussões mais profundas da importância que as pesquisas com plantas medicinais possuem na solução de inúmeros problemas de saúde da população; determinando direções e soluções de curto e médio prazo, sem o comprometimento da qualidade e do rigor técnico dos estudos, caminhando até a discussão detalhada sobre controle de qualidade de fitoterápicos, legislação específica e validação das espécies vegetais como medicamento (Di Stasi, 1996).

1.2. Óleos Essenciais

Na pesquisa de novos medicamentos e substâncias bioativas, maior ênfase foi dada nos últimos anos para o estudo dos óleos essenciais produzidos pelas plantas, assim como de seus constituintes (Santos, 1997).

As plantas aromáticas são utilizadas em medicina e cosmética há milhares de anos, mas o uso de óleos destilados data de 1000 anos, quando o processo de destilação foi criado (Santos, 1997).

Desde as eras mais remotas da humanidade, as fumigações aromáticas têm sido usadas em rituais religiosos. A fragância ou essência sempre foi vista como manifestação da divindade na terra, uma relação entre os seres humanos e os deuses, emanção da matéria e manifestação do espírito (Santos, 1997).

Os óleos essenciais, óleos voláteis, fragrâncias, essências, azeites etéreos ou azeites voláteis constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas. O termo essência se deve, provavelmente, ao fato dos óleos essenciais representarem os primeiros constituintes ativos de plantas conhecidos pela propriedade de exalar odor, geralmente agradável (Matos & Matos, 1989).

A qualidade das essências é variável de um gênero a outro e de uma espécie a outra; são formadas em células especiais como glândulas, bolsas secretoras, tubos lactíferos, vasos resiníferos ou ductos localizados em um órgão particular ou distribuídos por toda a planta. Alguns vegetais possuem essências quimicamente diferentes em flores, folhas, raízes, caule, fruto ou semente (Matos & Matos, 1989).

Os óleos essenciais podem ser extraídos a partir de flores (*Rosa centifolia*; rosa), folhas (*Croton sonderianus*; marmeleiro-preto), frutos (*Foeniculum vulgare*; funcho), sementes (*Pterodum polygalaeflorus*; sucupira branca), parte aérea (*Cymbopogon citratus*; capim-santo), raízes (*Vetiveria zizanioids*; vetiver), casca (*Hymenaea courbaril*; jatobá), tubérculos (*Cyperus sp*; tiririca), capítulos florais (*Egletes viscosa*; macela) e bulbos (*Allium sativum*; alho) (Santos, 1997).

Os óleos essenciais quando expostos ao ar, mesmo a temperatura ambiente, se evaporam (Matos & Matos, 1989). São usualmente líquidos, porém alguns podem se apresentar sólidos (*Iris pallida*) ou semi-sólidos (*Bulnesia sarmienti*) à temperatura ambiente. A maioria é transparente e incolor ou fracamente amarelado, poucos são profundamente coloridos, como o de camomila germânica (azul) devido ao alto teor de azulenos (Santos, 1997). O sabor é geralmente acre (ácido) e picante. Não são muito estáveis, principalmente na presença de ar (oxidação), luz, calor, umidade e metais; portanto, devem ser acondicionados em lugar fresco e seco e em recipientes de vidro âmbar e hermeticamente fechados (Simões et al, 1999). São imiscíveis com a água, entretanto são solúveis em álcool, clorofórmio, éter e outros solventes orgânicos (Matos & Matos, 1989).

Um dos métodos mais utilizados para a obtenção de óleos essenciais a partir de plantas aromáticas é a destilação pelo vapor. De acordo com este método, o óleo essencial presente na planta é vaporizado e então condensado por resfriamento (Santos, 1997). Os óleos essenciais possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor. Para tal procedimento utiliza-se um aparelho especial, entretanto, simples e que pode

ser facilmente montado em laboratório de rotina. O óleo essencial obtido, após separação da água, deve ser seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro (Simões et al, 1999).

A extração por enfloração (*Enfleurage*) já foi um método muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo e alto valor comercial. É empregado para extrair óleo volátil de pétalas de flores (laranjeiras, rosas); as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui um alto valor comercial (Simões et al, 1999).

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos essenciais. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial (Simões et al, 1999).

O método da prensagem ou expressão é empregado para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões et al, 1999).

A extração por gás carbônico (CO₂) supercrítico permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos (Simões et al, 1999).

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico”, ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário. Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, entre outras; o aroma desses óleos essenciais pode estar envolvido na atração de polinizadores tais como: abelhas e borboletas (polinização diurna) e morcegos e mariposas (polinização noturna) (Simões et al, 1999).

Pela utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais constituem importantes atividades econômicas (Simões et al, 1999).

Os óleos essenciais podem ser empregados para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem também usados como solventes e como insumos em produtos das indústrias de plástico, tintas, borracha, inseticidas e outras (Santos, 1997). Embora a utilização maior ocorra nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de

higiene), também em farmácias as drogas vegetais ricas em óleos essenciais são empregadas *in natura* para a preparação de infusões e/ou sob a forma de preparações galênicas simples. Ainda, muitos óleos essenciais são utilizados em função de suas propriedades terapêuticas para a aromatização de formas farmacêuticas destinadas ao uso oral (Simões et al, 1999).

1.3. Composição Química dos Óleos Essenciais.

Praticamente todos os óleos essenciais constituem uma mistura de princípios químicos muito complexa e variam amplamente na sua composição (Matos & Matos, 1989). São misturas de muitas substâncias, predominantemente terpenos (cerca de 90%) e derivados de fenilpropano. Outros componentes incluem fenóis simples, compostos contendo enxofre (óleos de mostarda), metil antranilato e cumarinas (Wagner et al, 1984). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços); por exemplo, o 1,8-cineol (ou eucaliptol) é o principal composto do óleo de eucalipto e, geralmente, seu teor é em torno de 80%; entretanto, esta mesma substância foi detectada no óleo de bergamota numa concentração 40.000 vezes menor do que no óleo de eucalipto, ou seja, em torno de 0,02% (Simões et al, 1999).

Além dos óleos essenciais obtidos de plantas (fitogênicos), produtos sintéticos (imitações dos naturais ou composições de fantasia) são encontrados no mercado; mas, somente os naturais são permitidos pelas farmacopéias para o uso farmacêutico (Simões et al, 1999).

O quadro 1 apresenta os componentes químicos presentes em óleos essenciais divididos em três principais grupos: hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos sulfurados (Santos, 1997).

Quadro 1 – Classes de compostos encontrados em óleos essenciais

Hidrocarbonetos

Terpenos

Compostos Oxigenados

Álcoois

Aldeídos

Cetonas

Ésteres

Fenóis

Óxidos

Peróxidos

Lactonas

Ácidos

Furanos

Éteres

Outros Compostos

Compostos sulfurados

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno [$\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2$]. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos como por exemplo (mirceno, limoneno, linalol, geraniol, pineno e cânfora). Os monoterpenos representam cerca de 90% dos óleos essenciais e são constituídos de duas unidades de isopreno. Os sesquiterpenos (farnesol, nerodilol, bisaboleno e cariofileno) são compostos de três unidades de isopreno. Outros terpenóides como os diterpenos, que possuem quatro unidades de isopreno, são encontrados apenas em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (Simões et al, 1999).

A partir dos hidrocarbonetos a planta produz os compostos oxigenados, os quais constitui a segunda maior categoria. Os álcoois são usualmente baseados nos monoterpenos como, por exemplo, o linalol e o geraniol. Raramente os álcoois das plantas são baseados em sesquiterpenos (santalol, fusanolol). Os aldeídos (citrinal, citronelal) são considerados álcoois primários parcialmente oxidados; possuem, em geral, um fraco odor de frutas e podem causar irritação na pele e reações alérgicas. As cetonas (cânfora, tujona, carvona) são produzidas pela oxidação de álcoois secundários, sendo estruturalmente similares aos aldeídos. São estáveis, não sofrem oxidação facilmente e são amplamente exploradas em remédios para o trato respiratório superior (mucolítico) e preparados para a pele (citofiláticos). Os ésteres (terpinol) são produzidos pelo álcool terpênico correspondente e um ácido orgânico, altos níveis são alcançados na maturidade do fruto/planta ou na floração. São caracteristicamente antifúngicos, sedativos e podem ser poderosos agentes espasmolíticos. Costumam ser perfumados e muitas vezes

seu aroma lembra o de certas frutas. Os fenóis (anetol, eugenol, cresol, timol) são compostos bastante ativos quimicamente e podem provocar irritação. Óxidos orgânicos (cineol) são raros, altamente reativos e se decompõem facilmente em altas temperaturas e a exposição prolongada ao ar ou água. Poucos peróxidos existem em óleos essenciais como o tóxico ascaridol encontrado no Velame de cheiro (*Croton mucronatus*). Lactonas (alantolactona, cumarina, xantotoxina) são ésteres cíclicos, pouco voláteis, os quais podem ser moléculas simples ou complexas. Os ácidos são raros nos óleos essenciais, dentre eles os mais comuns são: ácido benzóico, ácido fenilacético e ácido hidrociânico. Os furanos (mentofurano) são estruturas oxigenadas; também pouco encontradas em óleos essenciais. Compostos como os éteres são raros. A essência de anis (*Pimpinella anisium*), possui o anetol (éter fenólico) como um dos seus principais constituintes (Santos, 1997).

Os compostos sulfurados são reativos, não derivados de terpenos ou sesquiterpenos e geralmente com forte odor desagradável. O dialil disulfeto é um composto sulfúrico típico do óleo de alho (*Allium sativum*) (Santos, 1997).

1.4. Farmacologia de óleos essenciais

Devido a sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (Santos, 1997).

Óleos essenciais contendo cânfora (*Salvia officinalis*) provocam aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial (Simões et al, 1999).

Alguns óleos essenciais, obtidos a partir de plantas como *Foeniculum vulgare*, *Chamomilla recutita*, *Mentha arvensis* e *Cinnamomum cassia*, possuem ação carminativa; ou seja, produzem uma certa anestesia sobre a cárdia, permitindo seu relaxamento e conseqüente expulsão do ar do trato gastrointestinal (Matos, 1998; Simões et al, 1999). O *Zingiber officinale* e a *Gentiana lutea* fornecem óleos essenciais com ação estimulante sobre secreções do aparelho digestivo, justificando a propriedade estimulante do apetite (Matos, 1998; Simões et al, 1999).

Chamomilla recutita, *Egletes viscosa*, *Allium sativum*, *Foeniculum vulgare* e *Salvia officinalis* possuem óleos essenciais que relaxam a musculatura lisa intestinal (atividade antiespasmódica), diminuindo ou mesmo suprimindo espasmos (cólicas) (Matos, 1998; Simões et al, 1999).

A essência de terebintina (l-pineno), obtida a partir da *Pinus palustris*, provocam um aumento da microcirculação local com conseqüente efeito rubefaciente, sensação de calor e, em certos casos, uma ação anestésica local; portanto, possui ação irritante tópica ou repulsiva (uso externo) (Simões et al, 1999). O óleo essencial do *Caryophyllus aromaticus*, pelo seu alto teor em eugenol, possui atividade anestésica local (Simões et al, 1999).

Atividade secretolítica também pode ser atribuída a óleos essenciais como os de *Eucalyptus globulus* e *Pimpinella anisum*, que pela presença do cineol e anetol, possuem ação irritante tópica sobre o epitélio respiratório, estimulando a atividade secretória e facilitando a fluidificação e a expulsão do muco em alguns problemas respiratórios (atividade balsâmica) (Matos, 1998; Simões et al, 1999).

Alguns óleos essenciais têm suas atividades sobre o SNC estabelecidas: estimulante (óleos essenciais contendo cânfora), sedativa (*Melissa officinalis*) ou mesmo provocando convulsões em doses elevadas (*Salvia officinalis* e *Cinnamomum cassia*) (Simões et al, 1999).

Óleos essenciais contendo azulenos, como por exemplo a camomila, possuem atividade antiinflamatória (Simões et al, 1999). β -pineno, cariofileno, α -bisabolol e compostos sesquiterpênicos, como no óleo de *Bupleurum fruticosens*, *Vanillosmopsis arborea* e *Copaifera reticulata* também possuem atividade antiinflamatória (Santos, 1997). Alguns óleos essenciais possuem atividade analgésica como os de *Egletes viscosa* (Souza et al, 1995) e *Ocotea duckay* (Moraes et al, 1995).

A atividade antimicrobiana foi documentada para vários óleos essenciais, dentre eles, o de *Mentha piperita*, *Achillea frangatissima*, *Melaleuca leucadendron*, *Melaleuca alternifolia*, *Althea rosea* e *Cymbopogon citratus*, pela presença de componentes como timol, carvacrol, eugenol, 1,8-cineol, linalol, pineno, cariofileno e citral (Santos, 1997).

Outras atividades também são apresentadas pelos óleos essenciais como: antimalárica de *Lippia multiflora* (Valentin et al, 1995); ascaricida de *Psoroptes cuniculi* (Perrucci et al, 1994); moluscicida e cercaricida por diferentes espécies de *Eucalyptus* (Mendes et al, 1990); leishmanicida de *Croton cajucara* (Socorro et al, 2003).

1.5. O Gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae possui cerca de 300 gêneros e 8000 espécies dispersos em toda a superfície terrestre; mais é amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas caracterizando particularmente, portanto, grande parte da flora brasileira. Os gêneros com maior número de espécies são o *Euphorbia* e o *Croton* (Farnsworth, 1969; Webster, 1967; Wilson, 1976). Os espécimes componentes vão desde ervas a trepadeiras e árvores de grande porte, sendo geralmente produtores de látex. Podemos citar representantes conhecidos na flora brasileira, como a seringueira - *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. nativa da região amazônica no Norte do Brasil, a maniçoba - *Manihot glaziovii* Muell. Arg. da região Nordeste, a mandioca *Manihot esculenta* Crantz. e a mamona - *Ricinus comunis* L. (Silveira, 1979).

Esta família foi classificada em 4 subfamílias: Crotonoideae, Phyllanthoideae, Porantheroideae e Ricinocarpoideae, e a subfamília Crotonoideae dividida em duas tribos: Crotoneae e Euphorbiaceae (Pax & Hoffman, 1932).

O gênero *Croton*, cujo nome significa “carrapato”, é o segundo maior da família Euphorbiaceae e pertence a subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae (Braga, 1976). Compreende aproximadamente 700 espécies distribuídas em várias regiões de clima tropical; dessas, o Brasil abriga cerca de 300 espécies. Estas espécies tornam evidente o seu valor em virtude do amplo uso popular como plantas medicinais; na forma de chás, infusões, cataplasmas e laxativos (Dourado, 2003).

Espécies do gênero *Croton* atraem o interesse para o seu estudo devido a diversidade do uso popular, atividades biológicas e como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (Dourado, 2003). É encontrado principalmente como árvore de pequeno porte e arbusto, apresentando cerca de 1000 espécies, das quais algumas são conhecidas como fonte de diterpenos, principalmente diterpenos do tipo clerodano furânico (Craveiro et al, 1981). Também são relatados diterpenos do tipo cleistantano (Craveiro et al, 1982), caurano (Gonzalez et al, 1981) e labdano (Roengsumram et al, 1999).

Estudos, envolvendo diversas espécies do gênero *Croton*, têm mostrado diferentes atividades farmacológicas tais como: atividade antiinflamatória e antioxidante de *C. celtidifolius* (Nardi et al, 2003); antileishmanicida de *C. cajucara* (Socorro et al, 2003); antinociceptiva de *C. cajucara* (Campos et al, 2002); antiulcerogênica e citotóxica de *C. cajucara* (Almeida et al, 2003); hipoglicêmica e hipolipidêmica de *C. cajucara* (Silva et al, 2001); antimicobacteriana e antimalárica de *C. kongensis* (Thongtan et al, 2003); antinociceptiva e antiinflamatória de *C. malambo* (Suarez et al, 2003); antinociceptiva de *C. nepetaefolius* (Abdon et al, 2002); antiproliferativa de *C. lechleri* (Rossi et al, 2003); citotóxica de *C. oblongifolius* (Sommit et al, 2003); anti-hipertensiva de *C. schiedeanus* (Guerrero et al, 2001); vasorelaxante de *C. schiedeanus* (Guerrero et al, 2002); antidiarréica de *C. urucurana* (Gurgel et al, 2001); antinociceptiva de *C. zehntneri* (Oliveira et al, 2001); antimicrobiana de *C. sonderianus* (McChesney et al, 1991); anti-reumática de *C. californicus* (Chavez et al, 1982); purgativa de *C. campestris* (Babili et al, 1998); antitumoral de *C. crassifolius* (Altschul, 1973); hipotensora e narcótica de *C. eluteria* (Vigor et al, 2001).

1.6. *Croton sonderianus* Muell. Arg.

1.6.1. Descrição botânica, distribuição geográfica e aspectos gerais

Segundo a descrição taxonômica contida no vol. XI da parte II da Flora Brasiliensis, *Croton sonderianus* Muell. Arg. é descrito como segue (Silveira, 1979):

“Planta arbustiva, podendo chegar à pequena árvore, raramente atingindo mais que 6m de altura. Apresenta nos ramos pecíolos, racemos e na página inferior das folhas, delicado indumento de pelos estrelados de cor acinzentada, às vezes com brilho vítreo, densamente tomentoso e não lepdoto. Os ramos são quase cilíndricos, apresentando sua secção transversal elítica. As folhas medem cerca de 10 a 14cm de comprimento por 5 a 7cm de largura na parte mais inferior; são triangular – ovais ou quase triangular – lanceoladas, de ápice acentuatamente acuminados e levemente cordatas na base, glandulosas, peninérvias, com 4 a 6 nervuras secundárias que se aproximam da base, apresentando estípulas cetáceas, alongadas, levemente lancinadas. O pecíolo é 4 a 5 vezes mais curto que o limbo. Os racemos possuem flores abundantes com brácteas linear – lanceoladas cada uma com uma flor. A flor feminina, destituída de pétalas, apresenta cálice pentafendido, com lobos orbicular – ovais, obtusos, ondulado nas margens e acrescente superando quase a metade da cápsula. Os lacínios subsaccato – reflexos, apresentam sinuosidades. O ovário é viloso – tomentoso. A flor masculina apresenta pétalas obovato – lanceoladas, densamente albedo – tomentosas em ambas as partes. Suas glândulas são conatas e glabras. O disco, adnato ao cálice, é hipógino tomentoso, apresentado cerca de 15 estames hirtolanosos com anteras quase duas vezes mais longas que largas. As cápsulas medem cerca de 7mm de comprimento, são depresso – globosas e as sementes 5mm de comprimento por 4mm de largura e aproximadamente 2mm de espessura.”

Os “marmeleiros” são plantas muito frequentes no Nordeste, cujos nomes botânicos têm sido referidos errôneamente em inúmeras publicações. O “marmeleiro-preto” corresponde botanicamente a espécie *Croton sonderianus* Muell. Arg. e não a *Croton hemiargireus* Muell., como tem sido citado (Matos, 1997).

O *Croton sonderianus* Muell. Arg. é popularmente conhecido como “marmeleiro – escuro” ou “marmeleiro – preto” em virtude do tronco e ramos possuir um aspecto geral escuro. É o mais abundante dos marmeleiros nordestinos, componente da caatinga, típico do sertão. Habita principalmente a região entre as bacias do rio São Francisco e Parnaíba. O mapa da figura 1 apresenta as regiões Nordesteiras onde o marmeleiro-preto pode ser encontrado (Silveira, 1979).

O *Croton sonderianus* Muell. Arg. apresenta-se como arbusto nas capoeiras do sertão, ou árvore quando cresce nas matas. Fornece boa lenha para queima, sendo muito usada como material para cercas de varas e preparação de gaiolas para pesca de lagosta (conhecidas no Ceará pela denominação local de manzuás). Seus frutos são o alimento preferido das pombas de bando ou avoantes (*Zenaida auriculata*) (Matos, 1997). O chá de infusão da casca é utilizado via oral, na medicina popular, para hemorragia uterina, hemoptise, dor de estômago, vômitos e diarreia (Matos, 1999).

Estudos farmacológicos dos extratos orgânicos e substâncias isoladas das raízes de *Croton sonderianus*, coletadas em Sobral-Ceará, revelaram significativa atividade biológica (McChesney et al, 1991).

O Ácido 3,4-*seco*-traquilobanóico, um dos constituintes químicos isolados das raízes de *C. sonderianus*, apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e atividade fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophyts* e *Polyporus sanguineus* (McChesney et al, 1991).

As figuras 2 e 3 mostram aspectos da planta e seus ramos.

1.6.2. Análise química

A análise química realizada no óleo essencial extraído das folhas de *Croton sonderianus* Muell. Arg. indicou a ocorrência de: (E)-calameneno (9,27%), β -elemeno (6,55%), guaiazuleno (6,53%), β -cariofileno (6,35%), α -muuroleno (6,10%), (Z)-calameneno (4,65%), β -felandreno (4,16%), 1,8-cineol (2,45%), espatulenol (2,07%) e (E)-cadina-1(2), 4-dieno (1,15%).

A figura 4 apresenta a estrutura química dos constituintes voláteis do Óleo Essencial de *Croton sonderianus* (OECS).

Figura 1 - Áreas ocupadas com (*Croton sonderianus*) no Nordeste.

Obs.: estimativa por observação de campo, sujeita a confirmação.

Figura 2 - Aspecto geral da planta (*C. sonderianus*)

Figura 3 - Aspecto dos ramos de *C. sonderianus*.

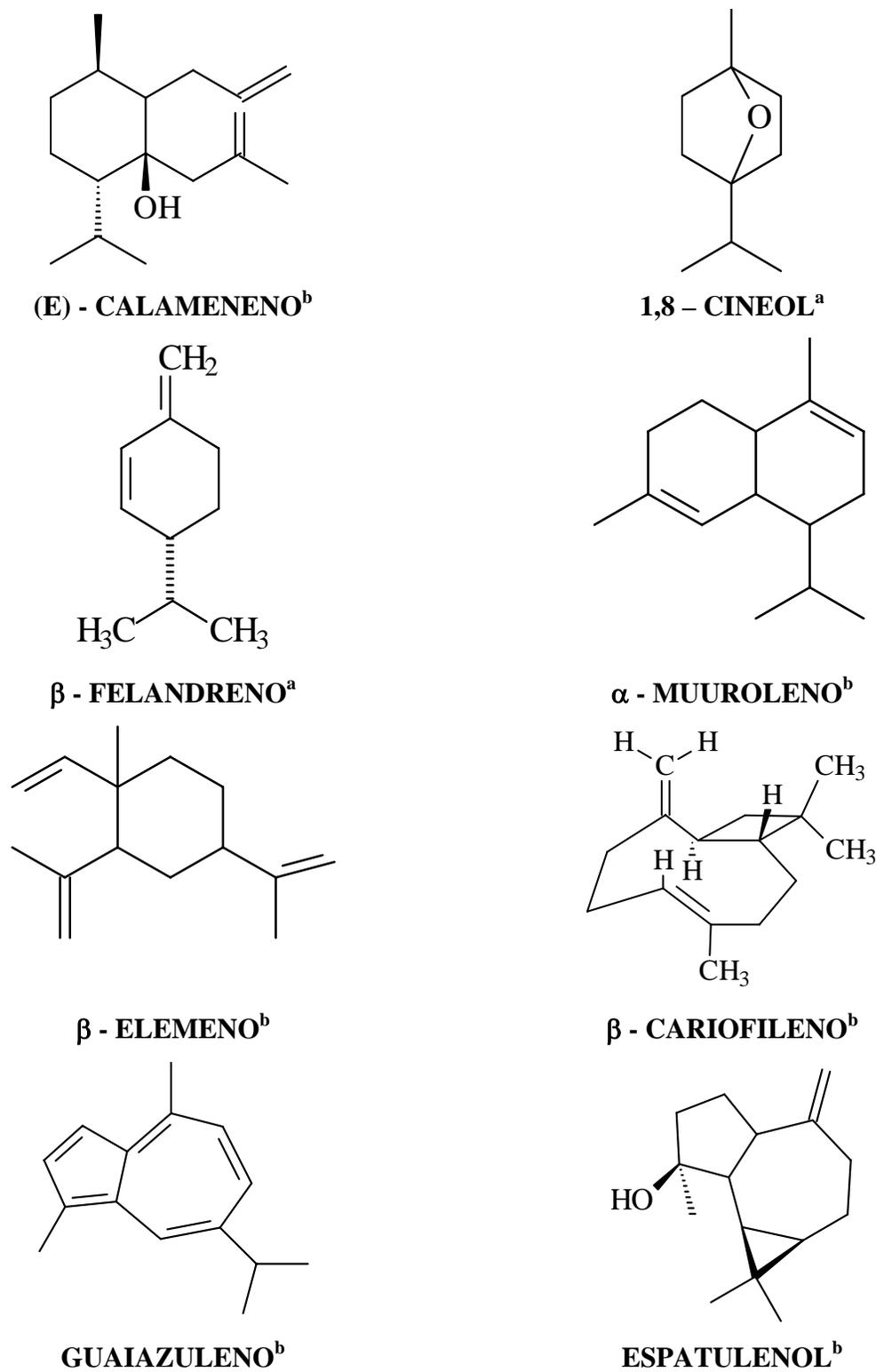


Figura 4 – Estruturas químicas dos constituintes voláteis do OECS.

a – monoterpeno; b - sesquiterpeno

1.6.3. Constituintes químicos: química e farmacologia.

(E) – calameneno

É um sesquiterpeno presente no óleo essencial obtido a partir de folhas de *Leptospermum scoparium* e *Kunzea ericoides*. Este óleo apresentou atividade antimicrobiana (Porter et al., 1998).

β -Elemeno

O β -Elemeno, um sesquiterpeno isolado do rizoma de *Curcuma aromatica*, apresentou atividade antitumoral (Fu, 1984). β -Elemeno exibiu atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em humanos; os resultados indicam que a indução da apoptose contribui para os seus mecanismos de atividade antitumoral (Yang et al, 1996). Demonstrou efeito antitumoral por mecanismo imunoprotetor (Wu et al, 1999). Exerceu efeito citotóxico em células leucêmicas (K562) por indução de apoptose (Yuan et al, 1999; Zou et al, 2001). β -Elemeno exibiu um marcante efeito antiproliferativo em células de glioma, e ele pode induzir apoptose *in vitro* (Zhou et al, 2003).

Estudos de farmacocinética (absorção, distribuição e excreção) do β -Elemeno, obtido das raízes e sementes de *Curcuma wenyujin*, foram realizados em ratos; os resultados demonstraram que β -Elemeno foi largamente distribuído no corpo pela alta ligação às proteínas plasmáticas. É excretado de forma inalterada via urina e fezes; na bile é muito pouco excretado (Wang et al, 2000).

Guaiazuleno

O Guaiazuleno (1,4-dimetil-7-isopropil-azuleno), um sesquiterpeno derivado natural do azuleno, é um agente antiúlcera (Yano et al, 1990; Yanagisawa et al, 1990) que foi utilizado em estudos clínicos como terapia secundária da gastrite (Vasario, 1958; Alessio, 1964). Foram realizados estudos para elucidar os mecanismos defensivos básicos da mucosa gástrica na ação antiúlcera do guaiazuleno e derivados sintéticos do azuleno; guaiazuleno não demonstrou aumento no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (Yano et al, 1990).

Azuleno, e seu derivado alquil guaiazuleno, são ingredientes de produtos populares de beleza (cosméticos para a pele e corpo). Publicações de várias origens, incluindo a FDA demonstraram que o azuleno é um ingrediente popular de vários produtos de uso humano. Azuleno é obtido da planta camomila germânica (*Matricaria chamomilla*), que possui atividade antiinflamatória, antiespasmódica e antimicrobiana. Estudos de fotomutagenicidade demonstraram que o guaiazuleno e o azuleno são fotomutagênicos em *Salmonella typhimurium* por irradiação de UVA e/ou luz visível; portanto, produtos com estes ingredientes devem ser utilizados com cautela uma vez que a exposição a luz solar é sempre inevitável (Lei et al, 2003).

A toxicidade do oxigênio e as reações de radicais livres são implicadas em numerosas condições patológicas como aterosclerose, inflamação, ulceração gástrica, degeneração neuronal e promoção tumoral. As flores de *Matricaria chamomilla* têm sido usadas terapêuticamente para condições em que o estresse oxidativo pode, supostamente, ser implicado. O camazuleno,

substância ativa da camomila, inibe a peroxidação lipídica de maneira dose-dependente apresentando atividade antioxidante (Rekka et al., 1996).

O efeito *in vivo* e *in vitro* do guaiazuleno foi investigado no citocromo P450 (CYP) hepático de rato. Guaiazuleno inibiu consideravelmente CYP1A2 e CYP2B1 e demonstrou um fraco efeito no CYP1A1 da fração hepática microsomal do rato. Guaiazuleno administrado em ratos não produziu nenhum efeito tóxico macroscópico e não causou alteração no peso do fígado, proteína microsomal e conteúdo total do citocromo P450. Guaiazuleno inibiu a atividade do CYP1A2 em ratos com ou sem intoxicação por paracetamol (Kourounakis et al, 1997b). Estudos investigaram a habilidade do guaiazuleno em ligar-se a radicais livres inibindo peroxidação lipídica da membrana hepática microsomal de ratos. A hepatotoxicidade do paracetamol é causada pelo metabólito reativo N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que causa estresse oxidativo e depleção de glutathione. Os níveis das proteínas citosólicas hepáticas, glutathione, glutathione transferase e glutathione redutase foram determinados como índices de injúria hepática com ou sem a administração do guaiazuleno. Foi encontrado que todos os parâmetros afetados pelo paracetamol foram restaurados ao normal pelo tratamento com o guaiazuleno (Kourounakis et al, 1997a). Considerando que o CYP1A2 participa da formação de NAPQI, assim como da ativação metabólica de vários compostos tóxicos e carcinogênicos, estes resultados, em combinação com a atividade antioxidante do guaiazuleno, indicam potenciais aplicações benéficas deste constituinte (Kourounakis et al, 1997b).

Estudos têm demonstrado a bioatividade de derivados do azuleno e guaiazuleno. Um novo pigmento azuleno, 2,3-dihidrolinderazuleno, tem sido

isolado juntamente com guaiazuleno e linderazuleno como metabólitos bioativos da *Acalycigorgia* sp (Sakemi et al, 1987). Foram estudados os efeitos do novo derivado azuleno (KT1-32) no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. A administração intravenosa do KT1-32 produziu um aumento dose-dependente do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica em ratos, o que contribuiu para sua atividade antiúlcera fortalecendo os mecanismos defensivos da mucosa (Yano et al, 1990).

O 3-Vinilguaiazuleno, um derivado sintético do guaiazuleno, possui atividade antioxidante superior ao alfa-tocoferol. Este derivado também inibe moderadamente a proliferação de células leucêmicas promielanocíticas (Pratsinis et al, 2002).

β – cariofileno

O β - cariofileno é um sesquiterpeno que geralmente está presente, como composto majoritário, em óleos essenciais extraídos de folhas ou partes aéreas de diversas plantas tais como: *Lantana xenica*, *Stachys candida*, *S. chrysantha*, *Calea clematidea* e *Satureja parnassica* (Juliani et al., 2002; Skaltsa et al., 1999; Flach et al., 2002; Tzakou et al., 2003). É o composto majoritário no extrato volátil do fruto conhecido como taperebá (*Spondias tuberosa*) (Ceva-Antunes et al., 2003).

Estudos com óleos essenciais de *Bupleurum fruticosens*, *Vanillosmopsis arborea* e *Copaifera reticulata*, demonstraram atividade antiinflamatória, isto pode dever-se a compostos sesquiterpênicos presentes nesses óleos, incluindo o β - cariofileno (Menezes et al, 1990, Martin, 1993;

Sertié et al, 1995). Estudos demonstraram que β -cariofileno, um conhecido sesquiterpeno antiinflamatório, possui atividade citoprotetora, em ratos, contra lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e HCl 0,6N (Tambe et al, 1996).

O óleo essencial, obtido a partir de folhas de *Syrian oreganum*, exerceu atividade antioxidante *in vitro*, por complexação com radicais livres, maior do que o ácido ascórbico; β -cariofileno é um dos constituintes majoritários do óleo essencial de *Syrian oreganum* (Alma et al, 2003). Outros estudos demonstraram atividade antioxidante, do óleo essencial de *Artemisia annua*, equivalente a um composto de referência (α -tocoferol); β -cariofileno é um dos constituintes majoritários deste óleo essencial (Juteau et al, 2002).

Estudos tanto com o óleo essencial como com β – cariofileno demonstraram atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *Proteus mirabilis*. Demonstraram menor inibição por *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*. A bactéria *Micrococcus luteus*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans* foram insensíveis tanto ao óleo como ao β - cariofileno (Juliani et al., 2002).

Estudos com óleos essenciais que possuem β - cariofileno, como composto majoritário, exibiram moderada atividade contra bactérias gram – positivas e uma grande atividade contra *Helicobacter pylori* (Tzakou et al., 2003); demonstraram, ainda, moderada atividade antifúngica contra dermatófitos tais como: *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton menthagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* e *Microsporum nanum* (Flach et al., 2002).

α - muuroleno

É um sesquiterpeno presente no óleo essencial obtido a partir de folhas de *Leptospermum scoparium* e *Kunzea ericoides*. Este óleo apresentou atividade antimicrobiana (Porter et al., 1998).

O α - muuroleno, obtido a partir de espécies de corais marinhos do gênero *Heteroxenia*, é ativo contra fungos fitopatogênicos como *Cladosporium cucumerinum*. Exibiu, também, atividade no teste de letalidade de camarão de salmoura (Edrada et al, 2000).

β -felandreno

O β -felandreno é um monoterpeno que geralmente está presente, como composto majoritário, em óleos essenciais extraídos de folhas ou partes aéreas de diversas plantas tais como: *Pimpinella junoniae*, *Pinus peuce*, *Crithmum maritimum* e *Peumus boldus* (Velasco et al., 2003; Koukos et al., 2000; Tsoukatou et al., 2001; Vila et al., 1999). É um dos compostos majoritários no extrato volátil do fruto conhecido como cajá (*Spondias lutea*) (Ceva-Antunes et al., 2003).

Estudos com óleos essenciais que possuem β -felandreno, como constituinte majoritário, exibiram significativa atividade inseticida e repelente contra *Pheidole pallidula* (Tsoukatou et al., 2001) e uma significativa atividade bactericida e fungicida contra *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* sp. e *Candida* sp. (Vila et al., 1999).

1,8 - Cineol

O 1,8-cineol (cineol ou cajepitol), também conhecido como eucaliptol, é um óxido monoterpênico e é o principal constituinte de vários óleos essenciais, dentre eles, os óleos das espécies de *Eucalyptus*, *Psidium*, *Croton*, *Hyptis*, *Pectis*, *Melaleuca* e muitos outros (Santos, 1997; Santos et al, 2000).

Estudos relacionados aos efeitos neurofarmacológicos dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* e *Psidium pohlianum* demonstraram potenciação do tempo de sono induzido por pentobarbital e um aumento do tempo de imobilidade no teste da natação forçada. Os óleos essenciais de *Psidium* reduziram a mortalidade associada com a toxicidade por anfetamina e convulsões induzidas por pentilenotetrazol; demonstraram, ainda, uma significativa inibição do trânsito intestinal. Estes resultados sugerem uma ação depressora do sistema nervoso central e periférico; cineol é o constituinte majoritário dos óleos essenciais de *Psidium* (Santos et al, 1996).

Cineol demonstrou efeito inibitório em alguns tipos de inflamação experimental em ratos (edema de pata induzido por carragenina e granuloma induzido por pellet de algodão). Cineol inibiu, em camundongos, o aumento da permeabilidade capilar peritoneal induzida por ácido acético; inibiu, também, a nocicepção induzida pela administração subplantar de formalina e intraperitoneal de ácido acético. Estes resultados evidenciam um potencial uso benéfico do cineol como agente antiinflamatório e analgésico (Santos et al, 2000). É largamente utilizado em preparações farmacêuticas de uso externo e interno, servindo como estimulante da expectoração nos casos de bronquite e

agindo como anestésico local suave e anti-séptico no tratamento de inflamações da garganta e da boca (Craveiro et al, 1981).

A Hipersecreção das vias aéreas é mediada pela liberação de mediadores inflamatórios e pode ser melhorada pela inibição da produção de mediadores. O 1,8-cineol suprimiu o metabolismo do ácido araquidônico e produção de citocinas em monócitos humanos. Estudos clínicos avaliaram a eficácia antiinflamatória do 1,8-cineol pela determinação da equivalência de potência com a prednisolona em pacientes com asma severa. Os resultados sugerem uma atividade antiinflamatória do 1,8-cineol na asma e o uso deste como um novo agente mucolítico em doenças da vias aéreas superiores e inferiores (Juergens et al, 2003).

Dermatites alérgicas de contato têm sido demonstradas com o uso de óleos essenciais de plantas na aromaterapia. Prurido é uma sensação desagradável, em muitas doenças de pele, associada com uma grande “vontade de coçar”. Produtos da degradação dos monoterpenos presentes nos óleos essenciais podem agir como agentes sensibilizadores da pele. Quando injetado no dorso de camundongos, cineol eliciu comportamento de coçar no sítio da injeção, de maneira similar como ocorre com o composto 48/80; resultados que sugerem que os mastócitos possuem papel fundamental no comportamento de coçar induzido por cineol em camundongos (Santos et al, 2002).

O cineol é um dos compostos majoritários dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Chrysanthemum boreale* e *Peumus boldus*. Estes óleos apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias gram – positivas e

gram – negativas maior que a ampicilina (Kim et al., 2003); exibiram significativa atividade bactericida e fungicida contra *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus sp.* e *Candida sp.* (Vila et al., 1999).

Espatulenol

O Espatulenol é um sesquiterpeno que geralmente está presente, como composto majoritário, em óleos essenciais extraídos de folhas ou partes aéreas de diversas plantas tais como: *Lindera communis*, *Matricaria recutita*, *Conyza albida*, *Baccharis notoserigila*, *Callicarpa japonica*, *Calea clematidea*, *Satureja parnassica*, *Pittosporum undulatum*, *Xylopia phloiodora*, *Pachypodanthium confine*, *Antidesma lanciniatum*, *Xylopia aethiopica* e *Hexalobus crispiflorus*. (Yang et al., 1999; Maday et al., 1999; Pacciaroni et al., 2000; Cobos et al., 2001; Kobaisy et al., 2002; Flach et al., 2002; Tzakou et al., 2003; Medeiros et al., 2003; Boyom et al., 2003).

Os óleos essenciais que possuem espatulenol, como um dos principais constituintes, geralmente exibem atividade antibacteriana e/ou antifúngica. Em diversos estudos, óleos essenciais, que possuem espatulenol como constituinte majoritário, demonstraram atividade contra bactérias gram - positivas e gram – negativas (Cobos et al., 2001; Tzakou et al., 2003) e uma moderada atividade contra *Helicobacter pylori* (Tzakou et al., 2003). Exibiram, ainda, uma considerável atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S.epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. (Medeiros et al., 2003); antifúngica contra *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton menthagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis* e *Microsporium nanum* (dermatófitos)

(Flach et al., 2002) e antimalarial contra *Plasmodium falciparum* em cultura *in vitro* (Boyom et al., 2003).

(E) – cadina-1,4-dieno

É um sesquiterpeno presente no óleo essencial obtido a partir de folhas de *Leptospermum scoparium* e *Kunzea ericoides*. Este óleo apresentou atividade antimicrobiana (Porter et al., 1998).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

As plantas do gênero *Croton* demonstram uma variedade de efeitos farmacológicos. O *Croton sonderianus* Muell. Arg. é popularmente empregado no tratamento de hemorragia uterina, dor de estômago, vômitos e diarreia e não existem dados farmacológicos sobre o óleo essencial obtido das folhas de *C. sonderianus*. Este trabalho tem por objetivos:

- ◆ Analisar os constituintes químicos presentes no óleo essencial obtido das folhas de *Croton sonderianus* Muell. Arg. (OECS);
- ◆ Avaliar a toxicidade aguda do OECS;
- ◆ Avaliar o efeito antiinflamatório em modelos animais de inflamação aguda;
- ◆ Estudar o efeito antinociceptivo estabelecendo os possíveis mecanismos de ação;
- ◆ Verificar o efeito sobre o sistema nervoso central, nos modelos de tempo de sono e campo aberto;
- ◆ Avaliar os efeitos no trato gastrintestinal, utilizando os modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina e verificando o efeito na motilidade intestinal.

MATERIAIS

3. MATERIAIS

3.1. Material botânico

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas frescas de *Croton sonderianus* Muell. Arg. coletadas na localidade de Caucaia-Ceará (Km 18), no dia 17 de março de 2003 (07:00-08:30 h). A excicata foi identificada pelo Prof. Edson de Paula Nunes e depositada no Herbário Prisco Bezerra (# 31423; figura 5) do Departamento de Biologia da UFC.

3.2. Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss Webster, adultos, do sexo masculino, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno 26 ± 2 °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 18h antes da realização de cada experimento.

Figura 5 – Aspectos da excicata nº 31423 de *C.sonderianus*

3.3. Reagentes e drogas

Reagente	Origem
Acetona P.A.	Synth, Brasil
Ácido acético glacial P.A.	Quimex, Brasil
Ácido acetilsalicílico	Sigma, U.S.A.
Capsaicina	Sigma, U.S.A.
Carragenina	Sigma, U.S.A.
Carvão Ativado pó	Reagen, Brasil
Cimetidina	Sigma, U.S.A.
Ciproeptadina (Periatin [®])	Prodome, Brasil
Clonidina, hidrocloreto	Sigma, U.S.A.
Cloridrato de clorpromazina	Sigma, U.S.A.
Cloridrato de naloxona	Sigma, U.S.A.
Dextrana	Sigma, U.S.A.
Diazepam	Sigma, U.S.A.
Etanol P.A.	Grupo Química, Brasil
Éter etílico P.A.	Cinética, Brasil
Formaldeído P.A.	Sigma, U.S.A.
Glibenclamida	Sigma, U.S.A.
Indometacina (Indocid [®])	Prodome, Brasil
Sulfato de morfina (Dimorf [®])	Cristália, Brasil
N-acetilcisteína (Fluimucil [®])	Zambon, Brasil
Óleo de <i>Croton</i>	Sigma, U.S.A.
Pentobarbital sódico	Sigma, U.S.A.
Tween 80	Sigma, U.S.A.

3.4. Equipamentos

Equipamento	Origem
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX200)	Shimadzu Corporation, Japão
Campo aberto	LPN-CE
Placa quente (mod. DS37)	Ugo Basile, Itália
Pletismógrafo (mod. 7150)	Ugo Basile, Itália
Seringas plásticas	B-D Plastipak
Vidrarias	Pirex, U.S.A.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção do óleo essencial de *Croton sonderianus*

O óleo essencial foi obtido, a partir das folhas frescas, por hidrodestilação (290 g de *C.sonderianus*). A mistura foi mantida em ebulição, por 2 h, em um sistema de doseamento de óleo essencial tipo Cleavenger modificado por Gottlieb (Craveiro et al., 1984). A mistura água/óleo foi separada; a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada (algodão hidrófilo), fornecendo o óleo essencial (Figura 6).

O estudo dos componentes voláteis foi realizado por RMN em clorofórmio deuterado (CDCl_3), utilizando-se um espectrofotômetro Bruker (modelo Avance DRX 500/500 MHz); assim como por cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrofotômetro de massa (CGL/EM; Hewlett-Packard 5971) nas seguintes condições: coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm); hélio (1mL/min); temperatura programada: 35-180 °C (4 °C/min); 180-280 °C (20 °C/min); temperatura do injetor (250 °C) e temperatura do detector (200 °C). Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico (70 eV) numa faixa de $m/z = 28-400$. Os componentes individuais foram identificados por pesquisa em espectroteca comercial computadorizada de espectros de massa, utilizando-se os índices de retenção com uma rotina de pré-seleção, e depois realizando-se a comparação visual com espectros de massa publicados em literatura especializada (Formáček et al, 1985; Adams, 2001). Esta metodologia foi realizada pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e pelo Doutorando Cláudio Costa dos Santos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

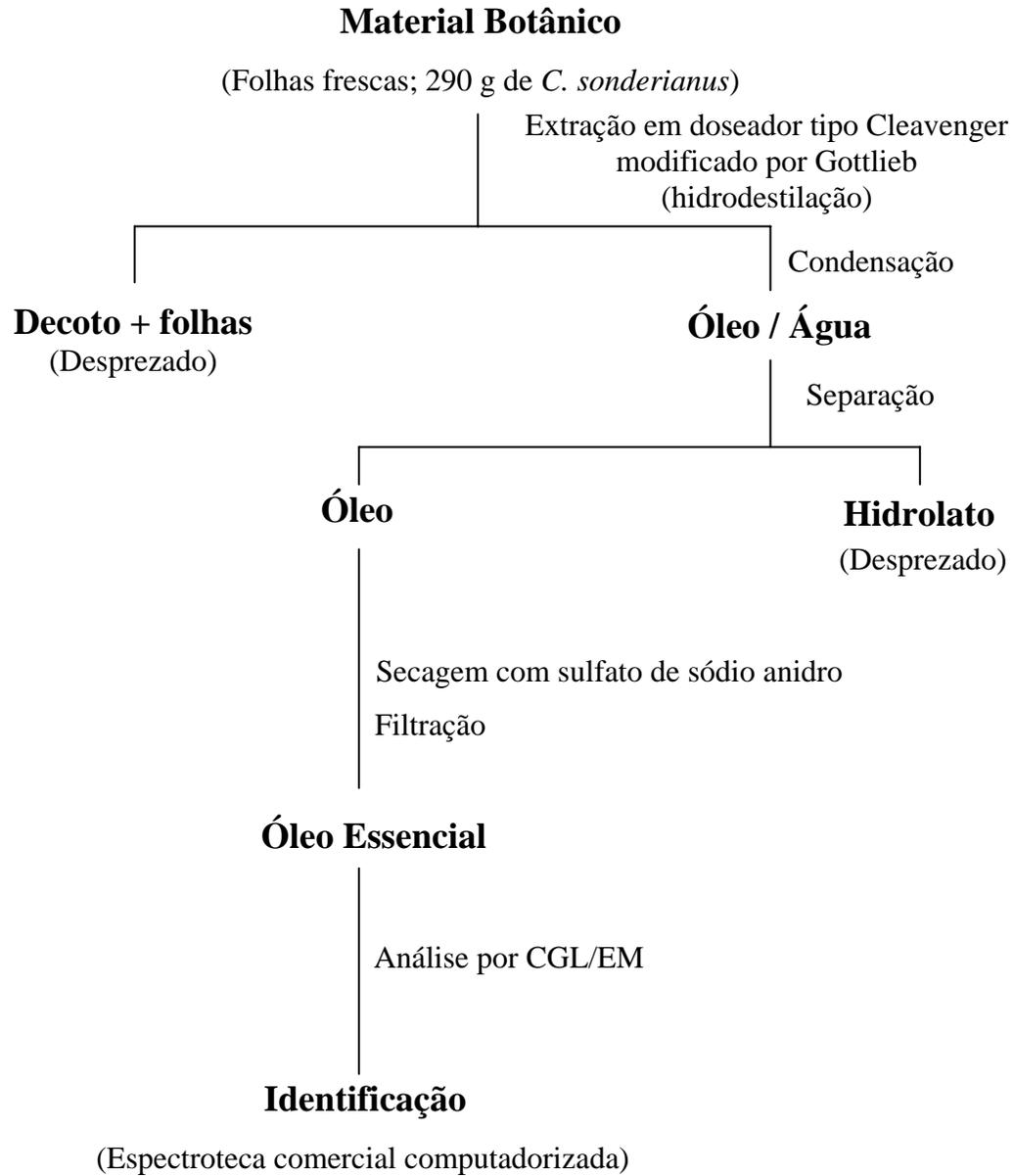


Figura 6 – Método de obtenção do óleo essencial de *C. sonderianus*.

4.2. Toxicidade aguda do OECS

Trinta camundongos (quinze machos e quinze fêmeas) foram distribuídos em três grupos de dez animais cada (cinco machos e cinco fêmeas) aos quais foram administrados, por via oral, doses crescentes do OECS (1, 2 e 3 g/Kg). Os animais foram observados quanto às alterações comportamentais, alterações nos padrões fisiológicos de evacuação e micção e quanto ao número de mortes ocorridas no período de setenta e duas horas (Miller et al., 1944).

4.3. Atividade Antiinflamatória

4.3.1. Edema de pata induzido por Carragenina

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), indometacina (10 mg/Kg, v.o.) e veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 min antes da indução do edema pela administração subplantar de Carragenina Tipo IV 1 % (20 µL/pata) na pata posterior esquerda, seguindo o descrito por Winter et al (1962) e Henriques et al (1987). Um volume igual de salina (NaCl 0,9 %) foi injetado na pata contralateral. O edema foi registrado 4h e 24h após a administração da carragenina.

O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália). A pata posterior do animal foi submergida, até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e correspondeu ao volume da pata. Os resultados são expressos como a diferença de volume (mL) entre a pata que recebeu carragenina e a pata contralateral que recebeu salina.

4.3.2. Edema de pata induzido por Dextrana

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), ciproeptadina (10 mg/Kg, v.o.) e veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.). Após 45 minutos, os animais receberam uma injeção subplantar de Dextrana 0,15 % (50 µL/pata) na pata esquerda e igual volume de salina na pata direita.

Após 2 horas, os animais foram sacrificados e as patas cortadas na junção tíbio-tarsal. O edema foi expresso em miligramas (mg) pela diferença de peso entre a pata esquerda (dextrana) e a pata direita (salina) (Winter et al, 1962).

4.3.3. Edema de Orelha induzido por Óleo de *Croton*

Foi utilizado o teste do edema de orelha induzido por óleo de *Croton* segundo o método de Schiantarelli et al (1982). Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) e veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.).

Uma hora após os tratamentos, foram aplicados topicamente 10 µL de óleo de *Croton* (5 % v/v em acetona) na orelha direita dos animais e o mesmo volume de acetona na orelha esquerda. Após 4 horas, os animais foram sacrificados, retirados fragmentos de 6 mm de diâmetro de cada orelha e pesados. O edema foi expresso em miligramas (mg) pela diferença de peso entre a orelha direita (óleo de *Croton*) e a orelha esquerda (acetona).

4.4. Atividade Antinociceptiva

4.4.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados via oral (v.o.) com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg), ácido acetilsalicílico (250 mg/Kg) e veículo (2 % de Tween 80 em água destilada). Após 45 minutos, receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% (10 mL/Kg). Decorridos 10 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado, para cada animal, durante um período de 20 minutos. Uma contorção sendo identificada como uma extensão das patas traseiras acompanhada de constrição do abdômen (Koster et al, 1959).

4.4.2. Teste da Formalina

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos e morfina (7,5 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subplantar (s.pl.), na pata direita traseira, de formalina 1 % (20 µL/pata). O tempo de lambertura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1ª. Fase) e 20-25 min (2ª. Fase) após a administração da formalina (Hunskaar & Hole, 1987).

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

O papel dos canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) na antinocicepção do óleo essencial de *C.sonderianus* foi determinado pela administração de Glibenclamida (2 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes do tratamento com veículo, OECS (100 mg/Kg, v.o.) e morfina (7,5 mg/Kg, i.p.).

4.4.3. Teste da Placa Quente

O método de Eddy & Leimbach (1953) foi seguido, com pequenas modificações, para verificar a eficácia do OECS contra a nocicepção térmica e de ação central. Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a $51 \pm 0,5$ °C e aqueles que mostraram tempo de reação (saltar ou lambe as patas traseiras) superior a 20 segundos foram descartados. O tempo de reação foi registrado antes e 30, 60 e 90 minutos após a administração de OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), morfina (7,5 mg/Kg, i.p.) e veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.).

4.4.4. Teste da nocicepção induzida por capsaicina

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos e morfina (7,5 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subplantar, na pata direita traseira, de capsaicina (1,6 μ g/pata). O tempo de lambadura da pata foi registrado, em segundos, durante um período de 5 minutos após a injeção da capsaicina (Santos et al, 2003).

O papel do sistema opióide foi determinado pela administração de naloxona (1 mg/Kg, s.c.), 20 minutos antes do tratamento com OECS (200 mg/Kg, v.o.) e morfina (7,5 mg/Kg, i.p.).

O papel dos canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) na antinocicepção do óleo essencial de *C.sonderianus* foi determinado pela administração de Glibenclamida (2 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes do tratamento com OECS (100 mg/Kg, v.o.).

4.4.5. Tempo de Sono induzido por Pentobarbital

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos e clorpromazina (10 mg/Kg, i.m.) 30 minutos antes da administração de pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p.) como agente indutor do sono de acordo com o método de Dandiya & Collumbine (1959). Iniciado o período de sono, em seus respectivos grupos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local de adequada observação; marcou-se o início do sono de cada animal. Os animais foram observados durante todo o tempo de sono; sendo o final deste marcado no momento em que o animal retornou à situação de alerta, caracterizada pela alteração da posição de decúbito dorsal. O período total de observação foi de no máximo 120 min.

O tempo de sono foi calculado para cada animal da seguinte maneira:

$$\text{TS} = \text{T1} - \text{T0}$$

Onde:

TS = tempo de sono (em minutos)

T0 = tempo registrado no início do sono

T1 = tempo registrado no momento que o animal desperta

4.4.6. Atividade motora espontânea

O efeito do OECS sobre a atividade motora espontânea de camundongos foi avaliado na tentativa de verificar uma atividade sedativa/depressora no SNC.

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto, quadrangular, com 30 cm de diâmetro, sendo sua base (local onde ocorre a movimentação dos animais) dividida em 9 quadrados de diâmetros iguais. Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos e diazepam (0,5 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes dos animais serem levados individualmente ao campo aberto e observados durante um período de 4 minutos, baseado no modelo descrito por Capaz et al (1981).

Foi registrada a frequência de locomoção; que é o ato do animal locomover-se com o tronco afastado do chão por meio de movimentos coordenados das quatro patas, deslocando-se horizontalmente sobre a base do campo aberto. A unidade de medida correspondeu ao número de divisões da base do campo aberto nas quais o animal penetrou com as quatro patas. Antes do início da observação, os animais tiveram 1 minuto para adaptação ao campo aberto.

4.5. Atividade sobre o Trato Gastrointestinal

4.5.1. Avaliação do efeito na Motilidade Intestinal

Neste experimento foi utilizado o método de Meli et al (1990). Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) e clonidina (200 µg/Kg, v.o.). Decorridos 45 minutos, os animais receberam carvão ativado 10% em goma arábica 5 % (0,2 mL/animal). Após 20 minutos, os animais foram sacrificados, removidos os estômagos e os intestinos até o reto.

Foi medido o comprimento total do intestino (da região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo carvão do piloro à última porção do intestino que conteve pelo menos 1cm contínuo de carvão.

$$\text{Trânsito intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

4.5.2. Úlcera gástrica induzida por Etanol

Para avaliação da atividade antiulcerogênica do OECS, foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol segundo o método de Robert et al (1979). Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), ciproeptadina (10 mg/Kg, v.o.), capsaicina (5 mg/Kg, v.o.), veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos e N-acetilcisteína (750 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de etanol_{abs} (0,2 mL/animal; v.o.). Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados; os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados com salina 0,9 % e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. As áreas totais e as áreas lesionadas dos estômagos (face glandular) foram determinadas por planimetria. A área lesada foi expressa em termos de percentagem em relação a área total do corpo gástrico.

4.5.3. Úlcera gástrica induzida por indometacina.

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, foram tratados com OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), cimetidina (100 mg/Kg, v.o.) e veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, v.o.). Após 45 minutos, os animais receberam indometacina 20 mg/Kg, v.o., preparada com 0,5 % de carboximetilcelulose e 8 horas depois, os animais foram sacrificados. De acordo com Bhargava (1973), os estômagos foram retirados, instilados com formalina a 5 % por 15 minutos, abertos ao longo da grande curvatura, lavados em salina e inspecionados para atribuições de escores de acordo com Szabo e cols (1985).

Determinação do Índice de Lesão Gástrica Induzida por Indometacina

1. Perda de pregas da mucosa	1 ponto
2. Descoloração da mucosa	1 ponto
3. Edema	1 ponto
4. Hemorragias	1 ponto
5. Número de petéquias	
- até 10	2 pontos
- mais de 10	3 pontos
6. Intensidade da ulceração	
- úlceras ou erosão de até 1mm	n x 2 pontos
- úlceras ou erosão maiores que 1mm	n x 3 pontos
- úlceras perfuradas	n x 4 pontos

n = número de úlceras encontradas

4.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos foi estabelecida pelo teste de múltipla comparação de Student Newman Keul. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Dunn.

Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção e composição química do óleo essencial de *C.sonderianus*.

A extração do óleo essencial por hidrodestilação, a partir das folhas de *C.sonderianus*, produziu 3,0 mL de óleo essencial com uma coloração azul intenso. Utilizando-se cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex LH-20, foi possível o acompanhamento visual da eluição, com metanol (MeOH), de uma faixa azul intenso; que após a evaporação do solvente mostrou-se constituir-se de guaiazuleno puro.

O resultado do estudo dos componentes voláteis do óleo essencial revelou a presença de: (E)-calameneno (9,27%), β -elemeno (6,55%), guaiazuleno (6,53%), β -cariofileno (6,35%), α -muuroleno (6,10%), (Z)-calameneno (4,65%), β -felandreno (4,16%), 1,8-cineol (2,45%), espatulenol (2,07%) e (E)-cadina-1(2), 4-dieno (1,15%). Estes constituintes representam cerca de 49% da composição total do OECS.

5.2. Toxicidade aguda do OECS

O OECS nas doses de 1, 2 e 3 g/Kg, v.o., não produziu alterações comportamentais, não alterou os padrões fisiológicos de evacuação e micção e não foram observadas mortes durante o período de setenta e duas horas.

5.3. Atividade antiinflamatória

5.3.1. Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, não reduziu o volume do edema de pata nos tempos de 4 h e 24 h, quando comparado ao controle. A Indometacina (10 mg/Kg, v.o.), um antiinflamatório não-esteroidal, reduziu significativamente o volume do edema de pata em 4 h ($p < 0,01$) e 24 h ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Figura 7).

5.3.2. Efeito do OECS no edema de pata induzido por dextrana em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg reduziu, significativamente, o edema de pata para $81,67 \pm 2,25$; $73,28 \pm 3,10$ e $68,98 \pm 5,19$ mg, respectivamente, quando comparado ao controle ($93,96 \pm 5,27$ mg). A Ciproheptadina (10 mg/Kg, v.o.), um antagonista H_1 e 5HT, reduziu significativamente ($p < 0,001$) o edema de pata para ($49,16 \pm 3,84$ mg) quando comparado ao controle ($93,96 \pm 5,27$ mg) (Tabela 2 e Figura 8).

5.3.3. Efeito do OECS no edema de orelha induzido por Óleo de *Croton* em camundongos.

O OECS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, via oral, reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o edema de orelha para $2,58 \pm 0,42$ e $2,64 \pm 0,56$ mg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($4,40 \pm 0,47$ mg) (Tabela 3 e Figura 9).

TABELA 1 – Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Edema de pata (mL)	
		4 h	24 h
Controle (veículo)	-	0,073 ± 0,009	0,053 ± 0,014
OECS	50, v.o.	0,050 ± 0,014	0,060 ± 0,001
	100, v.o.	0,043 ± 0,016	0,038 ± 0,012
	200, v.o.	0,045 ± 0,014	0,060 ± 0,019
Indometacina	10, v.o.	0,023 ± 0,003**	0,010 ± 0,004*

Os dados representam a média ± E.P.M. do volume do edema (mL) após 4 h e 24 h da administração da carragenina. Os resultados são expressos como a diferença de volume (mL) entre a pata que recebeu carragenina e a pata contralateral que recebeu salina. O OECS e indometacina foram administrados 45 min. antes da injeção subplantar de carragenina 1 % (20µL/pata). Foram utilizados 8 animais por grupo. * p<0,05 e ** p<0,01 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

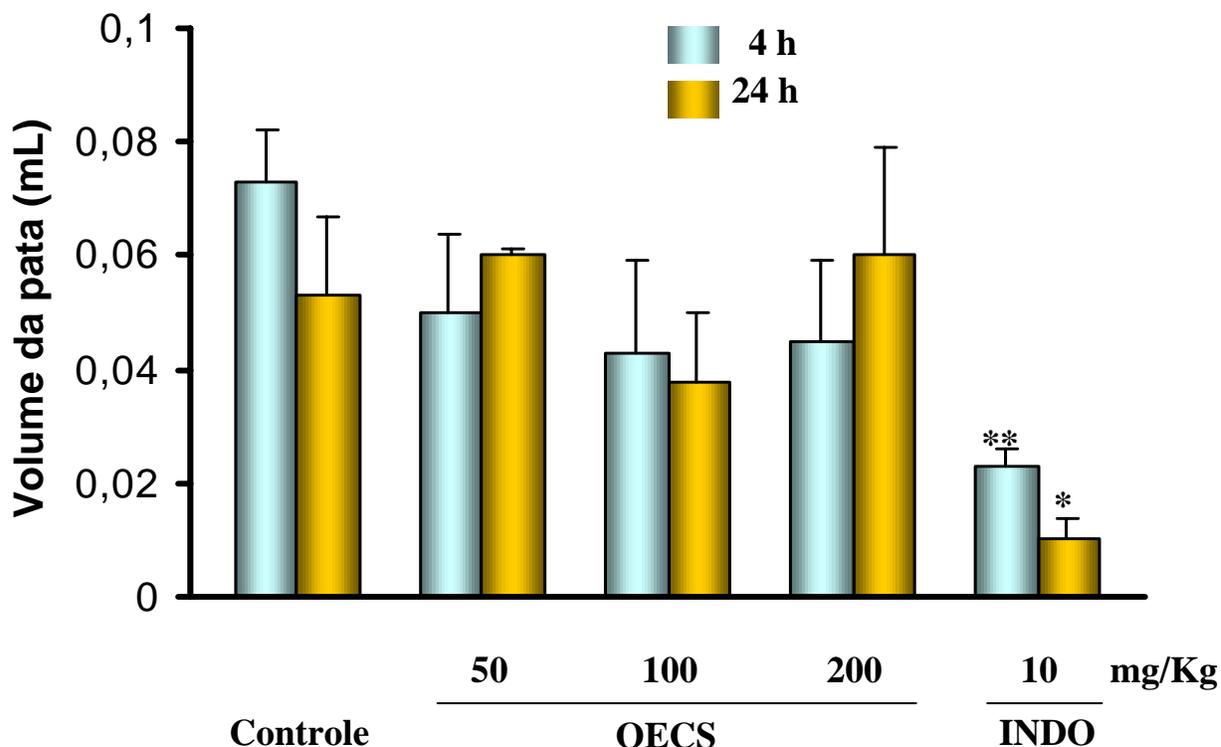


FIGURA 7 – Efeito do OECS no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) e Indometacina (INDO 10 mg/Kg, v.o.) foram administrados 45 min. antes da injeção subplantar de carragenina 1 % (20 μ L/pata). Os valores representam a média \pm E.P.M. do volume do edema (mL) após 4 h e 24 h da administração da carragenina. Os resultados foram avaliados pela diferença de volume entre a pata que recebeu carragenina e a pata contralateral que recebeu salina. Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 2 – Efeito do OECS no edema de pata induzido por Dextrana em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Edema de pata (mg)
Controle (veículo)	-	93,96 ± 5,27
OECS	50, v.o.	81,67 ± 2,25*
	100, v.o.	73,28 ± 3,10**
	200, v.o.	68,98 ± 5,19***
Ciproeptadina	10, v.o.	49,16 ± 3,84***

Os valores são expressos como média ± E.P.M. do edema de pata (mg). O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) e ciproeptadina (10 mg/Kg, v.o.) foram administrados 45 min. antes da injeção subplantar de dextrana 0,15 % (50 µL / pata). Foram utilizados 8 animais por grupo. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

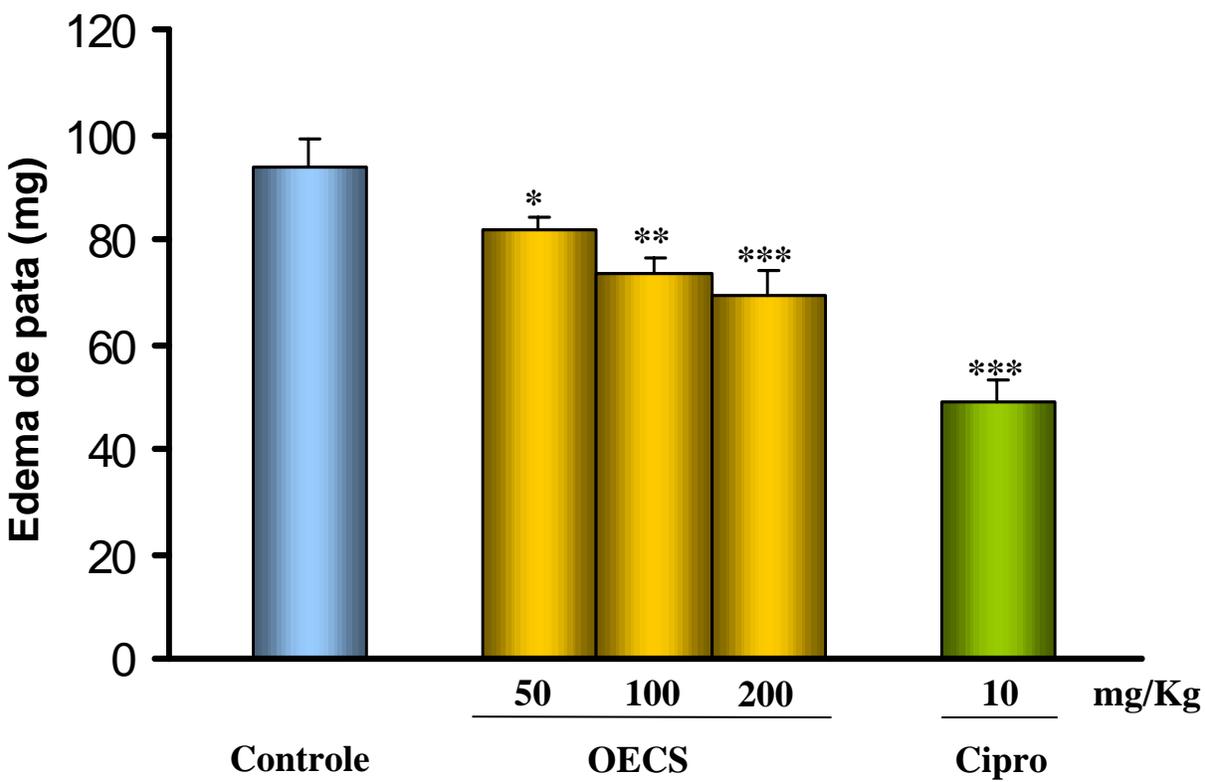


FIGURA 8 – Efeito do OECS no edema de pata induzido por dextrana em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), ciproeptadina (Cipro 10 mg/Kg, v.o.) e veículo (Controle) foram administrados 45 min. antes da injeção subplantar de dextrana 0,15 % (50 μ L/pata). Os resultados representam a média \pm E.P.M. do edema de pata (mg). Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 3 – Efeito do OECS no edema de orelha induzido por Óleo de *Croton* em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Edema de orelha (mg)
Controle (veículo)	-	4,40 ± 0,47
OECS	50, v.o.	3,13 ± 0,61
	100, v.o.	2,58 ± 0,42*
	200, v.o.	2,64 ± 0,56*

Os dados representam a média ± E.P.M. do edema de orelha (mg). O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), foi administrado 45 min. antes da administração tópica de óleo de *Croton* 5 % v/v em acetona (10 µL/orelha). Foram utilizados 8 animais por grupo. *p<0,05 vs controle (ANOVA e teste Student Newman Keul).

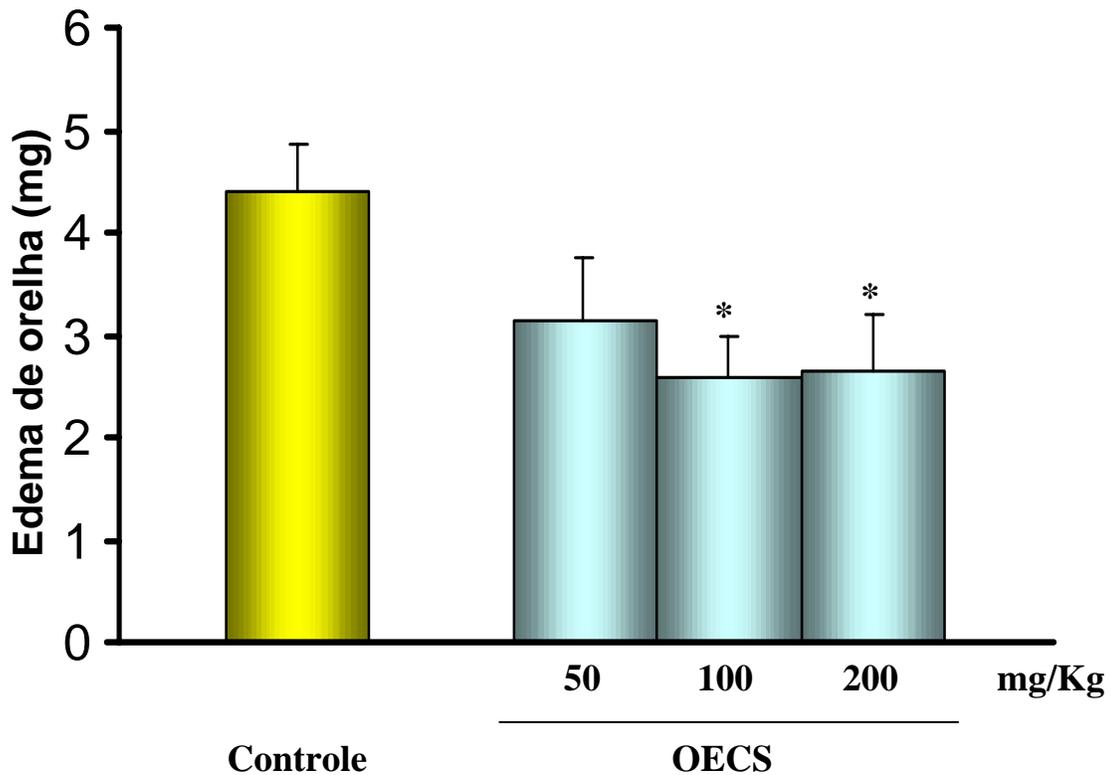


FIGURA 9 – Efeito do OECS no edema de orelha induzido por Óleo de *Croton* em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) e veículo (Controle) foram administrados 45 min. antes da administração tópica de óleo de *Croton* 5 % v/v em acetona (10 μ L/orelha). Os resultados representam a média \pm E.P.M. do edema de orelha (mg). Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

5.4. Atividade antinociceptiva

5.4.1. Efeito do OECS na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o número médio de contorções abdominais para $20,22 \pm 2,98$; $20,25 \pm 3,00$ e $14,12 \pm 1,10$ contorções/20 min, respectivamente, em relação ao grupo controle ($48,38 \pm 5,92$ contorções/20 min); correspondendo a uma inibição de 58, 58 e 70 % respectivamente (Tabela 4 e Figura 10).

O ácido acetilsalicílico (250 mg/Kg, v.o.), um antiinflamatório não-esteroidal, promoveu uma redução de 61 % no número de contorções abdominais (Tabela 4 e Figura 10).

5.4.2. Efeito do OECS na nocicepção induzida por formalina em camundongos.

O OECS (50 mg/Kg, v.o.) promoveu uma redução, significativa ($p < 0,05$), do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata, somente na 1ª fase do teste; nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., OECS promoveu uma redução significativa ($p < 0,01$) nas duas fases do teste; correspondendo a uma inibição de 41 e 41 % (1ª fase), 92 e 89 % (2ª fase) para as respectivas doses, em relação ao grupo controle (Tabela 5 e Figura 11A).

A morfina (7,5 mg/Kg, i.p.), um analgésico opióide, demonstrou uma inibição de 64 % na 1ª fase e de 94 % na 2ª fase do teste em relação ao grupo controle (Tabela 5 e Figura 11A).

A naloxona (1 mg/Kg, s.c.), um antagonista opióide, significativamente ($p < 0,05$) inibiu o efeito antinociceptivo da morfina nas duas fases do teste. Quando administrada sozinha, não alterou a resposta nociceptiva induzida por formalina. Contudo, a naloxona não foi capaz de reverter, de maneira significativa, a antinocicepção induzida por OECS (100 mg/Kg, v.o.) observada nas duas fases do teste quando comparada as duas fases do OECS sozinho (Tabela 5 e Figura 11A).

Glibenclamida (2 mg/Kg, i.p.), um antagonista dos canais de K_{ATP} , reverteu significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção induzida por OECS (100 mg/Kg, v.o.) observada na primeira fase ($64,97 \pm 7,10$ seg.) e segunda fase ($34,51 \pm 3,44$ seg.) do teste em relação a OECS sozinho ($40,47 \pm 4,42$ seg./1ª fase e $2,15 \pm 1,27$ seg./2ª fase) (Tabela 5 e Figura 11B). Glibenclamida sozinha não alterou, significativamente, o efeito nociceptivo da formalina e não alterou a antinocicepção induzida por morfina nas duas fases do teste (Tabela 5 e Figura 11B).

5.4.3. Efeito do OECS no teste da Placa Quente em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, quando comparado ao controle, não prolongou significativamente o tempo de reação à placa quente ($51 \pm 0,5$ °C) nos intervalos de registro estudados. Morfina (7,5 mg/Kg, i.p.), um analgésico opióide, prolongou de maneira significativa

($p < 0,001$) o tempo de reação dos animais nos tempos de 30 min. ($40,11 \pm 2,57$ seg.) e 60 min. ($34,52 \pm 3,23$ seg.) quando comparado ao grupo controle ($17,33 \pm 1,71$ seg.; $t = 30$ min. e $14,58 \pm 1,71$ seg.; $t = 60$ min.) (Tabela 6 e Figura 12).

5.4.4. Efeito do OECS na nocicepção induzida por Capsaicina em camundongos.

OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração de capsaicina ($1,6 \mu\text{g/pata}$) para $18,00 \pm 4,88$ seg., $15,87 \pm 6,81$ seg. e $9,00 \pm 3,61$ seg., respectivamente, em relação ao grupo controle ($56,37 \pm 6,83$ seg.); correspondendo a uma inibição de 68, 71 e 84 % respectivamente (Tabela 7 e Figura 13).

A morfina ($7,5$ mg/Kg, i.p.) demonstrou uma inibição de 95 % no tempo gasto pelos animais lambendo a pata ($2,43 \pm 1,63$ seg.) quando comparado ao controle ($56,37 \pm 6,83$ seg.) (Tabela 7 e Figura 13).

A Naloxona (1 mg/Kg, s.c.), significativamente ($p < 0,05$), inibiu o efeito antinociceptivo da morfina; contudo, não foi capaz de reverter, de maneira significativa, a antinocicepção induzida por OECS (100 mg/Kg, v.o.) (Tabela 7 e Figura 13).

Glibenclamida (2 mg/Kg, i.p.) reverteu, significativamente ($p < 0,05$), a antinocicepção induzida por OECS (100 mg/Kg, v.o.) para $34,51 \pm 3,44$ seg. em relação a OECS ($2,15 \pm 1,27$ seg.) (Tabela 7 e Figura 13).

TABELA 4 – Efeito do OECS no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Nº de contorções/20min	% de Inibição
Controle (veículo)	-	48,38 ± 5,92	-
OECS			
	50, v.o.	20,22 ± 2,98***	58
	100, v.o.	20,25 ± 3,00***	58
	200, v.o.	14,12 ± 1,10***	70
Ácido Acetilsalicílico	250, v.o.	18,49 ± 3,30***	61

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de contorções abdominais exibidas pelos animais durante 20 min., começados a contar 10 min. após a injeção do ácido acético 0,6 % (10 mL/10 g; i.p.). Veículo (controle), OECS e ácido acetilsalicílico foram administrados 45 min. antes da injeção de ácido acético 0,6 %. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** p<0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

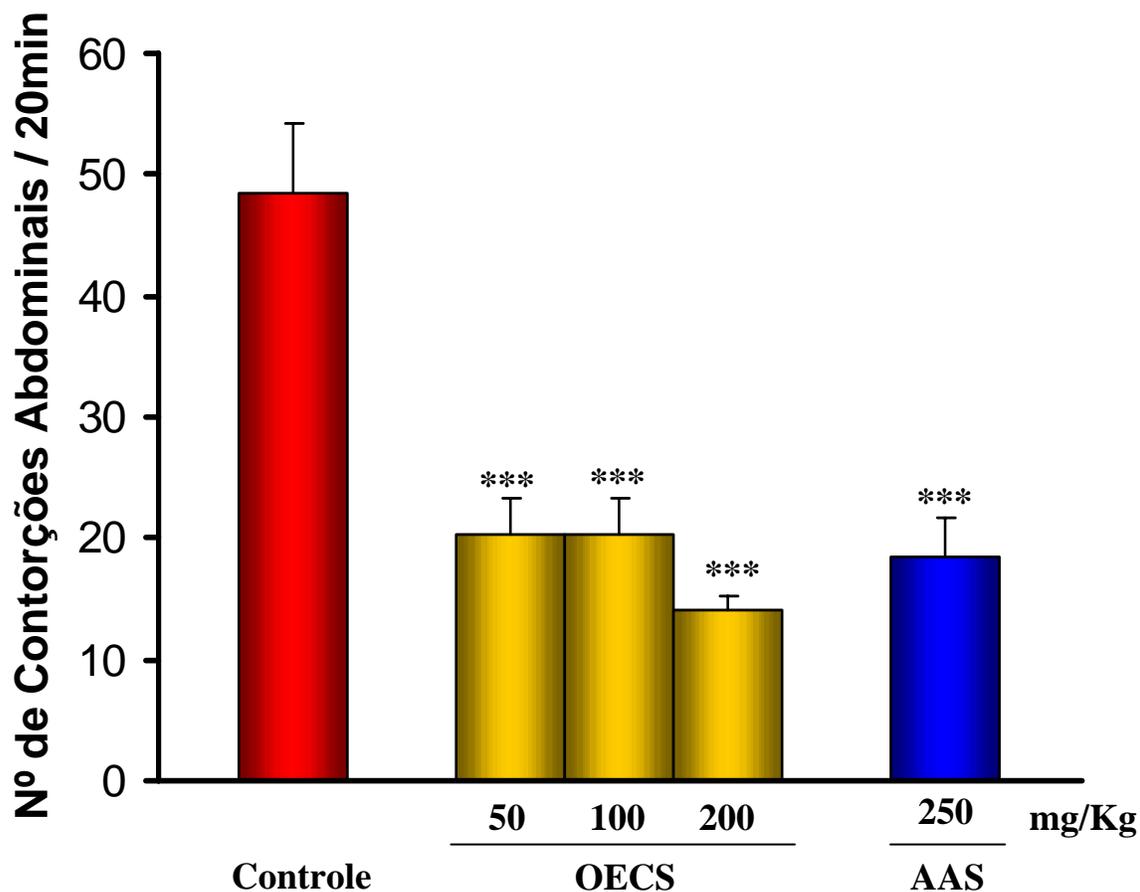


FIGURA 10 – Efeito do OECS sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. O OECS 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o., ácido acetilsalicílico (AAS 250 mg/Kg, v.o.) e veículo (Controle) foram administrados 45 min. antes da injeção de ácido acético 0,6 % (10 mL/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais durante 20 min., começados a contar 10 min. após a injeção do ácido acético 0,6 %. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 5 – Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Tempo (s)		% de Inibição	
		1ª Fase	2ª Fase	1ª Fase	2ª Fase
Controle (veículo)	-	69,50 ± 5,28	29,50 ± 5,49	-	-
OECS	50, v.o.	49,87 ± 6,06 ^a	37,00 ± 9,90	28	-
	100, v.o.	40,47 ± 4,42 ^b	2,15 ± 1,27 ^b	41	92
	200, v.o.	40,55 ± 6,17 ^b	3,22 ± 1,73 ^b	41	89
Morfina	7,5 i.p.	24,75 ± 6,65 ^b	1,71 ± 1,71 ^b	64	94
Naloxona	1,0 s.c.	87,00 ± 8,92	50,12 ± 6,33	-	-
Naloxona +	1,0 s.c.	60,62 ± 11,35 ^c	33,50 ± 12,04 ^c	-	-
	+				
Morfina	7,5 i.p.				
Naloxona +	1,0 s.c.	50,75 ± 6,29 ^{a,1}	5,62 ± 2,26 ^{b,1}	27	81
	+				
	OECS				
Glibenclamida	2,0 i.p.	83,27 ± 11,43	37,99 ± 7,03	-	-
Glibenclamida +	2,0 i.p.	37,08 ± 13,04	3,79 ± 1,69	-	-
	+				
Morfina	7,5 i.p.				
Glibenclamida +	2,0 i.p.	64,97 ± 7,10 ^d	34,51 ± 3,44 ^d	-	-
	+				
	OECS				
	100 v.o.				

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto pelos animais lambendo a pata, registrado de 0-5 min. (1ª fase) e 20-25 min. (2ª fase) após a injeção subplantar de formalina 1 % (20 µL/pata). Veículo, OECS foram administrados 45 min. e morfina 30 min. antes da injeção de formalina. Naloxona e Glibenclamida foram administradas 15 min. antes do tratamento com veículo, morfina ou OECS. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,05 vs controle, ^bp<0,01 vs controle, ^cp<0,05 vs morfina, ^dp<0,05 vs OECS (100 mg/Kg, v.o.) e ¹ns vs OECS (100 mg/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

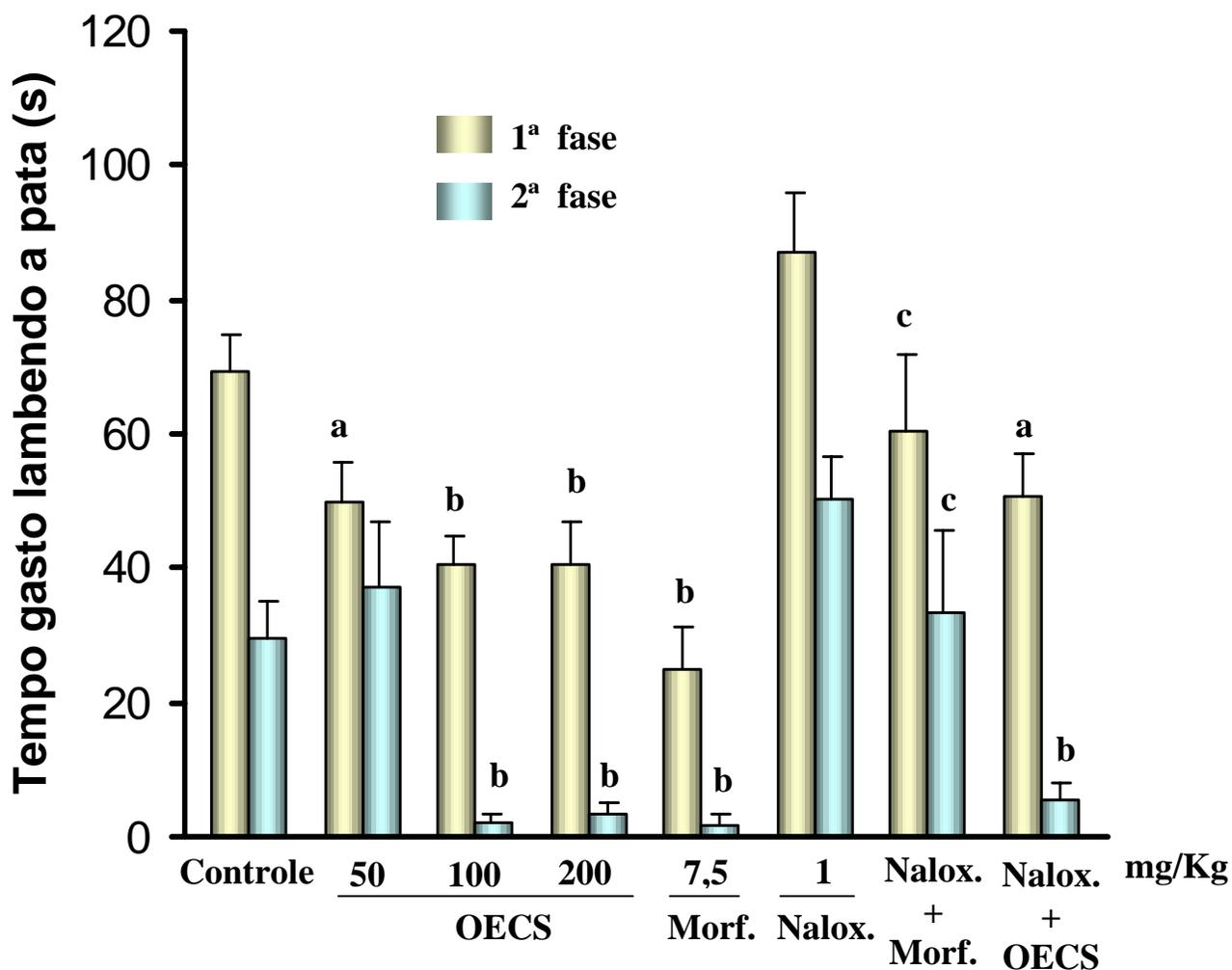


FIGURA 11A – Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) foram administrados 45 min. e morfina (Morf. 7,5 mg/Kg, i.p.) 30 min. antes da injeção subplantar de formalina 1 % (20 μ L/pata). Naloxona (Nalox. 1 mg/Kg, s.c.) foi administrada 15 min. antes do tratamento com veículo, morfina ou OECS (100 mg/Kg, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo gasto pelos animais lambendo a pata na 1ª fase (0-5 min.) e 2ª fase (20-25 min.) do teste. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs controle, ^b $p < 0,01$ vs controle e ^c $p < 0,05$ vs morfina (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

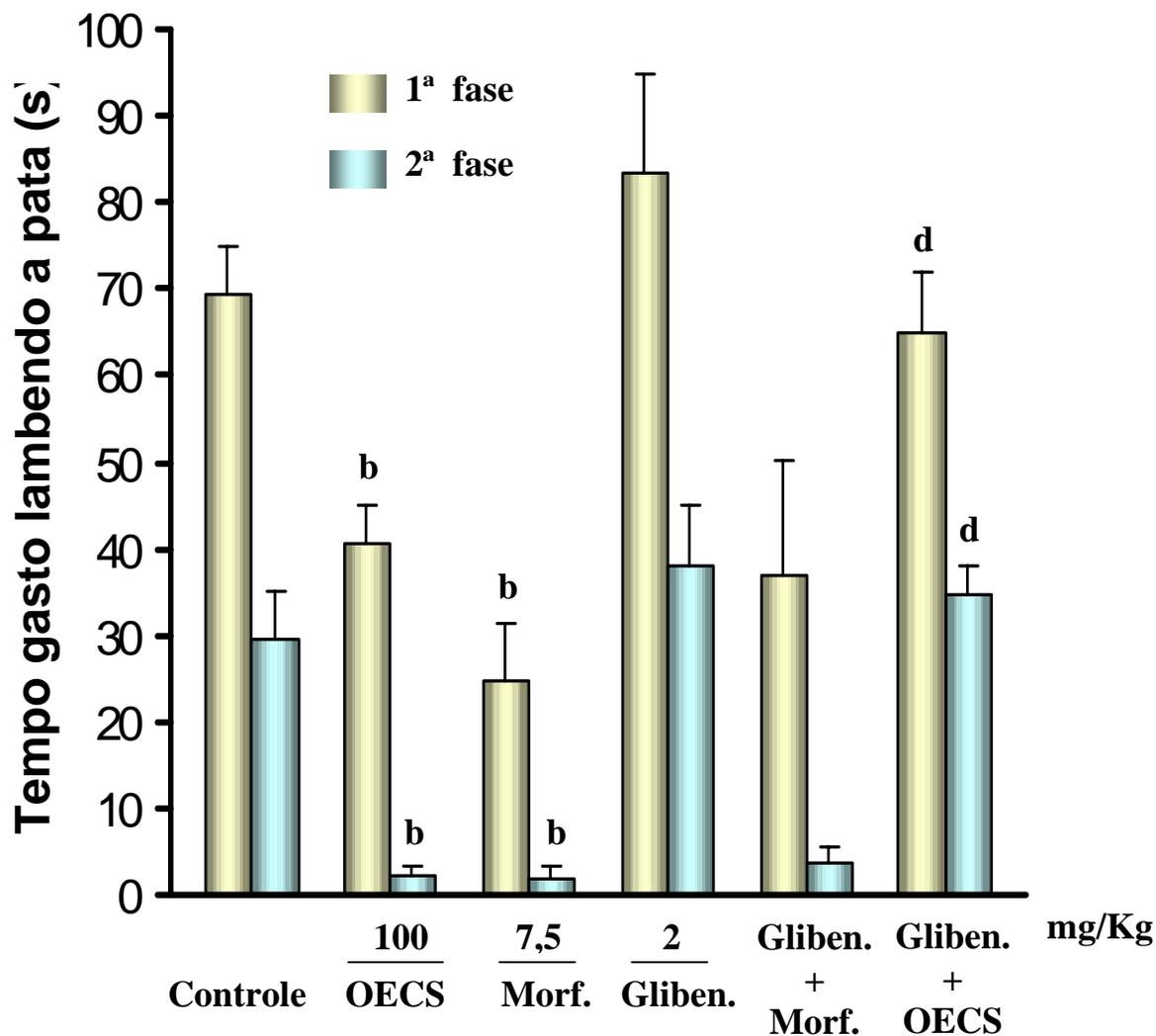


FIGURA 11B – Efeito do OECS no teste da formalina em camundongos. O OECS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) foram administrados 45 min. e morfina (7,5 mg/Kg, v.o.) 30min antes da injeção subplantar de formalina 1% (20 μ L/pata). Glibenclamida (2 mg/Kg, v.o.) foi administrada 15 min. antes do tratamento com veículo, morfina ou OECS. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo gasto pelos animais lambendo a pata na 1ª fase (0-5 min.) e 2ª fase (20-25 min.) do teste. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^b $p < 0,01$ vs controle, ^d $p < 0,05$ vs OECS (100 mg/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 6 – Efeito do OECS no teste da Placa quente em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Tempo de Reação (seg.)			
		t=0	t=30	t=60	t=90
Controle (veículo)	-	17,51 ± 0,54	17,33 ± 1,71	14,58 ± 1,71	15,70 ± 1,61
OECS					
	50, v.o.	17,00 ± 1,13	23,82 ± 2,76	20,02 ± 2,53	15,71 ± 2,28
	100, v.o.	15,95 ± 0,87	20,27 ± 1,24	17,81 ± 1,22	17,07 ± 2,05
	200, v.o.	17,86 ± 0,78	20,92 ± 2,65	15,22 ± 2,47	26,07 ± 4,23
Morfina	7,5 i.p.	15,63 ± 0,90	40,11 ± 2,57***	34,52 ± 3,23***	24,12 ± 5,17

Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo de reação (em segundos) à placa quente ($51 \pm 0,5$ °C), que consiste em os animais saltarem ou lamberem as patas traseiras, registrado antes (t=0) e 30, 60, 90 min. (t=30; t=60; t=90) após os tratamentos. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

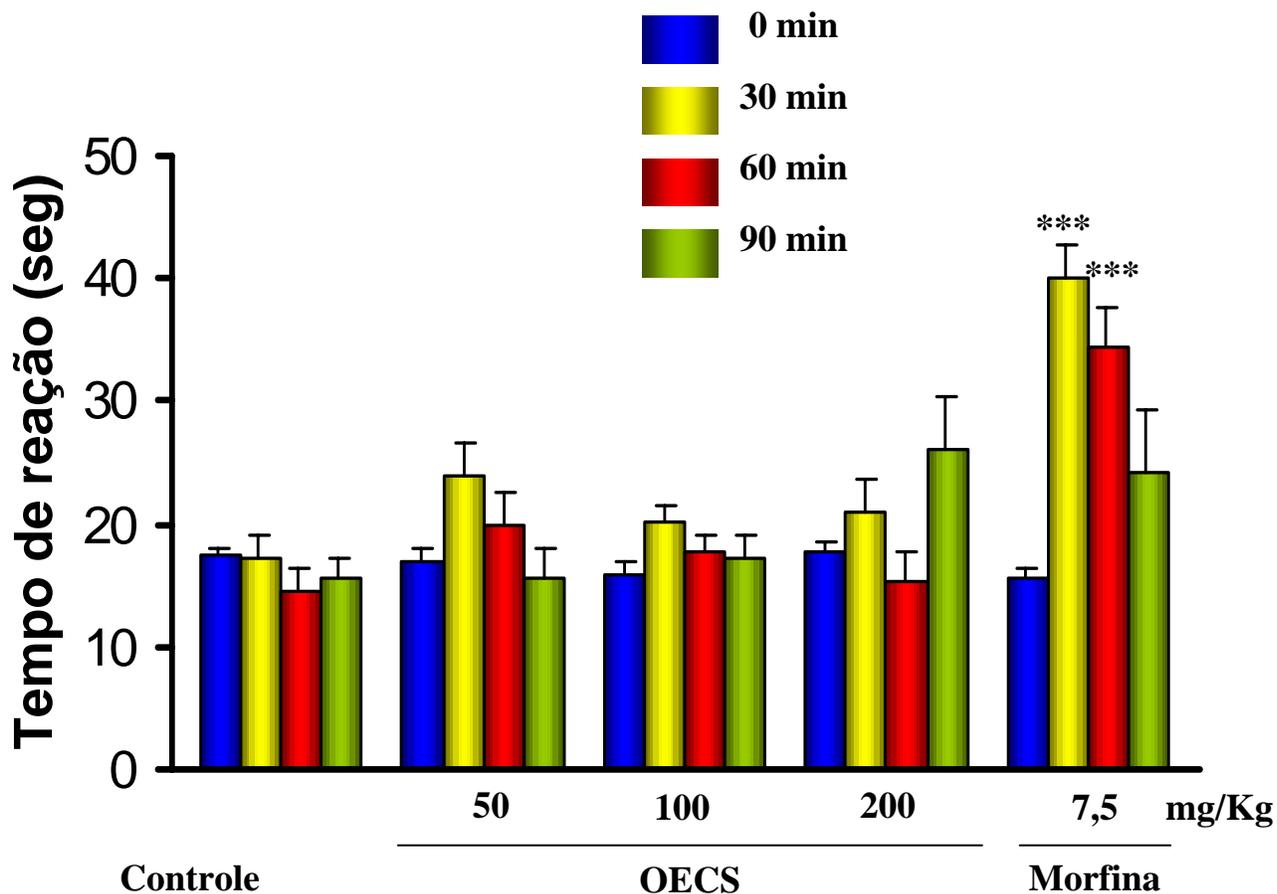


FIGURA 12 – Efeito do OECS no teste da Placa Quente em camundongos. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de reação (em segundos), que consiste em os animais saltarem ou lambem as patas traseiras após serem colocados na Placa Quente ($51 \pm 0,5$ °C), registrado antes ($t=0$) e 30, 60, 90 min. ($t=30$; $t=60$; $t=90$) após o tratamento com as drogas. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 7 – Efeito do OECS no Teste da nocicepção induzida por Capsaicina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Tempo gasto lambendo a pata (seg)	% Inibição
Controle (veículo)	-	56,37 ± 6,83	-
OECS	50, v.o.	18,00 ± 4,88 ^a	68
	100, v.o.	15,87 ± 6,81 ^a	71
	200, v.o.	9,00 ± 3,61 ^a	84
Morfina	7,5 i.p.	2,43 ± 1,63 ^a	95
Naloxona +	1,0 s.c. +	44,06 ± 7,27 ^b	-
Morfina	7,5 i.p.		
Naloxona +	1,0 s.c. +	10,41 ± 3,74 ^{a, 1}	81
OECS	100, v.o.		
Glibenclamida +	2,0 i.p. +	48,00 ± 6,76 ^c	-
OECS	100, v.o.		

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto (seg) pelos animais lambendo a pata por um período de 5 min. após a injeção subplantar de capsaicina (1,6 µg/pata). Veículo, OECS foram administrados 45 min. e morfina 30 min. antes da administração de capsaicina. A Naloxona foi administrada 15 min. antes do tratamento com morfina ou OECS. A Glibenclamida foi administrada 15 min. antes do tratamento com OECS. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,001 vs controle, ^bp<0,05 vs morfina, ^cp<0,05 vs OECS (100 mg/Kg, v.o.) e ¹ns vs OECS (100 mg/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

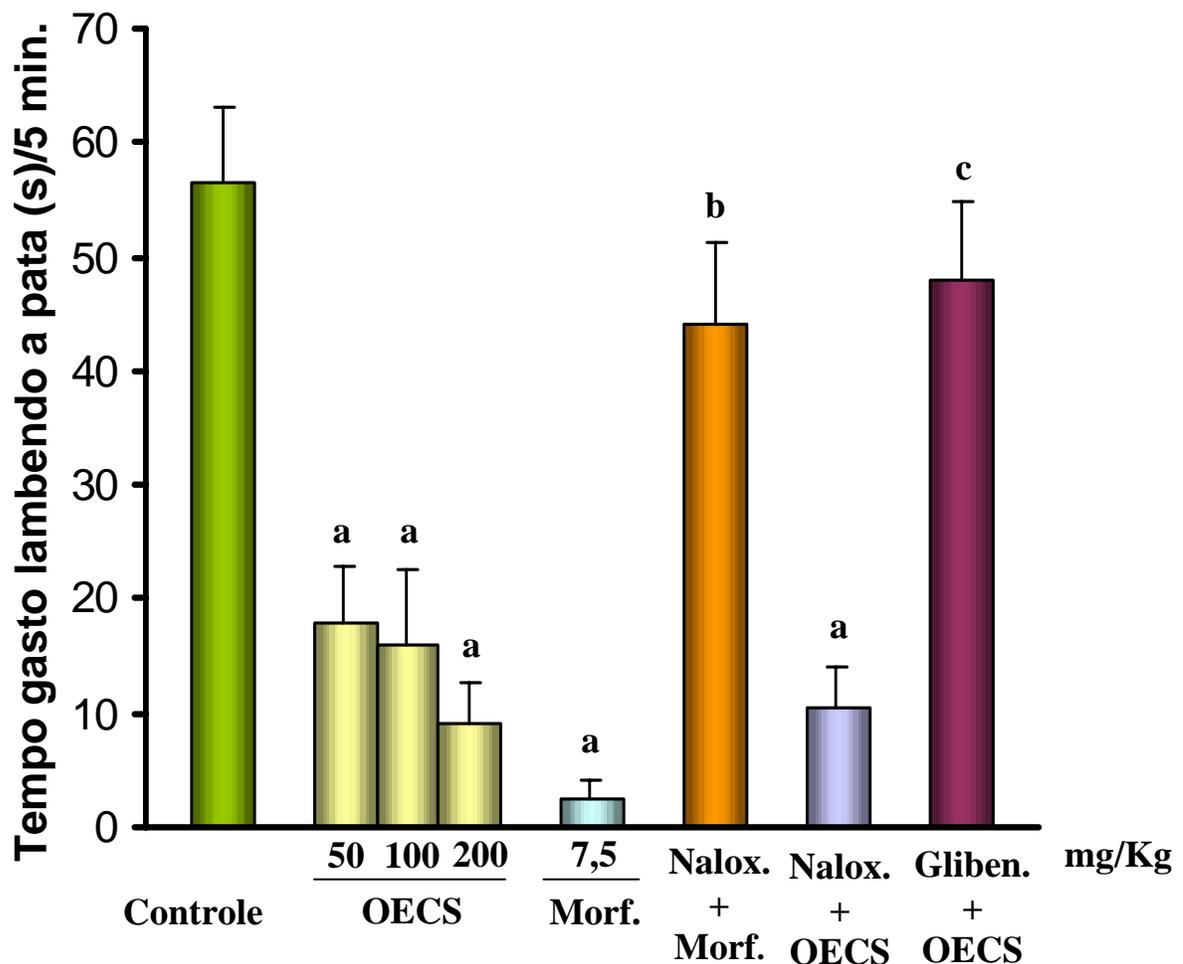


FIGURA 13 – Efeito do OECS no teste da Capsaicina em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) foram administrados 45 min. e morfina (Morf. 7,5 mg/Kg, i.p.) 30 min. antes da injeção subplantar de Capsaicina (1,6 µg/pata). Naloxona (Nalox. 1mg/Kg, s.c.) e Glibenclamida (Gliben. 2 mg/Kg, i.p.) foram administradas 15 min. antes do tratamento com morfina ou OECS (100 mg/Kg, v.o.), respectivamente. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo gasto pelos animais lambendo a pata (seg) por um período de 5 min. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,001 vs controle, ^bp<0,05 vs morfina, ^cp<0,05 vs OECS (100mg/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

5.4.5. Efeito do OECS no tempo de sono induzido por Pentobarbital em camundongos.

O OECS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, via oral, não prolongou, significativamente, o tempo de sono induzido por Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p.) quando comparado ao controle. Clorpromazina (10 mg/Kg, i.m.) prolongou, de maneira significativa ($p < 0,001$), o tempo de sono ($172,21 \pm 16,34$ min.) quando comparado ao controle ($31,00 \pm 1,92$ min.) (Tabela 8 e Figura 14).

5.4.6. Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos.

O OECS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, via oral, comparado ao controle, não reduziu significativamente a frequência de locomoção dos animais na arena do campo aberto no período de 4 minutos. Diazepam (0,5 mg/Kg, i.p.) reduziu, de maneira significativa ($p < 0,001$), a frequência de locomoção dos animais para $24,71 \pm 3,42$ quando comparado ao controle $57,50 \pm 7,25$ (Tabela 9 e Figura 15).

TABELA 8 – Efeito do OECS sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Tempo de sono (min.)
Controle (veículo)	-	31,00 ± 1,92
OECS	100, v.o.	33,73 ± 7,75
	200, v.o.	42,25 ± 7,41
Clorpromazina	10, i.m.	172,21 ± 16,34***

Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo de sono dos animais (min.), que foi registrado desde o momento do início do sono até o retorno à posição de alerta. Os animais foram observados durante um período total de 20 minutos. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** p<0,001 vs controle (ANOVA teste Student Newman Keul).

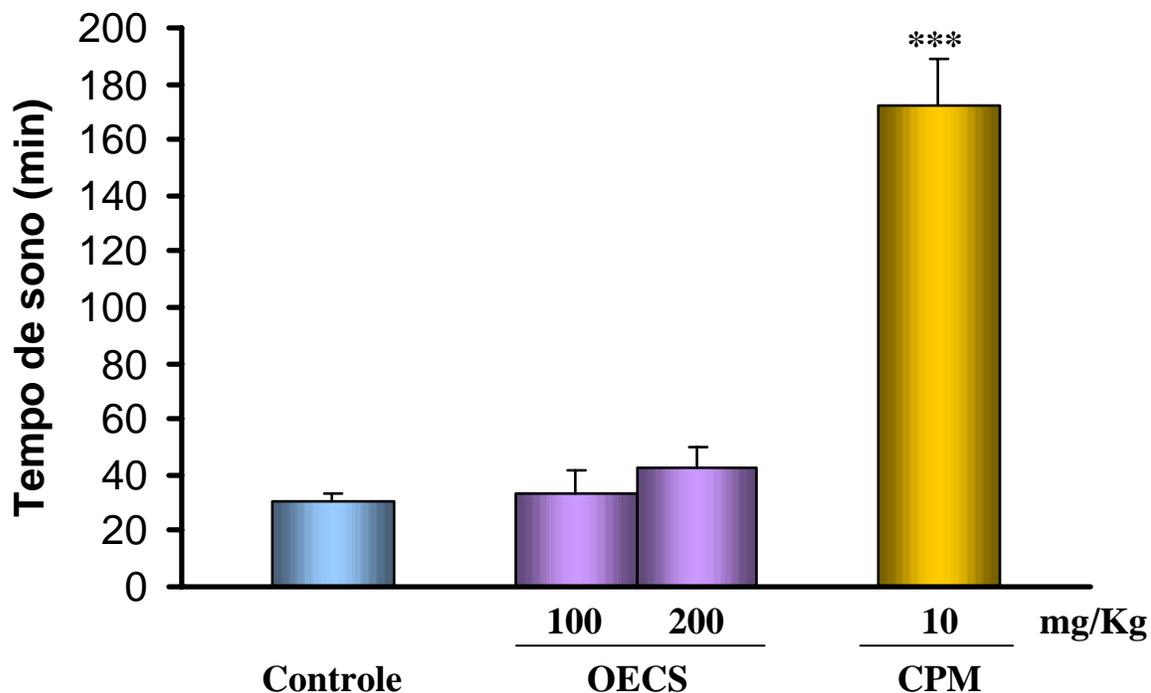


FIGURA 14 – Efeito do OECS sobre o tempo de sono induzido por Pentobarbital em camundongos. O OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) foram administrados 45 min. e clorpromazina (CPM 10 mg/Kg, i.m.) 30 min. antes da injeção de Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 9 – Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Frequência de locomoção / 4 min.
Controle (veículo)	-	57,50 ± 7,25
OECS	100, v.o.	35,62 ± 5,84
	200, v.o.	43,75 ± 2,32
Diazepam	0,5 i.p.	24,71 ± 3,42***

Os dados representam a média ± E.P.M. da frequência de locomoção, que consiste no ato do animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do campo aberto durante um período de 4 min., registrada 45 min. após o tratamento com OECS e 30 min após o tratamento com diazepam. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** p <0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

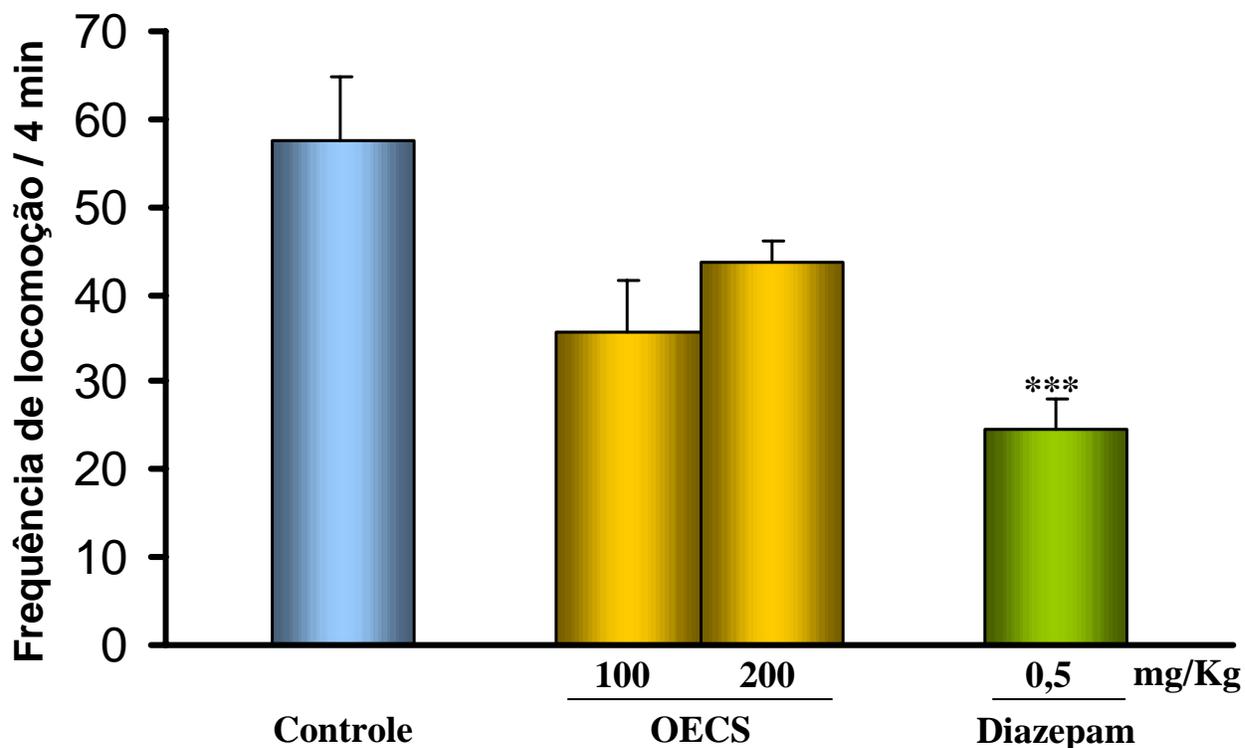


FIGURA 15 – Efeito do OECS na frequência de locomoção em camundongos. O OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) foram administrados 45 min. e diazepam (0,5 mg/Kg, i.p.) 30 min. antes dos animais serem colocados na arena do campo aberto e observada a frequência de locomoção dos animais, por um período de 4 min. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

5.5. Atividade sobre o Trato Gastrointestinal

5.5.1. Efeito do OECS sobre a Motilidade Intestinal em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, não alterou, de maneira significativa, a percentagem do percurso intestinal do carvão ativo ($53,78 \pm 4,77$; $65,78 \pm 5,91$ e $68,21 \pm 8,80$ %, respectivamente) quando comparado ao controle ($62,73 \pm 13,34$ %) (Tabela 10 e Figura 16).

A Clonidina (200 μ g/Kg, v.o.), um agonista dos receptores α_2 , reduziu significativamente ($p < 0,001$) o trânsito intestinal ($21,74 \pm 2,12$ %) quando comparado ao grupo controle ($62,73 \pm 13,34$ %) (Tabela 10 e Figura 16).

5.5.2. Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Etanol em camundongos.

O OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via oral, reduziu significativamente o percentual de área ulcerada para $5,00 \pm 0,89$; $3,58 \pm 1,50$ e $6,51 \pm 1,82$ %, respectivamente, comparado ao controle ($12,61 \pm 1,27$ %) (Tabela 11 e Figura 17). A Ciproheptadina (10 mg/Kg, v.o.), um antagonista H_1 e 5HT, reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$), o percentual de área ulcerada ($1,80 \pm 0,43$ %) quando comparado ao controle ($12,61 \pm 1,27$ %). Capsaicina (5 mg/Kg, v.o.), um agonista dos receptores VR_1 , foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$), o percentual de área gástrica lesionada ($5,86 \pm 1,50$ %) comparado ao controle. A N-acetilcisteína (750 mg/Kg, i.p.), um agente antioxidante celular, reduziu significativamente ($p < 0,01$) o percentual de área ulcerada (Tabela 11 e Figura 17).

TABELA 10 – Efeito do OECS no Trânsito Intestinal em camundongos.

Grupo	Dose (via)	% Trânsito
Controle (veículo)	-	62,73 ± 13,34
OECS	50 mg/Kg, v.o.	53,78 ± 4,77
	100 mg/Kg, v.o.	65,78 ± 5,91
	200 mg/Kg, v.o.	68,21 ± 8,80
Clonidina	200 µg/Kg, v.o.	21,74 ± 2,12***

Os dados representam a média ± E.P.M. da percentagem do trânsito intestinal. O OECS e clonidina foram administrados 45 min. antes da administração do carvão ativo (10 % em 5 % de goma arábica). Foram utilizados 8 animais por grupo. *** p<0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keuls).

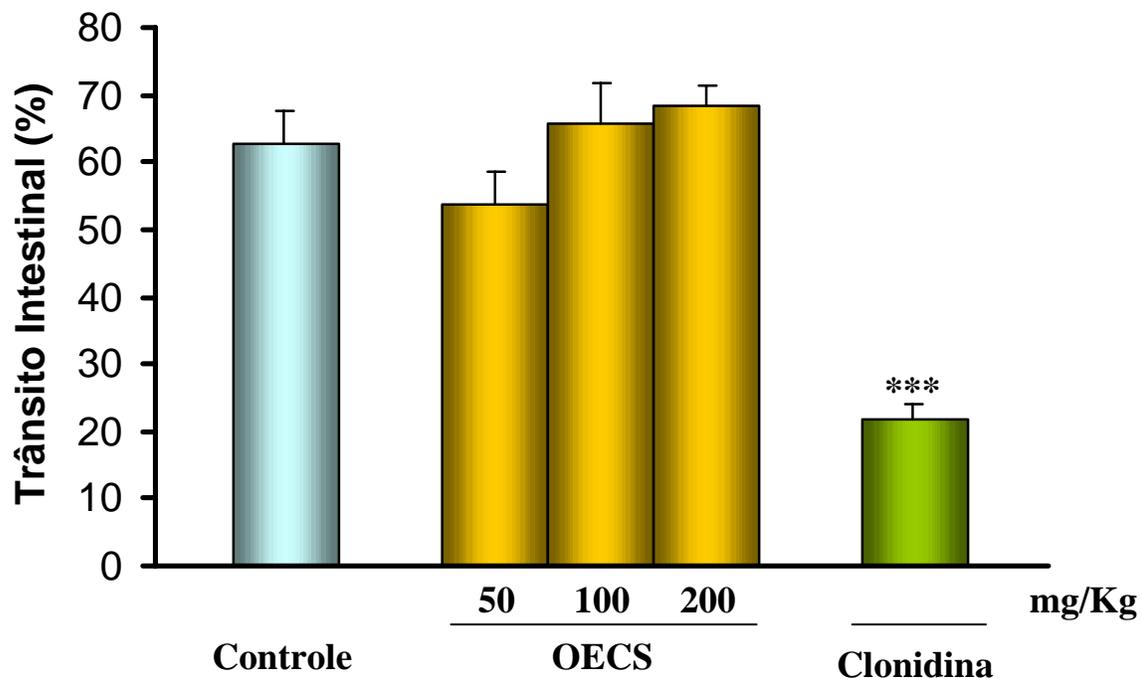


FIGURA 16 – Efeito do OECS sobre o trânsito intestinal em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), clonidina (200 μ g/Kg, v.o.) e veículo (Controle) foram administrados 45 min. antes da administração do carvão ativo. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

TABELA 11 – Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Etanol em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	% Área ulcerada
Controle (veículo)	-	12,61 ± 1,27
OECS	50, v.o.	5,00 ± 0,89**
	100, v.o.	3,58 ± 1,50***
	200, v.o.	6,51 ± 1,82**
Ciproeptadina	10, v.o.	1,80 ± 0,43***
Capsaicina	5,0 v.o.	5,86 ± 1,50**
N-acetilcisteína	750, i.p.	6,25 ± 1,39**

Os valores estão expressos como média ± E.P.M. da variação de percentagem de área ulcerada. O OECS, ciproeptadina e capsaicina foram administrados 45 min. e N-acetilcisteína 30 min. antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Foram utilizados 8 animais por grupo. **p<0,01 e *** p<0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

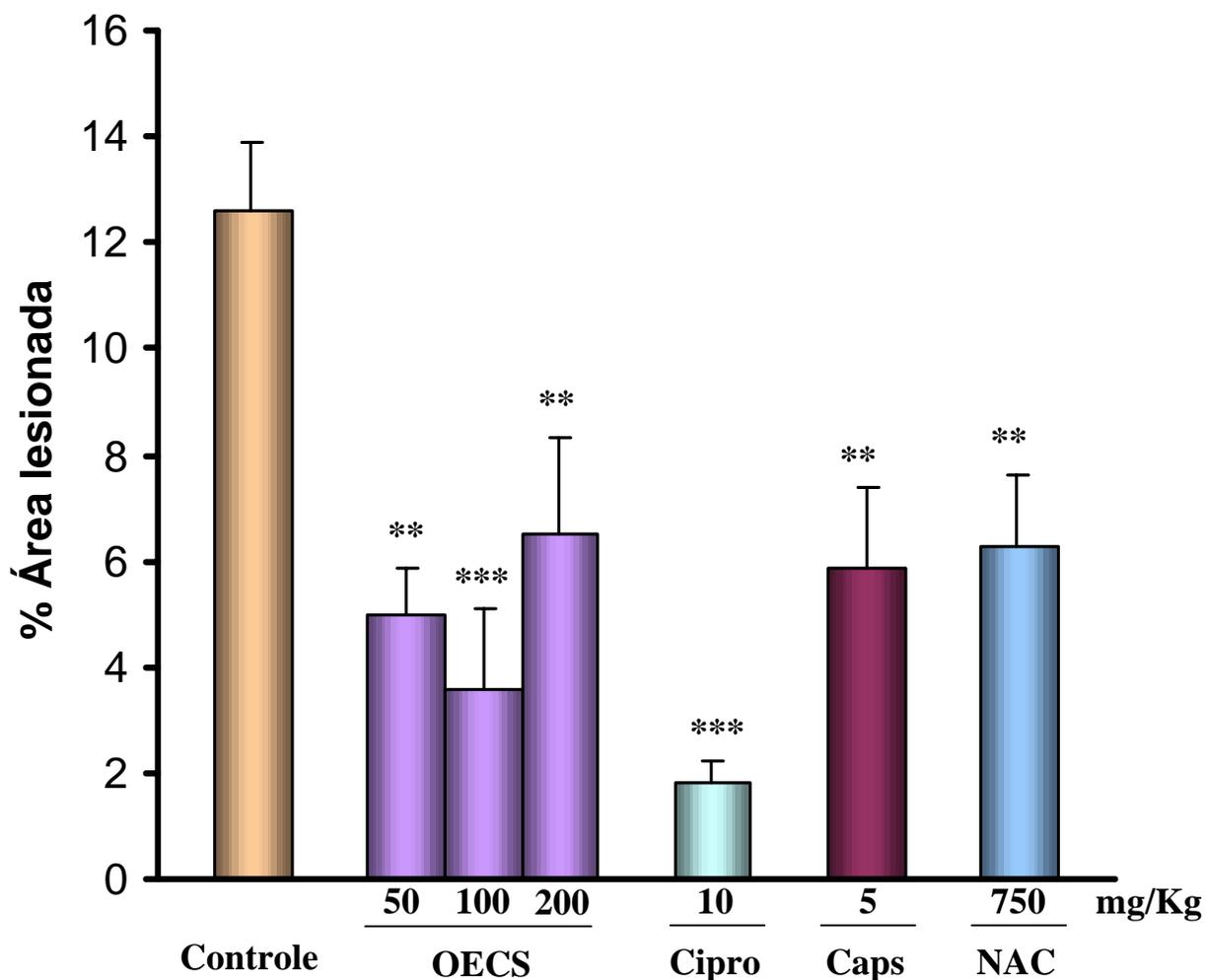


FIGURA 17 – Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Etanol em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle), Ciproptadina (Cipro 10 mg/Kg, v.o.) e Capsaicina (Caps 5mg/Kg, v.o.) foram administrados 45 min. e N-acetilcisteína (NAC 750 mg/Kg, i.p.) 30min. antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Foram utilizados 8 animais por grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

5.3.2. Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos.

A Indometacina (20 mg/Kg, v.o.) produziu lesões gástricas com uma média de escores de $17,57 \pm 1,71$. Este efeito foi reduzido, significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,05$) pelo OECS nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., ($6,25 \pm 1,11$; $6,83 \pm 0,75$ escores, respectivamente) (Tabela 12 e Figura 18).

Cimetidina (100 mg/Kg, v.o.), um antagonista dos receptores H_2 , reduziu de maneira significativa ($p < 0,01$), a média de escores de lesões gástricas para $5,50 \pm 1,60$ quando comparada ao controle (Tabela 12 e Figura 18).

TABELA 12 – Efeito OECS nas lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	Lesão gástrica (escores)
Controle (veículo)	-	17,57 ± 1,71
OECS	50, v.o.	6,25 ± 1,11**
	100, v.o.	6,83 ± 0,75*
	200, v.o.	8,71 ± 1,49
Cimetidina	100, v.o.	5,50 ± 1,60**

Os valores estão expressos como média ± E.P.M. da variação de escores dos animais. O OECS e cimetidina foram administrados 45 min. antes da administração oral de indometacina (20 mg/Kg). Foram utilizados 8 animais por grupo. * p<0,05 e ** p<0,01 vs controle (teste de Dunn).

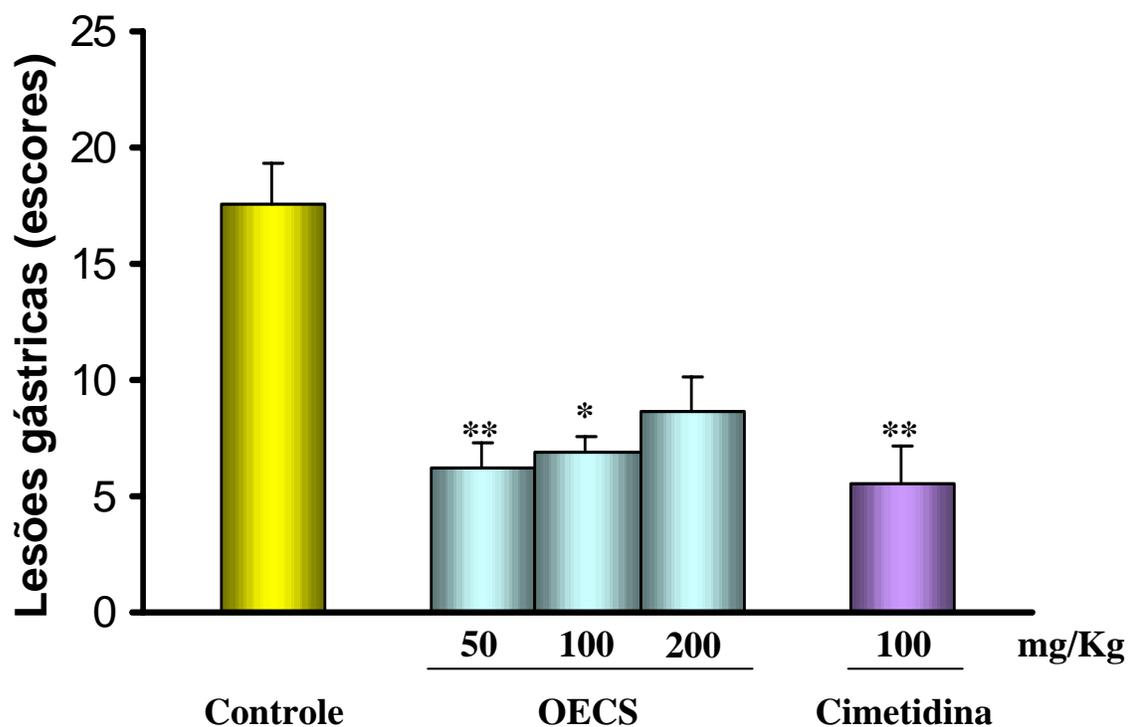


FIGURA 18 – Efeito do OECS nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos. O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (Controle) e Cimetidina (100 mg/Kg, v.o.) foram administrados 45 min. antes da administração de indometacina (20 mg/Kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle (teste de Dunn).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais extraídos de plantas possuem um papel significativo na economia do homem, principalmente, por suas aplicações nas indústrias de sabão, cosméticos e perfumaria. Muitos dos óleos essenciais e seus constituintes exibem várias atividades farmacológicas e a pesquisa destes pode, talvez, produzir novos compostos fitoquímicos, a baixos custos, estimulando a indústria farmacêutica (Santos et al, 1996). Devido a falta de estudos relacionados ao OECS, investigamos suas atividades farmacológicas em modelos animais, avaliando os possíveis mecanismos de ação.

Vários tipos de modelos experimentais de inflamação podem ser utilizados para avaliar a atividade antiinflamatória de drogas. No presente estudo, analisamos o efeito antiinflamatório do OECS em três modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos: edema de pata induzido por carragenina (Winter et al, 1962; Henriques et al, 1987), edema de pata induzido por dextrana (Winter et al, 1962) e edema de orelha induzido por óleo de *Croton* (Schiantarelli et al, 1982).

O edema de pata induzido por carragenina, em ratos, é um modelo de inflamação aguda adequado para avaliar drogas antiinflamatórias e tem sido utilizado frequentemente para avaliar o efeito antiinflamatório de produtos naturais (Santos, 1999; Hajare et al, 2001; Oliveira et al, 2004). A carragenina constitui um agente flogístico de escolha para avaliar drogas antiinflamatórias por depender inteiramente de estímulo local e sua ação inflamatória pode ser inibida por drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais como, por exemplo, dexametasona e indometacina (Henriques et al, 1987; Carvalho et al, 1996; Santos, 1999; Srinivasan et al, 2001).

O edema de pata induzido pela injeção de carragenina, em ratos, é associado com a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente associada com a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Carvalho et al, 1996; França et al, 2001; Hajare et al, 2001, Srinivasan et al, 2001).

O edema de pata induzido por carragenina, em camundongos, também constitui um interessante modelo para estudo de mediadores da inflamação e para triagem de novas drogas antiinflamatórias. Embora menos sensíveis, camundongos também respondem ao agente flogístico. Estudos demonstraram que o extravasamento de proteínas plasmáticas na pata de rato é maior 1 h após a injeção de carragenina e decresce a partir de 4 h; enquanto que o extravasamento de albumina nos camundongos continua por mais de 24 h após o estímulo. O edema de pata induzido por carragenina em camundongos é desenvolvido em duas fases características: a 1ª fase (0 – 24 h), e a 2ª fase (após 24 h) da injeção de carragenina. Durante a 1ª fase, neutrófilos são as células predominantes; estas células são potencialmente capazes de liberar agentes inflamatórios tais como: histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (Henriques et al, 1987).

No modelo do edema de pata induzido por carragenina, em camundongos, OECS não reduziu, de maneira significativa, o volume do edema medido na 4ª hora e na 24ª hora após a injeção de carragenina. A indometacina (10 mg/Kg, v.o.), um conhecido agente antiinflamatório não-esteroidal, reduziu significativamente, o edema na 4ª hora e na 24ª hora após a injeção de carragenina.

O edema de pata induzido por dextrana é um modelo útil para detectar o efeito antiedematogênico de substâncias úteis no tratamento da urticária, edema pulmonar e outros tipos de reações anafiláticas. O edema de pata induzido por este composto envolve a degranulação de mastócitos, e conseqüentemente a liberação de histamina e serotonina, as quais contribuem para aumentar a permeabilidade vascular e o extravasamento de fluido (Parrat et al., 1957; Jori et al., 1961; Bastos et al., 2001).

No modelo do edema de pata induzido por dextrana, OECS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg reduziu, significativamente, o peso das patas dos animais. A ciproheptadina, um antagonista dos receptores H_1 e 5HT, reduziu, de maneira significativa, o peso das patas dos animais.

A carragenina e a dextrana induzem aumento da permeabilidade vascular por diferentes caminhos. Enquanto dextrana induz o acúmulo de fluidos devido a degranulação de mastócitos e conseqüentemente a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e serotonina, com poucas proteínas e neutrófilos; a carragenina, por sua vez, o faz com um exsudato contendo grande número de neutrófilos e rico em proteínas (Lo et al., 1982; Bastos et al., 2001).

Portanto, OECS parece inibir processos inflamatórios suprimindo a ação e/ou a liberação de aminas vasoativas (estabilização de mastócitos), mais do que inibe a liberação de outros mediadores inflamatórios como as prostaglandinas.

Em adição a esses resultados, OECS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, foi capaz de reduzir, de maneira significativa, a formação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de *Croton*.

O modelo do edema de orelha em camundongos por agentes irritantes, como o óleo de *Croton* (*Croton tiglium* L.), é utilizado na pesquisa da atividade de DAINES de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais (Schiantarelli et al., 1982). Neste modelo, o edema causado pela aplicação tópica de óleo de *Croton* é devido a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), um dos componentes responsáveis pela ação irritante do óleo de *Croton*, parece ser exercida pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina e prostaglandinas (Schiantarelli et al., 1982; Trongsakul et al, 2003). Isto sugere que OECS, assim como no modelo do edema de pata por dextrana, pode possuir atividade antiinflamatória através da inibição da liberação de mediadores inflamatórios, tais como histamina e serotonina.

No presente estudo, foi avaliada a potência analgésica do OECS em quatro modelos agudos de testes nociceptivos: o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Koster et al, 1959), formalina (Hunskaar & Hole, 1987), placa quente (Eddy & Leimbach, 1953) e nocicepção induzida por capsaicina (Santos et al, 2003).

O comportamento de contorção, em camundongo, pela injeção intraperitoneal de ácido acético na nocicepção química, é utilizado para avaliar, essencialmente, atividade analgésica central e periférica. Ácido acético causa algisia pela liberação de substâncias endógenas e muitas outras

que excitam terminações nervosas de dor (Khanna et al, 2003; Trongsakul et al, 2003). A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético pode envolver a estimulação direta das fibras aferentes nociceptivas devido a redução do pH e a síntese de mediadores inflamatórios (França et al, 2001).

De acordo com a percentagem de inibição do número de contorções obtidas com OECS, nas diferentes doses estudadas, encontrou-se que a intensidade do efeito analgésico foi, estatisticamente, similar à aspirina. A aspirina e outros DAINES podem inibir cicloxigenase em tecidos periféricos reduzindo a síntese e/ou a liberação de mediadores inflamatórios; interferindo, assim, com os mecanismos de transdução dos nociceptores aferentes primários (Trongsakul et al, 2003). O mecanismo de ação analgésico do OECS pode, provavelmente, envolver inibição da síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios que promovem dor nas terminações nervosas, similarmente à aspirina e aos outros DAINES; sugerindo, a princípio, uma ação analgésica periférica. Contudo, o teste de contorções abdominais é inespecífico, já que analgésicos opióides, antidepressivos tricíclicos e drogas antiinflamatórias não-esteroidais podem inibir a resposta nociceptiva no modelo do ácido acético (França et al, 2001; Gonzalez et al, 2001; Dai et al, 2002).

O teste da formalina é um modelo de dor aguda e tônica, sendo considerado um modelo mais válido para dor clínica do que os testes com estímulo mecânico ou térmico (Tjolsen et al., 1992; Santos et al, 2000; Campos et al, 2002; Trongsakul et al, 2003). A resposta nociceptiva induzida pela formalina possui duas fases que podem envolver diferentes mecanismos. A 1ª fase (dor neurogênica) resulta da estimulação química direta das fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas (fibras-C); enquanto

que a 2ª fase (dor inflamatória) resulta da ação de mediadores inflamatórios liberados no tecido periférico e de mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal espinhal que permitem, a longo prazo, a facilitação da transmissão sináptica a nível espinhal (Tjolsen et al, 1992; França et al, 2001; Campos et al, 2002; Dai et al, 2002).

Resultados experimentais têm indicado que substância P e bradicinina participam da 1ª fase, que pode ser suprimida, principalmente, por analgesia de ação central (analgésicos opióides como a morfina); enquanto que na 2ª fase, vários mediadores (histamina, serotonina, bradicinina, aminoácidos excitatórios e prostaglandinas) podem estar envolvidos na dor inflamatória, que é muito sensível a ação da maioria das drogas antiinflamatórias não esteroidais, incluindo ácido acetilsalicílico, indometacina, diclofenaco, naproxeno e paracetamol (Tjolsen et al, 1992; Dai et al, 2002).

Neste modelo, OECS (50 mg/Kg, v.o.) inibiu, significativamente ($p < 0,05$), a resposta de lambertura somente na 1ª fase do teste; enquanto que o OECS (100 e 200 mg/Kg, v.o.) inibiu, significativamente ($p < 0,01$), a resposta de lambertura nas duas fases do teste.

Morfina, um agonista opióide, inibiu significativamente ($p < 0,01$) a nocicepção induzida por formalina nas duas fases do teste. No entanto, o pré-tratamento dos camundongos com naloxona, um antagonista opióide, reverteu o efeito antinociceptivo da morfina, mas demonstrou não influenciar a ação antinociceptiva do OECS (100 mg/Kg, v.o.). Isto pode sugerir o não envolvimento do sistema opióide na modulação da dor por OECS.

O receptor opióide tipo 1 (ORL₁: *opioid receptor like 1*), receptor “órfão”, mostra 60% de homologia com os receptores opióides (μ - , δ - , κ -) e alta expressão em várias áreas do SNC associadas com nocicepção, tais como córtex cerebral, tálamo, substância cinzenta periaquedutal e corno dorsal da medula espinhal. Embora membro da família do receptor opióide, o ORL₁ não se liga a opiáceos com alta afinidade; este é acoplado a proteína-G e sob ativação, inibe a adenilato ciclase e canais de Ca⁺⁺ e abre canais de K⁺. Orfanina (nociceptina) é um peptídeo que é um ligante endógeno para ORL₁. (Julius, 1995; Tian et al, 1997; Calo’G et al, 2000; Luca et al, 2002; Judd et al, 2003; Meunier et al, 2003; Ling et al, 2004).

Estudos têm sugerido o envolvimento de canais de K⁺ ATP dependentes (K_{ATP}) na analgesia supraespinhal induzida por morfina e glibenclamida, um antagonista dos canais de K_{ATP}, que pode bloquear a resposta antinociceptiva da morfina (Ocana et al., 1990). Contudo, estudos eletrofisiológicos utilizando glibenclamida, demonstraram um menor papel funcional dos canais de K_{ATP} na interação com morfina nos neurônios da substância cinzenta periaquedutal (Chiou et al., 2001). Estes canais são distribuídos em tecidos periféricos, incluindo medula espinhal, não se associam a receptores opióides clássicos, mas são ativados por receptores ORL₁ (Julius, 1995; Calo’G et al, 2000).

No presente estudo, investigou-se a participação dos canais de K_{ATP} na atividade antinociceptiva do OECS e morfina no teste da formalina. Os resultados mostraram que glibenclamida foi capaz de reverter a antinocicepção produzida por OECS nas duas fases do teste, mas falhou em modificar o efeito analgésico da morfina; levando a possibilidade de que ligantes de canais de K_{ATP} afetam a analgesia da morfina *in vivo* por um

mecanismo distinto da ativação direta de canais de K_{ATP} (Lohmann et al., 1999); é possível que OECS, neste modelo experimental, esteja agindo via receptor ORL_1 assim como ocorre com os opióides endógenos (orfanina) que ativam este receptor.

Uma interessante característica do efeito do OECS é marcada pela antinocicepção contra a resposta de dor neurogênica causada pela capsaicina em camundongos. A administração aguda de capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida), principal ingrediente pungente das espécies de pimenta, elicia uma vigorosa resposta de lambertura em relação a pata estimulada, causando dor neurogênica pela ativação de receptores vanilóides (VR_1). Estes receptores são canais de cátion não seletivos sensíveis a ligante nos neurônios sensoriais primários. Em estudos *in vitro*, a ativação de neurônios nociceptivos, evocados pela capsaicina, indicaram que esta age nos receptores VR_1 nos neurônios sensoriais induzindo o influxo de cátions, particularmente íons Ca^{++} e Na^+ , através de canal intimamente acoplado ao VR_1 . O influxo de Ca^{++} é essencial para a transmissão da informação nociceptiva evocada pela capsaicina. Esta, especificamente, age nas fibras-C não-mielinizadas e neurônios sensoriais primários $A\delta$ mielinizados delgados. Funcionalmente, tais neurônios são considerados por serem sítios de liberação de mediadores pró-inflamatórios na periferia e por transmitirem informação nociceptiva até o nível da medula espinhal.

O OECS (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) e morfina exerceram, de maneira significativa, efeito inibitório na resposta nociceptiva induzida pela capsaicina. No entanto, o mecanismo fundamental da ação antinociceptiva do OECS parece não ser relacionado ao sistema opióide, já que sua ação antinociceptiva não foi revertida pela naloxona, um antagonista opióide.

Várias publicações demonstraram que a resposta nociceptiva no teste da capsaicina e da formalina (1ª fase), é mediada pela liberação do aminoácido excitatório glutamato e pelo neuropeptídeo substância P liberados pelos neurônios sensoriais da medula espinhal. Estes modelos de nocicepção são resistentes a grande maioria das drogas antiinflamatórias não-esteroidais, enquanto são sensíveis a dipirona, drogas opióides, como morfina, e drogas que antagonizam a substância P ou os receptores de glutamato (Otuki et al, 2001). Em adição, tem sido demonstrado que a injeção intradérmica de capsazepina, um antagonista seletivo dos receptores VR₁, inibe a 1ª fase da resposta de lambadura de pata induzida por formalina assim como a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina, enquanto que capsazepina não afetou a 2ª fase do teste da formalina (Sakurada et al, 2003). Estes dados indicam que estes testes nociceptivos, formalina (1ª fase) e capsaicina, são semelhantes no que diz respeito ao mecanismo de transmissão da informação nociceptiva.

Por isso, procurou-se avaliar o possível envolvimento dos canais K_{ATP} na atividade antinociceptiva de OECS no teste da capsaicina. Os resultados demonstraram que glibenclamida reverteu significativamente a antinocicepção produzida por OECS; em contraste, naloxona, um antagonista dos receptores opióides, falhou em modificar o efeito antinociceptivo de OECS no teste da capsaicina.

Baseado nesses achados, é razoável sugerir que a antinocicepção do OECS, nos testes de formalina e capsaicina, é possivelmente mediado por receptores ORL₁ sensíveis a glibenclamida mas insensíveis a naloxona; dados que merecem estudos futuros, utilizando-se agonistas e antagonistas do receptor ORL1, a fim de se obter maiores esclarecimentos a cerca dos mecanismos da ação antinociceptiva do OECS.

O teste da placa quente é conhecido por ser sensível somente para drogas que agem a nível supraespinhal (França et al, 2001; Campos et al, 2002). Anker (1974), avaliando analgésicos análogos à morfina em camundongos, demonstrou que a placa quente a 55 °C produzia resultados falso negativos e sugeriu o uso de temperaturas mais baixas. Por isso, utilizamos a placa quente com baixa temperatura ($51 \pm 0,5$ °C).

OECS, nas doses estudadas, falhou em demonstrar alguma influência significativa na latência de reação à placa quente, indicando deficiência da eficácia na supressão da nocicepção supra-espinhal. Entretanto, morfina, um analgésico opióide, prolongou o tempo de reação dos animais à placa quente nos tempos de 30 e 60 min.

Alguns dos componentes presentes no OECS, particularmente, guaiazuleno, β -cariofileno e 1,8-cineol, possuem propriedades analgésicas e antiinflamatórias (Menezes et al, 1990, Martin, 1993; Sertié et al, 1995; Tambe et al, 1996; Santos et al, 2000; Lei et al, 2003). Isto possivelmente poderia explicar, em parte, a atividade antiinflamatória e a antinocicepção exercida por OECS nos modelos animais estudados.

Estudos sugerem que a sedação do sistema nervoso central e o efeito músculo-relaxante não-específico podem reduzir a resposta de coordenação motora como, por exemplo, a lambertura de pata no teste da formalina (Rosland, 1990; Santos et al, 2000; França et al, 2001).

O OECS não foi capaz de prolongar, nas doses estudadas, o tempo de sono dos camundongos; a clorpromazina, um conhecido agente sedativo leve, prolongou significativamente o tempo de sono. Além disso, OECS não

alterou, significativamente, a locomoção dos animais no teste do campo aberto; diazepam, um conhecido agente relaxante muscular, reduziu significativamente a locomoção dos animais. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo, induzido por OECS, não resulta de um efeito sedativo do sistema nervoso central e/ou relaxante muscular.

O chá de infusão da casca de *C.sonderianus* é utilizado na medicina popular, via oral, para dor de estômago, vômitos e diarreia (Matos, 1999). Alguns dos componentes químicos do óleo essencial, extraído da casca e do lenho de *C.sonderianus*, estão presentes no óleo essencial extraído das folhas; tais como guaiazuleno, β -elemeno e β -cariofileno (Silveira, 1979). Por isso, avaliamos a atividade do OECS no modelo da úlcera gástrica induzida por etanol (Robert et al, 1979), úlcera gástrica induzida por indometacina (Bhargava, 1973; Szabo e cols, 1985) e trânsito intestinal (Meli et al, 1990).

O OECS não alterou, de maneira significativa, o trânsito intestinal do carvão ativo nas doses estudadas. No entanto, a clonidina, um agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, reduziu significativamente o percurso do carvão ativo (Al-Qarawi et al, 2003).

Drogas antiinflamatórias não-esteroidais, como indometacina, são conhecidas por induzir dano gástrico por múltiplos mecanismos, incluindo ação irritante local, aumento da secreção ácida gástrica, redução do fluxo sanguíneo e redução da biossíntese de prostaglandinas por inibição da via das ciclooxigenases (constitutivas) do metabolismo do ácido araquidônico. Estas prostaglandinas fortalecem fatores defensivos da mucosa gástrica, tais como a estimulação da síntese de muco promovendo a manutenção da mucosa

gástrica; por isso, o modelo de úlcera induzida por indometacina é um teste bastante utilizado para estudo de drogas antiulcerogênicas (Lanza et al., 1995; Taha et al., 1995; Wagner et al., 1995; Gonzalez et al, 2001).

O OECS (50 e 100 mg/Kg, v.o.) promoveu uma significativa inibição do processo de ulceração. OECS (50 mg/Kg, v.o.) reduziu significativamente as ulcerações, induzidas por indometacina, de maneira similar a cimetidina; um antagonista H_2 que inibe secreção ácida gástrica (Matsuda et al, 1999; Tan et al., 2002).

A úlcera induzida por etanol é um dos testes mais comuns aplicados para avaliação de atividade anti-úlcer/citoprotetora. O dano gástrico induzido por etanol pode ser devido a estase do fluxo sanguíneo gástrico, que contribui para o desenvolvimento de aspectos de hemorragia, erosão e necrose da injúria tecidual. Esta ação é direta no epitélio gástrico, podendo causar perturbação de mastócitos e liberação de mediadores vasoativos tais como a histamina; este mediador age na microvasculatura, desencadeando uma série de eventos que conduzem a possibilidade de danos ao tecido submucoso. A injúria oxidativa pode causar inflamação na mucosa gástrica devido a infiltração de leucócitos polimorfonucleares dentro da lesão (Al-Harbi et al, 1997; Matsuda et al, 1999; Park et al, 2000; Gonzalez et al, 2001; Tan et al, 2002; Oliveira et al, 2004).

OECS 100 mg/Kg, similarmente à ciproeptadina, reduziu significativamente as ulcerações induzidas por etanol. A ciproeptadina é um antagonista H_1 e 5HT; OECS pode estar antagonizando os efeitos de mediadores vasoativos reduzindo, assim, os danos à mucosa gástrica neste modelo experimental.

Estudos têm demonstrado, que as lesões induzidas pelo etanol são oriundas de dano direto à células da mucosa gástrica, resultando no desenvolvimento de radicais livres e, conseqüentemente, lipoperoxidação; compostos antioxidantes podem ser ativos, neste modelo experimental, complexando-se com os radicais livres e, assim, produzindo efeitos anti-ulcerogênicos. Etanol, ainda, depleta os níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), contidos nos tecidos estomacais, e a restauração destes parece ser importante na gastroproteção. Os radicais livres citotóxicos parecem ser detoxificados por ligação com glutathiona; o maior componente endógeno do “pool” dos NP-SH (Al-Harbi et al, 1997; Matsuda et al, 1999; Park et al., 2000; Gonzalez et al, 2001; Oliveira et al, 2004).

OECS, nas doses de 50 e 200mg/Kg, reduziu significativamente as ulcerações de maneira similar à N-acetilcisteína, um conhecido agente antioxidante. A observação do efeito antioxidante e citoprotetor pode ser atribuído a presença de guaiazuleno, um conhecido agente antiúlcera (Yano et al, 1990; Yanagisawa et al, 1990), largamente estudado que possui atividade antioxidante; incluindo estudos clínicos onde foi utilizado como terapia secundária da gastrite (Vasario, 1958; Alessio, 1964). Guaiazuleno foi capaz de ligar-se a radicais livres e restaurar os níveis de glutathiona no estresse oxidativo hepático em ratos (Kourounakis & Kourounakis et al, 1997); é possível que OECS esteja agindo como agente antioxidante no modelo de úlcera induzida por etanol. Em adição, estudos *in vitro* com óleos essenciais contendo β -cariofileno, como um dos constituintes majoritários, demonstraram atividade antioxidante maior do que o ácido ascórbico e o α -tocoferol, dois compostos antioxidantes de referência; β -cariofileno é um dos constituintes majoritários do OECS (Tambe et al, 1996; Juteau et al, 2002;

Alma et al, 2003). Estudos demonstraram que o 1,8-cineol preveniu as lesões gástricas induzidas pelo álcool absoluto e indometacina (Santos, 1999); é provável que o 1,8-cineol possa estar contribuindo, também, para a atividade gastroprotetora do OECS.

Têm sido relatado que úlceras, induzidas por etanol, não são inibidas por agentes antissecretórios (cimetidina), mas são inibidas por agentes que aumentam fatores defensivos da mucosa tais como as prostaglandinas (Toma et al, 2002). Estudos sugerem que capsaicina pode ter efeito na gastroproteção por estimular fibras aferentes sensoriais mediando a liberação local de neuropeptídeos sensoriais, NO e prostaglandinas. O efeito da capsaicina, na redução da úlcera induzida por etanol, pode ser associado com o aumento no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e secreção de muco gástrico (Park et al, 2000; Szolcsányi et al, 2001). O muco é importante na prevenção de danos ao epitélio gástrico bem como na facilitação do seu reparo (Al-Harbi et al, 1997).

O OECS, nas doses de 50 e 200mg/Kg, reduziu significativamente as lesões gástricas de maneira similar a capsaicina. Estes resultados sugerem que OECS pode estar agindo estimulando secreção de muco gástrico; já que estudos demonstraram que o guaiazuleno, um dos compostos majoritários de OECS, não age por aumento do fluxo sanguíneo gástrico (Yano et al, 1990).

Os resultados demonstraram que OECS produziu efeito antiulcerogênico nos modelos de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Estes resultados sugerem diferentes mecanismos de ação para a atividade antiulcerogênica observada com OECS.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, no presente estudo, com o Óleo Essencial de *Croton sonderianus* (OECS) nos permitem concluir:

- ◆ A análise fitoquímica parcial do óleo essencial, obtido das folhas de *Croton sonderianus*, revelou a presença de monoterpenos e alta concentração de sesquiterpenos;
- ◆ O OECS (1, 2 e 3 g/Kg, v.o.) não alterou padrões fisiológicos (evacuação e micção), não induziu sedação ou incoordenação motora e não induziu a morte dos animais; demonstrando baixo potencial tóxico;
- ◆ Em modelos de inflamação aguda, OECS 200 mg/Kg exerceu atividade antiinflamatória no teste do edema de pata por dextrana, de maneira similar a ciproheptadina, um antagonista H₁ e 5HT. OECS 100 e 200 mg/Kg reduziu o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de *Croton*. No teste do edema por carragenina, OECS não exerceu atividade nos intervalos de tempo estudados. Estes resultados sugerem que OECS exerce atividade antiinflamatória por inibição da liberação e/ou ação de aminas vasoativas mais do que por inibição da síntese e/ou liberação de prostaglandinas;
- ◆ OECS demonstrou efeito antinociceptivo nos testes de contorções abdominais, formalina (nas duas fases do teste) e capsaicina, evidenciando a sua participação em mecanismos de analgesia periférica e/ou espinal. O OECS não alterou o tempo de latência no teste da placa quente, sugerindo o não envolvimento de analgesia supra-espinal;

- ◆ O efeito antinociceptivo do OECS parece não estar relacionado com sistema opióide, já que a naloxona, um antagonista opióide, não foi capaz de reverter a analgesia, induzida por este, nos testes da formalina e capsaicina;
- ◆ A glibenclamida, um antagonista dos canais de K_{ATP} , reverteu, de maneira significativa, a antinocicepção induzida por OECS nos testes da formalina (nas duas fases) e capsaicina, evidenciando a possível participação de receptores órfãos, como o receptor (ORL1); estes receptores possuem 60% de homologia com receptores opióides, são associados com canais de K^+ dependentes de ATP e são insensíveis a naloxona;
- ◆ O OECS, nas doses estudadas, não alterou o tempo de sono induzido por pentobarbital e não alterou a frequência de locomoção dos animais no teste do campo aberto; sugerindo que a sua atividade antinociceptiva não resulta de um efeito sedativo do SNC e/ou relaxante muscular;
- ◆ O OECS não alterou a motilidade intestinal; demonstrou uma atividade gastroprotetora por diminuir lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina;
- ◆ Os dados obtidos no presente estudo, adicionados aos dados da literatura, sugerem que guaiazuleno, β -cariofileno e 1,8-cineol possam estar contribuindo para os efeitos farmacológicos observados com o OECS.

SUMMARY

Anti-inflammatory, antinociceptive and gastroprotective activities of essential oil from *Croton sonderinus* Muell. Arg. Jeferson Falcão do Amaral. Principal Guide: Prof.^a Dra. Flávia Almeida Santos. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2004. *Croton sonderianus*, locally known as “marmeleiro-preto” is a reputed popular remedy for the treatment of stomach ache, uterine bleeding, and in the control of vomitions and diarrhoea. The present study evaluated the essential oil obtained from leaves of *Croton sonderianus* (EOCS) in murine models of acute inflammation, nociception and against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin, all of the experiments were accomplished in male mice. In models of acute inflammation, EOCS failed to inhibit carrageenan-induced paw edema in a manner similar to indomethacin; however, EOCS (200 mg/Kg, p.o.) was effective against dextran-induced paw edema, similar to cyproheptadine, an H₁ and 5-HT receptor antagonist. Also, EOCS (100 and 200 mg/Kg, p.o.) could effectively suppress the ear edema induced by topical application of *Croton* oil. These results suggest that the anti-inflammatory activity of EOCS may be related mostly to the inhibition of histamine and serotonin than to inhibition of synthesis/liberation of prostaglandins. Similar to acetylsalicylic acid, EOCS demonstrated antinociceptive activity against acetic acid-induced writhing at the oral doses of 50, 100 and 200 mg/Kg. In formalin test, EOCS (100 and 200 mg/Kg, p.o.) similar to morphine (7,5 mg/Kg, i.p.) showed significant ($p < 0,01$) antinociceptive activity at both neurogenic and inflammatory phases. The antinociception induced by EOCS (100 mg/Kg, p.o.) was found to be effectively antagonized by glibenclamide (2 mg/Kg, i.p.), a blocker of K_{ATP}-channels but not by Naloxone (1mg/Kg, s.c.), a μ -opioid receptor antagonist. In addition, EOCS (50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) significantly suppressed the capsaicin-induced nociception, which was also significantly blocked by glibenclamide and not by naloxone. These results suggest the participation of the orphan receptors like 1 (ORL1) in the effect of EOCS. These receptors possess 60% of homology with opioid receptors, they are associated to channels of K_{ATP} and are sensitive to the glibenclamide but insensitive to the naloxone. Besides, EOCS seems to exercise only a peripheral and or spinal level of action since it failed to produce antinociceptive activity in hot-plate test that detects the supraspinal nociception. In the tests of locomotion (open-field) and sedation (pentobarbital-sleep time) EOCS did not show any significant influence indicating that the observed antinociception is unrelated to sedative or CNS depressant effects of EOCS. Against gastric lesions induced by ethanol, EOCS offered gastroprotection at oral doses of 50 and 200 mg/Kg in a manner similar to capsaicin (5 mg/Kg, p.o.), a compound that

stimulates gastric mucus, and N-acetylcysteine, a cellular antioxidant. At 50 mg/Kg, EOCS suppressed the gastric lesions induced by indomethacin (20 mg/Kg, p.o.) in a way similar to cimetidine (100 mg/Kg, p.o.), an antagonist H_2 . EOCS failed to influence the gastrointestinal transit in a significant manner and is free from overt toxicity. Oral administration up to 3 g/Kg did not cause any behavioral alteration or mortality in mice in the model of acute toxicity. In conclusion, EOCS possesses anti-inflammatory, antinociceptive and gastroprotective properties; the data obtained on the present study, associated to the literature ones, have suggested that guaiazulene, β -caryophyllene and 1,8-cineole can contribute to the Pharmacological effects observed for EOCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdon APV; Cardoso JHL; Souza ANC; Morais SM; Santos CF. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 35: 1215-1219, 2002.

Adams RP. Identification of essential oils components by Gas Chromatography / Quadrupole mass spectroscopy; Alleured: Carol Stream. IL, 2001.

Alessio R. Guaiazulene in the therapy of gastritis. Minerva Gastroenterol., v. 10, p. 90-100, 1964.

Al-Harbi MM; Qureshi S; Raza M; Ahmed MM; Afzal M; Shah AH. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of *Commiphora molmol* in rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 55, p. 141-150, 1997.

Alma MH; Mavi A; Yildirim A; Digrak M; Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Biol Pharm Bull., v. 26, p. 1725-9, 2003.

Almeida ABA; Melo PS; Hiruma CAL; Gracioso JS; Carli L; Nunes DS; Haun M; Brito ARS. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. Eur. J. Pharmacol., v. 472: 205-212, 2003.

Al-Qarawi AA; Ali BH; Al-Mougy SA; Mousa HM. Gastrointestinal transit in mice treated with various extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Food and Toxicology*, v. 41, p. 37-39, 2003.

Altschul Siri von Reis. In "Drugs and Foods from Little-known Plants. Notes in Harvard University Herbaria". Harvard University Press; Cambridge, Massachusetts, 1973.

Ankier SJ. New hot plate tests to qualify antinociceptive and narcotic antagonists activities. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 27, p. 1-4, 1974.

Babili FE; Moulis C; Bon M; Respaud MJ; Fourasté I. Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. *Phytochemistry* 48, 165-169, 1998.

Bastos JK; Carvalho JCT; Souza GHB; Pedrazzi AHP; Sarti SJ. Anti-inflammatory activity of cubein, a ligand from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p. 279-282, 2001.

Bhargava KP; Gupta MB; Tangri KK. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *European Journal of Pharmacology*, v. 22, 191 – 195 , 1973.

Boyom FF; Ngouana V; Zollo PHA; Menut C; Bessiere JM; Gut J; Rosenthal PJ. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*, v.64, p.1269-1275, 2003.

Braga R. Plantas do Nordeste, Especialmente de Ceará; Escola Superior de Agricultura de Mossoró Ed., 3^a ed., Fortaleza, 1976.

Calo' G; Guerrini R; Rizzi A; Salvadori S; Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. Br J Pharmacol., v. 129, p. 1261-83, 2000.

Campos AR. Estudos neurofarmacológicos do Guaraná - *Paullinia cupana* H.B.K. Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, 2002.

Campos AR; Albuquerque FAA; Rao VSN; Maciel MAM; Pinto AC. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. Fitoterapia, v. 73, p. 116-120, 2002.

Capaz FR; Vasconcelos LEM; De Moraes S. et al. The Open – Field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. Arch. Int. Pharmacodyn., v. 251, p. 228 – 236, 1981.

Carvalho JCT; Teixeira JRM; Souza PJC; Bastos JK; Filho DS; Sarti SJ. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpineia ferrea* crude extract. Journal of Ethnopharmacology, v. 53, p. 175-178, 1996.

Ceva-Antunes PM; Bizzo HR; Alves SM; Antunes OA. Analysis of volatile compounds of tapereba (*Spondias mombin* L.) and caja (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and solid phase microextraction (SPME). J Agric Food Chem., v.51, p.1387-1392, 2003.

Chavez PI; Dolad SD; Hoffman JJ; Cole JR. J. Nat. Prod. 45, 745, 1982.

Chiou LC; How CH. ATP-sensitive K⁺ channels and cellular actions of morphine in periaqueductal gray slices of neonatal and adult rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 298, p. 493-500, 2001.

Cobos MI; Rodriguez JL; Oliva ML; Demo M; Faillaci SM; Zygadlo JA. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. Planta Med., v. 67, p. 84-6, 2001.

Craveiro AA; Fernandes AG; Andrade CHS. Óleos essenciais de Plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, p. 210, 1981.

Craveiro AA; Silveira ER; Braz RF; Mascarenhas IP. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. Phytochemistry 20, 852-854, 1981.

Craveiro AA; Silveira ER. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. Phytochemistry 21, 2571-2574, 1982.

Craveiro AA; Matos FJA; Alencar JW. Kovat's indices as preselection routine in mass spectra library search of volatiles. J. Nat. Prod., v. 47, p. 890-892, 1984.

Dai Y; Ye WC; Wang ZT; Matsuda H; Kubo M; But PPH. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. in mice. Journal Ethnopharmacology v. 81, p. 245-250, 2002.

Dandiya PC; Collumbine H. Studies on *Acorus calamus*: pharmacological actions of essential oil. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 125, p. 353 – 359, 1959.

Di Stasi LC. Plantas medicinais : arte e ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

Dourado RCM. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Croton sonderianus* – Euphorbiaceae. Tese de Doutorado, Fortaleza, UFC, 2003.

Eddy NB; Leimbach DJ. Synthetic analgesics. Iidithienyl – butenyl and dithienylbutylamines. J. Pharmac. Exp. Ther., v.107, p.385-93, 1953.

Edrada RA; Wray V; Witte L; van Ofwegen L; Proksch P. Bioactive terpenes from the soft coral *Heteroxenia* sp. from Mindoro, Philippines. Z Naturforsch, v. 55, p.82-6, 2000.

Elvin-Lewis. Should we be concerned about herbal remedies. Journal of Ethnopharmacology 75, 141-164, 2001.

Evans CW. Pharmacognosy. 14th.ed. WB Saunders Company Limited, UK, 1996.

Farnsworth NR.; Morris RW. Higher plants the sleeping giant of drug development. Am. J. Pharm. Sci., v. 148, n.2, p.46-52, 1969.

Flach A; Gregel B; Simionatto E; da Silva UF; Zanatta N; Morel AF; Linares CE; Alves SH. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta Med.*, v. 68, p. 836-838, 2002.

Formáček V; Kubeczka KH. Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. John Willey & Sons, New York, 1985.

França DS; Souza ALS; Almeida KR; Dolabella SS; Martinelli C; Coelho MM. *European Journal of Pharmacology*, v. 421, p. 157-164, 2001.

Fu NW. Antitumor effect and pharmacological actions of beta-elemene isolated from the rhizome of *Curcuma aromatica*. *Zhong Yao Tong Bao.*, v. 9, p. 83-7, 1984.

Gonzalez AG; Fraga BM; Hernandez MG; Hanson JR. The ^{13}C NMR spectra of some *ent*-18-hydroxykaur-16-enes. *Phytochemistry* 20, 846-847, 1981.

Gonzalez FG; Portela TY; Stipp EJ; Di Stasi LC. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal Ethnopharmacology*, v. 77, p. 41-47, 2001.

Guerrero MF; Carron R; Martin ML; Roman LS; Reguero MT. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 75:33-6, 2001.

Guerrero MF; Puebla P; Carron R; Martin ML; Roman LS. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. J. Pharm. Pharmacol., v. 54:1373-8, 2002.

Gurgel LA; Silva RM; Santos FA; Martins DT; Mattos PO; Rao VS. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. Phytother. Res., v. 15:319-22, 2001.

Hajare SW; Chandra S; Sharma J; Tandan SK; Lal J; Telang AG. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. Fitoterapia, v. 72, p. 131-139, 2001.

Henriques MGMO; Silva PMR; Martins MA; Flores CA; Cunha FQ; Filho JA; Cordeiro RSB. Mouse paw edema. A new model for inflammation? Brazilian J. Med. Biological Research, v. 20, p. 243-249, 1987.

Hunskar S; Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. Pain, v.30, p.103-104, 1987.

Jori A; Bentivoglio AP; Carattini S. The mechanism by compound 48/80 and dextran in rats. J. Pharm. Pharmacol., v. 13, p. 617-619, 1961.

Judd AK; Kaushanskaya A; Tuttle DJ; Sanchez A; Khroyan T; Polgar W; Toll L. N-terminal modifications leading to peptide ORL1 partial agonists and antagonists. J Pept Res., v. 62, p. 191-8, 2003.

Juergens UR; Dethlefsen U; Steinkamp G; Gillissen A; Reppes R; Vetter H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med.*, v. 97, p. 250-6, 2003.

Juliani HR Jr; Biurrun F; Koroch AR; Oliva MM; Demo MS; Trippi VS; Zygadlo JA. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. *Planta Med.*, v. 68, p. 762-764, 2002.

Julius D. Pharmacology: Home for an orphan endorphin. *Nature*, v. 377, p. 476, 1995.

Juteau F; Masotti V; Bessière JM; Dherbomez M; Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, v. 73, p. 532-535, 2002.

Khanna N; Bhatia J. Antinociceptive action of *Ocimum sanctum* (Tulsi) in mice: possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology*, v.88, p.293-296, 2003.

Kim KJ; Kim YH; Yu HH; Jeong SI; Cha JD; Kil BS; You YO. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Med.*, v. 69, p. 274-277, 2003.

Kobaisy M, Tellez MR, Dayan FE, Duke SO. Phytotoxicity and volatile constituents from leaves of *Callicarpa japonica* Thunb. *Phytochemistry*, v. 61, p. 37-40, 2002.

Koster R; Anderson M; De Beer J. Acetic acid for analgesic screening. Fed Proc., v.18, p.412-417, 1959.

Koukos PK; Papadopoulou KI; Patiaka DT; Papagiannopoulos AD. Chemical composition of essential oils from needles and twigs of balkan pine (*Pinus peuce grisebach*) grown in Northern Greece. J Agric Food Chem., v. 48, p. 1266-1268, 2000.

Kourounakis AP; Rekka EA; Kourounakis PN. Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats. J Pharm Pharmacol., v. 49, p. 938-42, 1997a.

Kourounakis AP; Rekka EA; Kourounakis PN. Effect of guaiazulene on some cytochrome P450 activities. Implication in the metabolic activation and hepatotoxicity of paracetamol. Arch Pharm (Weinheim), v.330, p.7-11, 1997b.

Lanza LL; Walker AM; Bortnichak EA; Dreyer NA. Peptic ulcer and gastrointestinal hemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years. Arch. Intern. Med., v. 155, p. 1371-1377, 1995.

Lei W; Jian Y; Peter PF; Karishma AP; Hongtao Y. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. Mutation Research, v. 530, p. 19-26, 2003.

Ling J; Nurulain Z; Lawrence T. The design and synthesis of a novel quinolizidine template for potent opioid and opioid receptor like (ORL1, NOP) receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 181-185, 2004.

Lo TN; Almeida AP; Beaven MA. Dextran and carragenine evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect on indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 221, p. 261-267, 1982

Lohmann AB; Welch SP. ATP – gated K^+ channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 385, p. 119-127, 1999.

Luca B; Laura C; Ennio O; Rosalia B. Up-regulation of ORL1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury. *European Journal of Pharmacology*, v. 447, p. 59-65, 2002.

Maday E; Szoke E; Muskath Z; Lemberkovics E. A study of the production of essential oils in chamomile hairy root cultures. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, v. 24, p. 303-8, 1999.

Martin S; Padilla E; Ocete MA. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.*, v. 59, p.533-536, 1993.

Matos FJA. Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, 1989.

Matos FJA. Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. Fortaleza: EUFC, 1998.

Matos FJA. O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego da medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. EUFC, 2ed., 1997.

Matos FJA. Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: EUFC, 1999.

Matos JMD; Matos MEO. Farmacognosia: curso teórico-prático. Fortaleza: EUFC, 1989.

Matsuda H; Li Y; Yoshikawa M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosa lesions in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 373, p. 63-70, 1999.

McChesney JD; Clark AM; Silveira ER. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. *Pharm. Res.*, v. 8:1243-7, 1991.

Medeiros JR; Campos LB; Mendonça SC; Davin LB; Lewis NG. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, v.64, p.561-565, 2003.

Meli R; Autore G; Di Carlo G; Capasso F. Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice. *Phytotherapy Research*, v. 4, p.201-202, 1990.

Mendes NM; Araujo N; De Souza CP. Molluscicide and cercariacide activity of different species of *Eucalyptus*. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. v. 23, p.197-199, 1990.

Menezes AM; Almeida FRC; Rao VSN. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. Fitoterapia, v. 61, p. 252-254, 1990.

Meunier JC. Utilizing functional genomics to identify new pain treatments : the example of nociceptin. Am J Pharmacogenomics., v. 3, p. 117-30, 2003.

Miller RC; Tainter ML. Estimation of DE50 and error by mean logarithmic probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 57, p. 261-264, 1944.

Moraes LCSL; Lemos RGV; Almeida RN. Estudo químico e farmacológico de alcalóides e óleos essenciais de *Ocotea duckay* vattimo. Resumos... Serra Negra: FESBE, 1995.

Nardi GM; Felippi R; DalBo S; Siqueira-Junior JM; Arruda DC; Delle Monache F; Timbola AK; Pizzolatti MG; Ckless K; Ribeiro-do-valle RM. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. Phytomedicine, v. 10 :176-184, 2003.

Ocana N; Del Pozo E; Barrios M; Robles LI; Baeyens JM. Na ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. Eur. J. Pharmacol., v. 189, p. 377-378, 1990.

Oliveira AC; Cardoso JHL; Santos CF; Morais SM; Souza ANC. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 34:1471-4, 2001.

Oliveira FA; Júnior GMV; Chaves MH; Almeida FRC; Florêncio MG, Júnior RCPL; Silva RM; Santos FA; Rao VSN. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. Pharmacological Research, v. 49, p. 105-111, 2004.

Otuki MF; Lima FV; Malheiros A; Filho VC; Monache FD; Yunes RA; Calixto JB. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. Life Sciences, v. 69, p. 2225-2236, 2001.

Pacciaroni AV; Mongelli E; Ariza Espinar L; Romano A; Ciccia G; Silva GL. Bioactive constituents of *Conyza albida*. Planta Med. v. 66, p. 720-3, 2000.

Park JS; Choi MA; Kim BS; Han IS; Kurata T; Yu R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. Life Sciences, v. 67, p. 3087-3093, 2000.

Parrat JR; West GB. Inhibition by various substances of edema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg white and compound 48/80. Br. J. Pharmac. Chemother., v. 13, p. 65-70, 1957.

Pax F; Hoffman H. Die Natürlichen pflanzenfamilien. 2^a.ed. In: Engler, A; Prantl, K. (Ed.). Leipzig: Engelmann, p.208, 1931.

Perrucci S; Cioni PL; Flamini G. Ascariocidal agents of natural origin against *Psoroptes cuniculi*. Parasitology. v.36, p. 269-271, 1994.

Petrovick PR. New rules for phythopharmaceutical drug registration in Brazil. Journal of Ethnopharmacology 66, pp.51-55, 1999.

Porter NG; Wilkins AL. Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* e *Kunzea ericoides*. Phytochemistry, v. 50, p. 407-415, 1998).

Pratsinis H; Haroutounian SA. Synthesis and antioxidant activity of 3-substituted guaiazulene derivatives. Nat Prod Lett, v. 16, p. 201-5, 2002.

Rekka EA; Kourounakis AP; Kourounakis PN. Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes. Res Commun Mol Pathol Pharmacol., v. 92, p. 361-364, 1996.

Robert A; Nèzamis JE; Lancaster C; Hauchar AJ. – Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. Gastroenterology, 77: 433-443, 1979.

Roengsumram S; Sommit AD; Petsom A; Vilaivan T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Phytochemistry 50, 449-453, 1999.

Rosland JH; Tjolsen A; Maehle B. The formalin test in mice – effect of formalin concentration. Pain, v. 42, p. 235-242, 1990.

Rossi D; Bruni R; Bianchi N; Chiarabelli C; Gambari R; Medici A; Lista A; Paganetto G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri*. *Phytomedicine*, v.10:139-44, 2003.

Sakemi S; Higa T. 2,3-Dihydrolinderazulene, a new bioactive azulene pigment from the gorgonian *Acalycigorgia sp.* *Experientia*, v. 43, p.624-5, 1987.

Sakurada T; Matsumura T; Moriyama T; Sakurada C; Ueno S; Sakurada S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 75, p.115-121, 2003.

Santos ARS; Trentin AP; Ferreira J; Yunes RA; Calixto JB. Mechanisms involved in the antinociception caused by compound MV8612 isolated from *Mandevilla velutina* in mice. *Brain Research*, v. 961, p.269-276, 2003.

Santos FA; Rao VSN; Silveira ER. Studies on the neuropharmacological effects of *Psidium guyanensis* and *Psidium pohlianum* essential oils. *Phytotherapy Research*, v.10, p.655-658, 1996.

Santos FA. Atividade antibacteriana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* PERS. e *Psidium pohlianum* BERG. Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, 1997.

Santos FA. Estudo farmacológico de 1,8-cineol, um óxido terpênico presente em óleos essenciais de plantas. Tese de doutorado, UFC, fortaleza, 1999.

Santos FA; Rao VSN. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, v.14, p.240-244, 2000.

Santos FA; Rao VSN. Possible role of mast cells in cineole-induced scratching behavior in mice. *Food and chemical toxicology*, v. 40, p. 1453-1457, 2002.

Schiantarelli P; Cadel S; Acerbi D. And Pavesi L. Anti-inflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32: 230 – 235, 1982.

Sertié JAA; Resende BB; Sudo LS. Atividade analgésica e antiinflamatória do óleo de copaíba. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Resumos... Serra Negra: FESBE, 1995.

Silva RM. Estudos dos efeitos da trans-desidrocrotonina, um diterpeno 19-nor-clerodano do *Croton cajucara* Benth. em hiperlipidemia e hipertrigliceremia experimental. Dissertação de Mestrado, UFC, Fortaleza, 2000.

Silva RM; Santos FA; Rao VS; Maciel MA; Pinto AC. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 3: 452-6, 2001.

Silveira ER. Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste – *Croton sonderianus* Muell. Arg. Dissertação de Mestrado, Fortaleza, 1979.

Simões CMO; Schenkel EP; Gosmann G; Mello JCP; Mentz LA; Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: EUFSC, 1999.

Skaltsa HD; Lazari DM; Chinou IB; Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece. *Planta Med.*, v. 65, p. 255-256, 1999.

Socorro SRMS; Mendonca-Filho RR; Bizzo HR; Almeida RI; Soares RM; Souto-Padron T; Alviano CS; Lopes AH. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47: 1895-901, 2003.

Sommit D; Petsom A; Ishikawa T; Roengsumran S. Cytotoxic activity of natural labdanes and their semi-synthetic modified derivatives from *Croton oblongifolius*. *Planta Med.*, v. 69:167-70, 2003.

Souza MF; Rao VSN; Matos FJA. Estudo sobre os efeitos analgésico e anticonvulsivante do óleo essencial de *Egletes viscosa* Less (macela). Resumos... Serra Negra: FESBE, 1995.

Srinivasan K; Muruganandan S; Lal J; Chandra S; Tandan SK; Prakash VR. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats, v. 78, p. 151-157, 2001.

Suarez AI; Compagnone RS; Salazar-Bookaman MM; Tillett S; Delle Monache F; Di Giulio C; Bruges G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *J. Ethnopharmacol*, v. 88:11-14, 2003.

Szabo S; Teier JS; Brown A; Schnoor J; Homan HD; Bradford JC. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. *Journal of Pharmacological Methods* 13, 59 – 66, 1985.

Szolcsányi J; Barthó L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotective: an update. *Journal of Physiology*, v. 95, p. 181-188, 2001.

Taha AS; Dahill S; Nakashabendi I; Lee FD; Sturrock RD; Russel RI. Duodenal histology, ulceration, and *Helicobacter pylori* in the presence or absence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gut*, v. 34, p. 1162-1166, 1995.

Tambe Y; Tsujiuchi H; Honda G; Ikeshiro Y; Tanaka S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. *Planta Med.*, v. 62, p. 469-70, 1996.

Tan PV; Nyasse B; Dimo T; Mezui C. Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 69-74, 2002.

Thongtan J; Kittakoop P; Ruangrunsi N; Saenboonrueng J; Thebtaranonth Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. *J. Nat. Prod.*, v. 66:868-70, 2003.

Tian JH; Xu W; Fang Y; Han JS. Antagonistic effect of orphanin FQ on morphine analgesia in rat brain *Sheng Li Xue Bao.*, v. 49, p. 333-8, 1997.

Tjolsen A; Berge OG; Hunskaar S; Rosland JH; Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain, Review article*, 1992.

Toma W; Gracioso JS; Andrade FDP; Lima CAH; Vilegas W; Brito ARMS. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the Bark Wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biological Pharmacology Bull.*, v. 25, p. 1151-1155, 2002.

Trongsakul S; Panthong A; Kanjanapothi D; Taesotikul T. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, p. 221-225, 2003.

Tsoukatou M; Tsitsimpikou C; Vagias C; Roussis V. Chemical intra-Mediterranean variation and insecticidal activity of *Crithmum maritimum*. *Z Naturforsch [C]*, v. 56, p. 211-215, 2001.

Tzakou O; Skaltsa H. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Satureja parnassica subsp parnassica*. *Planta Med.*, v. 69, p. 282-4, 2003.

Valentin A; Pelissier Y; Benoit F. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry*. v. 40, p. 1439-1442, 1995.

Vasario U. Clinical results of 1, 4-dimethyl-7-isopropyl-azulene (guaiazulene) therapy of secondary gastritis. *Minerva Gastroenterology*, v. 4, p. 98-100, 1958.

Velasco-Negueruela A; Perez-Alonso MJ; Perez de Paz PL; Paul-Pala J; Sanz J. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the aerial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary Islands, Spain. *J Chromatogr A.*, v.1011, p. 241-244, 2003.

Vigor C; Fabre N; Fouraste I; Moulis C. Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. *Phytochemistry* 57,1209-1212, 2001.

Vila R; Valenzuela L; Bello H; Canigueral S; Montes M; Adzet T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Med.*, v. 65, p.178-179, 1999.

Wagner H; Blatt S; Zgainski EM. *Plant Drug Analysis*. Institute of Biological Pharmaceutical of University of Munchen by Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1984.

Wagner KA; Nandi J; King RL; Levine RA. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on ulcerogenesis and gastric secretion in pylorus-ligated rat. *Dig. Dis. Sci.*, v. 40, p. 134-140, 1995.

Wang K; Su CY. Pharmacokinetics and disposition of beta-elemene in rats. *Pharmacokinetics and disposition of beta-elemene in rats. Yao Xue Xue Bao.*, v. 35, p. 725-8, 2000.

Webster GL. The genera of the Euphorbiaceae in the South-Eastern United States. *J. Arnold. Arbor*, v.48, p.303, 1967.

Wilson SR; Neubert LA; Huffman JC. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from *Croton californicus*. J. Am. Chem. Soc. v.98, n.12, p. 3669-3374, 1976.

Winter CA; Risley EA; Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 3, p.544-547, 1962.

Wu W; Liu K; Tang X. Preliminary study on the antitumor immuno-protective mechanism of beta-elemene. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi., v. 21, p. 405-8, 1999.

Yanagisawa T; Kosakai K; Tomiyama T; Yasunami M; Takase K. Studies on anti-ulcer agents. II. Synthesis and anti-ulcer activities of 6-isopropylazulene-1-sodium sulfonate derivatives. Chem Pharm Bull., v. 38, p. 3355-8, 1990.

Yang D; Wang F; Peng J; Ren S. [GC-MS analysis and inhibitory activity of the essential oil extracted from the leaves of *Lindera communis*] Zhong Yao Cai., v. 22, p. 128-31, 1999.

Yang H; Wang X; Yu L. The antitumor activity of elemene is associated with apoptosis. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi., v. 18, p. 169-72, 1996.

Yano S; Horie S; Wakabayashi S; Mochizuki S; Tomiyama A; Watanabe K. Increasing effect of sodium 3-ethyl-7-isopropyl-1-azulenesulfonate 1/3 hydrate (KT1-32), a novel antiulcer agent, on gastric mucosal blood flow in anesthetized. Res Commun Chem Pathol Pharmacol., v. 70, p.253-6, 1990.

Yuan J; Gu ZL; Chou WH; Kwok CY. Elemene induces apoptosis and regulates expression of bcl-2 protein in human leukemia K562 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.*, v. 20, p. 103-6, 1999.

Zhou HY; Shen JK; Hou JS; Qiu YM. Experimental study on apoptosis induced by elemene in glioma cells. *Ai Zheng.*, v. 22, p. 959-63, 2003.

Zou L; Liu W; Yu L. beta-elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*, v. 23, p. 196-8, 2001.