

**ASPECTOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PILOCARPUS
SPICATUS St. Hill.**

José Clielder Rebouças da Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FORTALEZA - 1993

BIBLIOTECA CENTRAL
513261
02 1 10 196

0298109
0513261

BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. 1113
30 1 09 194

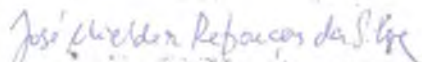
SILVA, José Clielder Rebouças

Aspectos pró-inflamatórios do óleo
essencial de *Pilocarpus spicatus* St.Hill.
Fortaleza: UFC/Departamento de Fisiologia
e Farmacologia, 1993. 79p. (Dissertação
de Mestrado)

CDD - 615.1

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

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que obedeça às normas da ética científica.


José Clielder Rebouças da Silva

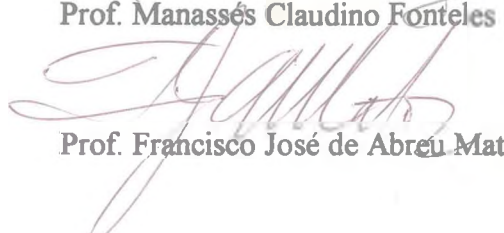
DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

21/12/93


Prof. Vietla Satyanarayana Rao

Orientador da Dissertação


Prof. Manassés Claudino Fonteles


Prof. Francisco José de Abreu Matos

A meus queridos pais:

João e Almerinda

"Onde há do conceito maior lacuna,
Surge uma palavra em hora oportuna
Palavras solvem qualquer problema
Palavras constroem qualquer sistema"

AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimentos ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao pela amizade e alto grau de competência demonstrados na orientação do presente trabalho.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes pela receptividade e prontidão nas análises histopatológicas.

Ao prof. Ronaldo Albuquerque Ribeiro pela inestimável colaboração nos estudos de migração celular.

Aos profs. Francisco José de Abreu Matos e Manoel de Andrade Neto pelo fornecimento do material da planta em estudo.

Aos colegas Marcos Fábio G. Rocha, Geanne Matos de Andrade Cunha, Maria de Fátima de Souza e Márcia Calheiros Chaves pelo ambiente de agradável convivência.

À bibliotecária Norma Carvalho Linhares e aos funcionários da biblioteca do Centro de Ciências da Saúde, Raimundo Cézar Campos do Nascimento e Ewelter de Siqueira e Rocha pela ajuda na revisão bibliográfica.

A Bento Francisco de Oliveira e Nísia Rodrigues de Souza pela cooperação técnica.

A Adelino Martins da Cunha Jr. pelo trabalho datilográfico.

Aos secretários de pós graduação Fabiana Maria da Silva e Wasco Pinheiro Diógenes.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

A CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Generalidades.....	1
1.2 - Os óleos essenciais e as plantas terrestres.....	2
1.2.1 - Óleos essenciais em algas.....	3
1.2.2 - Óleos essenciais em fungos.....	3
1.2.3 - Óleos essenciais em briófitas.....	5
1.2.4 - Óleos essenciais em pteridófitas.....	5
1.2.5 - Óleos essenciais em gimnospermas.....	5
1.2.6 - Óleos essenciais em angiospermas.....	6
1.3 - Farmacologia e Óleos essenciais.....	6
1.4 - Inflamação aguda e Farmacologia experimental.....	11
1.5 - A Planta.....	14
1.5.1 - Descrição botânica e distribuição geográfica.....	14
1.5.2 - Estudos Químicos.....	15
1.5.3 - Objetivos.....	15
2 - MATERIAL.....	17
2.1 - A Planta.....	17
2.2 - Animais experimentais.....	17
2.3 - Soluções fisiológicas.....	18
2.4 - Reagentes e corantes.....	18

2.5 - Drogas.....	19
3 - MÉTODOS.....	20
3.1 - Ensaios farmacológicos.....	20
3.1.1 - Edema de pata induzido pelo <u>óleo essencial de <i>Pilocarpus spicatus</i></u> (OEPS) e carragenina em ratos.....	20
3.1.2 - Pleurisia experimental induzida pelo OEPS e carragenina em ratos.....	21
3.1.3 - Lesão granulomatosa induzida por " pellets " de algodão impregnados com OEPS e carragenina em ratos.....	22
3.1.4 - Efeito do OEPS e carragenina na permeabilidade capilar na cavidade peritoneal em camundongos.....	22
3.1.5. - Participação de mediadores do processo inflamatório no modelo de edema induzido pelo OEPS em ratos.....	24
3.1.5.1 - Efeito de antagonistas da histamina e da serotonina sobre a atividade ede- matogênica do OEPS em ratos.....	24
3.1.5.2 - Efeito de inibidores da ciclooxigenase e lipooxigenase no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.....	25
3.1.5.3 - Efeito da dexametasona no edema subplantar em ratos produzidos pelo OEPS.....	25
3.1.5.4 - Efeito da degranulação de mastócitos no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.....	26
3.2 - Estudos histopatológicos.....	26
3.3 - Análise Estatística.....	27
4 - RESULTADOS.....	28
4.1 - Edema de pata induzido pelo OEPS e carragenina em ratos.....	28
4.2 - Pleurisia experimental induzida pelo OEPS e carragenina em ratos.....	31
4.3 - Lesão granulomatosa induzida por " pellets " de algodão impregnados com OEPS e carragenina em ratos.....	36

4.4 - Efeito do OEPS e carragenina na permeabilidade capilar na cavidade peritoneal em camundongos.....	36
4.5 - Participação de mediadores do processo inflamatório no modelo de edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.....	41
4.5.1 - Efeitos de drogas antagonistas da histamina e serotonina sobre a atividade edematogênica do OEPS em ratos.....	41
4.5.2 - Efeito de inibidores da ciclooxygenase e lipooxygenase no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.....	41
4.5.3 - Efeito da dexametasona no edema subplantar em ratos produzido pelo OEPS.....	44
4.5.4 - Efeito da degranulação de mastócitos no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.....	44
4.6 - Estudo histopatológico.....	49
5 - DISCUSSÃO.....	53
6 - CONCLUSÕES.....	62
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Algumas famílias de dicotiledôneas produtoras de óleos essenciais.	8
2	Comparação entre o efeito edematogênico induzido pelo óleo essencial de <i>Pilocarpus spicatus</i> (OEPS) e carragenina na região subplantar do rato.	30
3	Formação de edema pleural induzida pelo OEPS e carragenina na cavi-de torácica em ratos.	32
4	Acumulação de leucócitos após injeção intratorácica de OEPS e carragenina em ratos.	34
5	Comparação entre o OEPS no desenvolvimento de tecido granulomatoso em ratos.	37
6	Exsudação peritoneal em camundongos tratados com OEPS e carragenina.	39
7	Inibição do edema subplantar promovido pelo OEPS em ratos por antagonistas da histamina e serotonina.	43
8	Inibição da resposta edematogênica subplantar induzida pelo OEPS por inibidores da ciclooxigenase, lipooxigenase e dexametasona.	45
9	Inibição do edema subplantar promovido pelo OEPS em ratos pelo composto 48/80.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Algumas classes de constituintes de óleos essenciais.	4
2	Estrutura química de metilcetonas alifáticas presentes no óleo essencial de <i>Pilocarpus spicatus</i> (OEPS)	16
3	Pletismógrafo	23
4	Edema de pata induzido pelo OEPS e carragenina em ratos	29
5	Exsudação pleural induzida por injeção intratorácica de OEPS e carragenina em ratos	33
6	Cinética da migração celular induzida pelo OEPS e carragenina na cavidade pleural de ratos.	35
7	Granuloma induzido por "pellets"de algodão impregnados com OEPS e carragenina em ratos.	38
8	Aumento da permeabilidade capilar peritoneal em camundongos promovido pelo OEPS e carragenina.	40
9	Efeito inibitório de antagonistas histaminérgicos e serotoninérgicos no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos	42
10	Efeito de inibidores da ciclooxigenase , lipooxigenase e dexametasona no edema subplantar promovido pelo OEPS em ratos.	46
11	Efeito do pré-tratamento com o composto 48/80 no edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.	47
12	Alterações microscópicas promovidas pela injeção subcutânea de OEPS na pata do rato no período de 1 hora.	50

13	Alterações microscópicas promovidas pela injeção subcutânea de OEPS na pata do rato no período de 5 horas.	51
14	Alterações microscópicas promovidas pela injeção subcutânea de OEPS na pata do rato no período de 24 horas.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Céls.	Células
Cg	Carragenina
cm	Centímetro
EPM	Erro Padrão da Média
g	Gramma (s)
h	Hora (s)
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilograma
M	Molar
m	Metro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm³	Milímetros Cúbicos
Monon.	Mononucleares
Neut.	Neutrófilos
nm.	Nanômetro
OEPS	Óleo Essencial de <i>Pilocarpus spicatus</i> St. Hill
p.o.	Oral
UI	Unidade(s) Internacional(is)
v/v	volume por volume
μ	Micro
μg	Micrograma(s)
μl	Microlitro(s)

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as propriedades pró-inflamatórias do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos e camundongos. O OEPS promoveu edema de pata nas doses de 2,5 e 5mg/pata de maneira dose-dependente, sendo observado aumento representativo no volume da pata 1 hora após a injeção subplantar, com pico de reação no intervalo de 3 horas, permanecendo ainda em torno de 50% no período de 24 horas. O potencial edematogênico do OEPS é comparável aquele de carragenina, um polissacarídeo obtido de algumas espécies de algas. Contudo, no período de 24 horas a partir da injeção intraplantar o efeito edematogênico promovido pela carragenina é praticamente ausente quando comparado aquele do OEPS. Além disso, estudos histológicos da pata revelaram o desenvolvimento de uma lesão progressiva com intensa infiltração neutrofílica após injeção subplantar (5mg) de OEPS nos períodos de 1, 5 e 24 horas. A administração intratorácica do OEPS (10mg/animal) induziu pleurisia caracterizada por intensa formação de exsudato e migração leucocitária de maneira similar a carragenina no período de 5 horas. Tanto o OEPS quanto a carragenina aumentaram significativamente ($p<0,01$) a formação do tecido granulamatoso promovido pela implantação de "pellets" de algodão no tecido subcutâneo de ratos. Foi também verificado um aumento significativo do extravasamento de azul de Evans para a cavidade peritoneal de camundongos após injeção de OEPS (5 e 10mg/animal), cujos valores percentuais foram 64 e 84%, respectivamente, quando comparados a carragenina.

Foi analisado o efeito de vários antagonistas específicos sobre a reação edematogênica subplantar induzida pelo OEPS, com o objetivo de identificar os possíveis mediadores envolvidos no processo. Dentre as drogas testadas, a dexametasona (0,5mg/kg, i.p.) foi a mais eficaz, inibindo o edema de pata durante todo o período estudado. A

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as propriedades pró-inflamatórias do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos e camundongos. O OEPS promoveu edema de pata nas doses de 2,5 e 5mg/pata de maneira dose-dependente, sendo observado aumento representativo no volume da pata 1 hora após a injeção subplantar, com pico de reação no intervalo de 3 horas, permanecendo ainda em torno de 50% no período de 24 horas. O potencial edematogênico do OEPS é comparável aquele de carragenina, um polissacarídeo obtido de algumas espécies de algas. Contudo, no período de 24 horas a partir da injeção intraplantar o efeito edematogênico promovido pela carragenina é praticamente ausente quando comparado aquele do OEPS. Além disso, estudos histológicos da pata revelaram o desenvolvimento de uma lesão progressiva com intensa infiltração neutrofílica após injeção subplantar (5mg) de OEPS nos períodos de 1, 5 e 24 horas. A administração intratorácica do OEPS (10mg/animal) induziu pleurisia caracterizada por intensa formação de exsudato e migração leucocitária de maneira similar a carragenina no período de 5 horas. Tanto o OEPS quanto a carragenina aumentaram significativamente ($p < 0,01$) a formação do tecido granulamatoso promovido pela implantação de "pellets" de algodão no tecido subcutâneo de ratos. Foi também verificado um aumento significativo do extravasamento de azul de Evans para a cavidade peritoneal de camundongos após injeção de OEPS (5 e 10mg/animal), cujos valores percentuais foram 64 e 84%, respectivamente, quando comparados a carragenina.

Foi analisado o efeito de vários antagonistas específicos sobre a reação edematogênica subplantar induzida pelo OEPS, com o objetivo de identificar os possíveis mediadores envolvidos no processo. Dentre as drogas testadas, a dexametasona (0,5mg/kg, i.p.) foi a mais eficaz, inibindo o edema de pata durante todo o período estudado. A

clorfeniramina (10mg/kg.i.p.) um antagonista H_1 , praticamente não produziu efeito, enquanto a metisergida (1mg/kg, p.o), uma droga antiserotonérgica, promoveu inibição significativa na primeira fase da reação (1 e 2h). Os bloqueadores da ciclooxigenase e lipooxigenase, fenilbutazona (100mg/kg, p.o.) e EP 10161 (20mg/kg,i.p.) respectivamente, demonstraram inibição significativa durante o pico de reação edematogênica (3h). O composto 48/80, um degranulador de mastócitos, inibiu significativamente o edema de pata no período de 1 e 5 horas. A análise destas observações sugere que o OEPS possui a atividade pró-inflamatória mediada pela serotonina e eicosanóides.

ABSTRACT

The essential oil of *Pilocarpus spicatus* (EOPS) was evaluated for its pro-inflammatory activity in rats and mice. In doses ranging from 2,5 to 5mg/site EOPS induced a dose-dependent paw edema. The effect was apparent after 1hr, peaked at 3hr and after 24hr it still persisted at 50% level. The edematogenic potential of EOPS is almost comparable to that of carrageenan, a polysaccharide obtained from algae. However, at 24hr following intraplantar injection the carrageenan response was almost disappeared when compared to EOPS. Also histological studies revealed a progressive lesion with increased neutrophil infiltration in the rat hind paw after intraplantar injection of EOPS (1, 5 and 24hr). The intrathoracic administration of EOPS (10mg/site) induced pleurisy characterised by exudate formation and leukocyte migration in a manner similar to carrageenan with potent effect at 5hr. Granuloma induced by subcutaneous implants of cotton pellets was enhanced by EOPS as well as carrageenan ($p<0,01$). Also EOPS (5 and 10mg/site) have caused an increase in capillary permeability upon intraperitoneal injection as evidenced by extravasation of Evans blue dye. The increases were 64 and 84%, respectively, as compared to carrageenan.

In order to identify the possible inflammatory mediators of EOPS-induced paw edema, the effect of various drugs was analysed. Among the drugs tested, dexamethasone (0,5mg/kg,i.p.) was the most effective and was able to inhibit paw edema at all time periods studied. The H_1 antagonist chlorpheniramine (10mg/kg,i.p.) was ineffective, while the antiserotonergic methysergide (1mg/kg.p.o.) was found to be effective in the first phase reaction (1 and 2hr). Cyclooxygenase inhibitor phenylbutazone (100mg/kg, p.o.) and the lipoxygenase inhibitor EP 10161(20mg/kg,i.p.) were effective in preventing peak edema response (3hr). The mast cell degranulator 48/80 significantly inhibited the 1hr edema

reaction as well as at the 5hr. These observations suggest that EOPS has pro-inflammatory activity which is mediated by serotonin and eicosanoids.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

Segundo publicação da Organização Mundial de Saúde cerca de 80% da população mundial utiliza recursos oriundos de indicação popular para assistência médica primária, fato comprovado mesmo em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América onde somente no ano de 1980 foram consumidos oito bilhões de dólares em atendimentos médicos cujo receituário continha compostos obtidos a partir de espécies vegetais (FARNSWORTH, 1985). Em revisão mais recente HUXTABLE declara que na América do Norte um quarto de todas as prescrições incluem produtos derivados de plantas, além de outros agentes baseados em produtos vegetais (HUXTABLE, 1991).

A difusão do uso tradicional de plantas, bem como de outros produtos derivados de animais e minerais, tem contribuído amplamente para a descoberta de novas drogas-protótipo e outras preparações medicamentosas. Como ressalta FARNSWORTH (1985) muitas drogas desenvolvidas a partir de plantas foram idealizadas tomando-se como base de ação farmacológica estudos de dados etnográficos, os quais fundamentam-se numa correlação bem estabelecida entre o conceito tradicional e o conceito científico.

No Brasil os antecedentes etnomédicos a cerca de estudos farmacológicos de espécies vegetais nativas remontam ao início da colonização (GOTTLIEB e KAPLAN, 1983; RIBEIRO et al., 1987). O conhecimento científico das plantas medicinais brasileiras ainda é, entretanto, pouco significativo, fato que comprova a discrepância entre a potencialidade da flora brasileira e a falta de um planejamento político adequado que permita o desenvolvimento de projetos científicos visando um melhor nível de conhecimento sobre a botânica, química e farmacologia das plantas nativas (MATOS, 1990).

Nos últimos anos porém, ressurgiu o interesse pelos produtos naturais de maneira geral, fato motivado entre outras coisas pela crise da saúde pública e agravamento

das dificuldades sociais da população, além da preocupação com as repercussões da ação humana sobre o meio ambiente desde o período colonial da História brasileira. É portanto, urgente, a pesquisa científica da flora nacional no sentido de ampliar os recursos terapêuticos, permitir a utilização segura das preparações medicamentosas e melhorar as condições de atendimento, principalmente no segmento popular de baixa renda.

1.2. Os óleos essenciais e as plantas terrestres.

As plantas da Terra têm sido consideradas originárias de Charales, uma linha evolutiva que pertence a divisão proctotista, componente importante do fitoplankton Chlorophyta. o qual é provável ancestral das briófitas, espécies primitivas surgidas no planeta a cerca de meio bilhão de anos.(GOTTLEB e SALATINO, 1987).

Evolutivamente de briófitas a Angiospermas a síntese química dos vegetais está relacionada a proteção da planta através da produção de substâncias ativas ou compostos intermediários (GOTTLEB, 1987). Dentre essas substâncias destacam-se policetídios, alcalóides e saponinas esteroidais, flavonas e bioflavonas, taninos condensados e ligninas, além de mono e sesquiterpenóides em óleos essenciais. A diversidade de produtos naturais das plantas está, correlacionada, também, segundo vários cientistas, com a interação mutualista surgida devido a co-evolução das plantas com agentes fitófagos e mesmo patogênicos (EHRlich e RAVEN, 1965; SWAIN, 1979; RHOADES, 1979).

Os constituintes químicos de óleos essenciais pertencem a diversas classes importantes predominando os terpenóides e os ligninóides cujos esqueletos carbônicos 1 e 2 encontram-se representados na figura 1. É provável que os isoprenóides (baseados no esqueleto 1) e a fenilalanina (baseado no esqueleto 2) existam há mais de 3.800 milhões de anos. (MILLER e ORGEL, 1974).

1.2.1 Óleos essenciais em algas

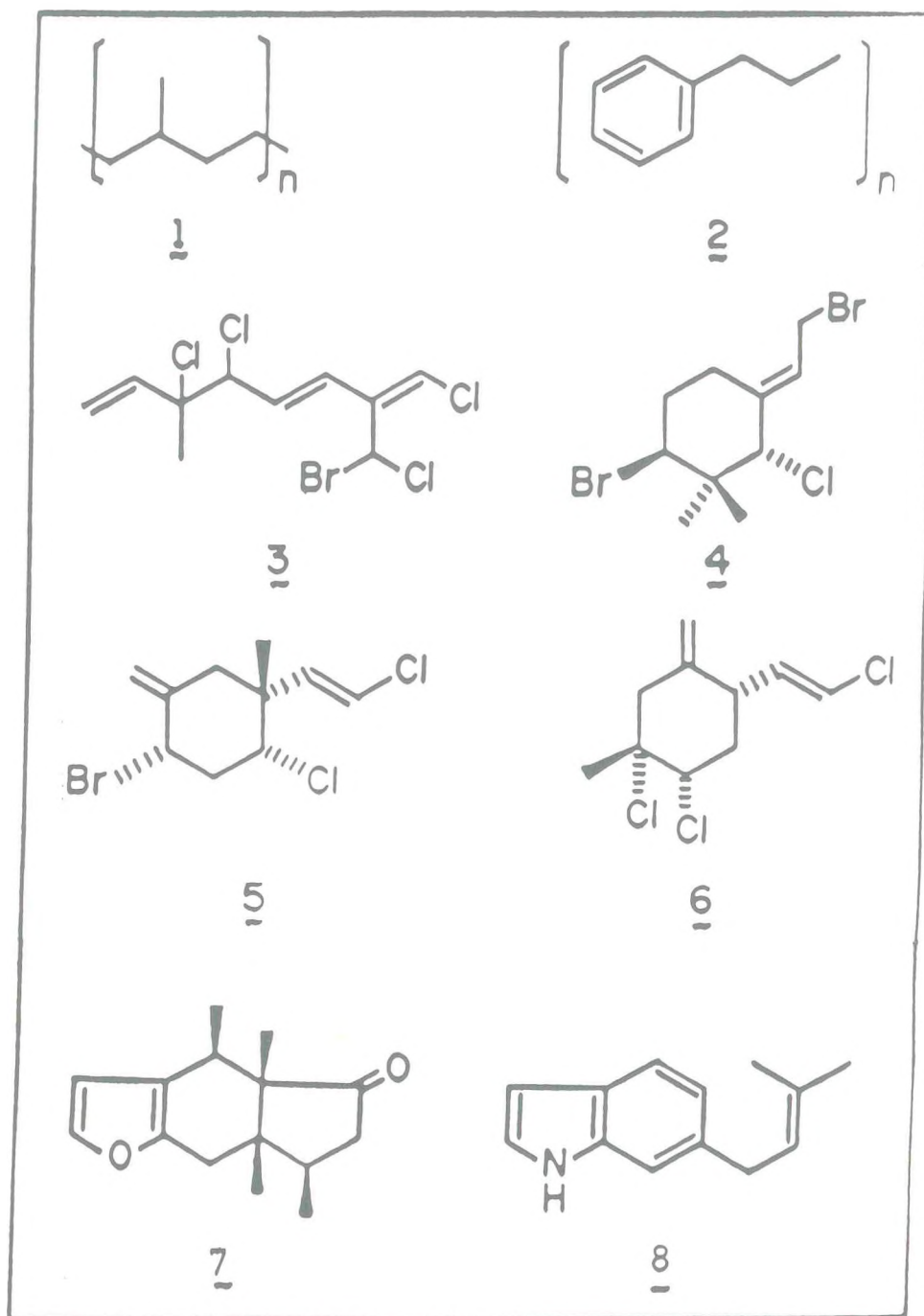
As condições anóxicas que predominavam a cerca de 3.000 milhões de anos na Terra favoreceram o desenvolvimento dos organismos bacterianos procariontes do reino monera, os quais utilizavam vias biossintéticas simples produtoras de terpenóides. Possivelmente, a formação dos mono e sesquiterpenóides primordiais pelas algas eucarióticas só ocorreu a mil milhões de anos, enquanto o surgimento dos primeiros ligninóides demorou muito tempo mais. Assim, é provável que a modificação na atmosfera terrestre primitiva rica em amônia para a atmosfera oxidante de cerca de mil milhões de anos atrás possibilitou desvios do metabolismo primário para vias biossintéticas produtoras de metabólitos secundários, os quais geraram as pequenas moléculas primordiais, cujos aleloquímicos podemos citar como exemplo: α - pineno, d - limoneo, geraniol e linalol de *Sargassum* e *Laminaria* (Phaeophyta), *Porphyra* e *Digenea* (Rhodophyta). Segundo CREWS (1984), várias centenas de mono e sesquiterpenos halogenados (3 a 6) de algas marinhas são conhecidos (figura 1).

Muitas dessas substâncias têm atividades antimicrobiana e antifúngica (CREWS, 1984).

1.2.2 Óleos essenciais em fungos

Os produtos odoríferos sintetizados por certas hifas especializadas não são, necessariamente, óleos essenciais se adotada sua definição clássica, já que carecem de monoterpenos enquanto os sesquiterpenos limitam-se a substâncias azulogênicas. Algumas vezes ocorre, entretanto, formação de compostos aromáticos durante o tratamento do material. (GOTTLIEB e SALATINO, 1987).

FIGURA 1. Algumas classes de constituintes de óleos essenciais



Adaptado de GOTTLIEB & SALATINO (1987)

1.2.3. Óleos essenciais em Briófitas

Entre os organismos mais recentes são encontrados sesquiterpenóides com características semelhantes às plantas floríferas mais avançadas. JUNGERMANNIALES e MARCHANTIALES pertencem aos modernos Bryophyta em que algumas espécies são produtoras de óleos essenciais, os quais frequentemente acumulam-se em organelas celulares do vegetal. Ilustrativamente, figura 1, cita-se as espécies *Aneura pinguis* e *Riccardia sinuata* que sintetizam pinguisona (7) e prenilindóis (8), produtos que são tóxicos para insetos (HEROUT, 1977).

1.2.4. Óleos essenciais em Pteridófitas

Ocorrem em grupos restritos. Certas espécies da ordem Filices (Ex: Samambaias) algumas vezes acumulam mono e sesquiterpenóides em pêlos glandulares, entretanto pouco sabe-se ainda sobre a caracterização química de tais produtos. (HEGNAUER, 1979).

1.2.5. Óleos essenciais em Gimnospermas:

Neste grupo encontram-se importantes famílias produtoras de óleos essenciais como Pinaceae (*Cedrus*, *Pinus*), Cupressaceae (*Juniperus*) e Cicadopsida que produzem e acumulam grandes quantidades de óleos essenciais característicos em seus diversos tecidos (cavidade e canais esquizógenos).

Sugere-se que a importância dessas substâncias nessas espécies correlacionam-se a afastar herbívoros e inibir a germinação de vegetais competidores. (GOTTLIEB e SALATINO, 1987).

1.2.6. Óleos Essenciais em Angiospermas:

As angiospermas têm a vantagem evolutiva decorrente da presença de flores possibilitando a associação com insetos. Aqui os constituintes químicos dos óleos essenciais alcançaram ampla variedade e enorme diversificação de atividades biológicas.

Estas plantas representam um interface evolutiva que culminou com o aparecimento de fenômenos de síntese bioquímica de ligninóides voláteis em contraposição aos terpenos voláteis das algas antigas.

Entre os angiospermas encontram-se os tecidos vegetais evolutivamente mais especializados para produção e armazenamento de óleos essenciais - os pêlos glandulares. A tabela 1 apresenta uma lista de importantes famílias de dicotiledôneas produtoras de óleos voláteis.

Nas regiões temperadas da Terra, dentre as plantas fornecedoras de óleos essenciais predominam as Apiaceae. Nos trópicos destaca-se o táxon Magnoliiflorae. As plantas aromáticas habitantes de florestas úmida tropical como por exemplo na Região Amazônica do Norte do Brasil são ainda pouco conhecidas. Os óleos essenciais contém um vasto número de substâncias cujo espectro de atividades biológicas apenas recentemente começou a ser descrito.

1.3. Farmacologia e óleos essenciais

O aroma de uma planta ou de quaisquer de suas partes pode dever-se ao óleo essencial, o qual pode existir em estado livre, como nas flores ou em órgãos especializados do vegetal. A planta como um todo pode ser odorífera ou o odor pode residir nas flores, folhas, tronco, raízes, etc. A maioria dos frutos comestíveis, por exemplo, possuem um sabor agradável devido a presença de substâncias aromáticas.

Os óleos essenciais são produtos naturais derivados de plantas e extraídos principalmente por arraste com vapor d'água. São voláteis, aromáticos e saborizantes, contendo variáveis proporções de terpenos (α - pineno, d - limoneno), alcóois (nerol, geraniol, citronelol, linalol, mentol), aldeídos (citral - B. citronelal), cetonas (mentona, l - carvona, metilnonilcetona e metilundecilcetona), fenóis (eugenol), além de ésteres, éteres, ácidos e hidrocarbonetos de estrutura aromática ou terpênica. Em geral, os aldeídos e alcóois derivados de terpenos são mais odoríferos e voláteis que aqueles originados de hidrocarbonetos aromáticos.

A história dos óleos essenciais teve início no Antigo Oriente entre os povos do Egito, Pérsia, Índia, os quais utilizaram pela primeira vez o processo de destilação para a obtenção desses compostos. A difusão dos óleos aromáticos de forma mais abrangente, entretanto, não ocorreu até a segunda metade do século XVI, como demonstram diversas publicações germânicas e francesas a cerca de aperfeiçoamento dos processos de produção, conhecimento da natureza química e meios de conservação desses produtos naturais (HAAGEN-SMITH,1972).

Portanto, desde as antigas civilizações os óleos essenciais têm sido utilizados pelo homem para as mais diversas finalidades: como condimentos nos alimentos e em algumas bebidas, como odoríferos (incensos) para fins estéticos e até como repelentes para insetos. Também têm sido empregados como conservantes evitando a destruição de grãos e outros produtos agrícolas, permitindo a estocagem da produção agropecuária entre as culturas primitivas

TABELA 1. Dicotiledôneas produtoras de óleos essenciais. S... superordem (terminação: iflorae), O... ordem (terminação: ales), F... família (terminação: aceae)

Células oleíferas	Cavidades e canais		Pêlos glandulares	Deposição em	
	secretóres			lenho	
S-iflorae	S-iflorae	S-iflorae	S-iflorae	S-iflorae	
O-ales	O-ales	O-ales	O-ales	O-ales	
F-aceae	F-aceae	F-aceae	F-aceae		
Magnoli	Polygon		Caryophyll	Ros	
Illici	Polygon		Caryophyll	Ros	
Schizandr	Polygon		Chenopoldi	Ros	
Illici	Malv		Malv	Rut	
Magnoli	Euphorbi		Urtic	Gerani	
Degeneri	Euphorbi		Cannabin	Zygophyll	
Magnoli	Malv		Viol	Santal	
Winter	Malv		Viol	Santal	
Himantandr	Viol		Turner	Santal	
Lactorid	Viol		Ros	Solan	
Chloranth	Flacourti		Jugland	Boragin	
Annon			Rhoiptele	Boragin	
Myristic	The		Jugland	Solan	
Canell	The		Myric	Convolvul	
Annon	Clusi		Myric		
Eupomati	Fab		Ros		
	Fab		Ros		
Laur	Caesalpin		Fag		
Amborell	Fab		Betul		
Trimeni	Myrt		Rut		
Autrobailey	Myrt		Gerani		
Monimi	Myrt		Gerani		
Gomorteg	Onagr		Sapind		
Calycanth	Rut		Sapind		
Laur	Rut		Com		
Hernandi	Rut		Eric		
Aristolochi	Burser		Eric		
Aristolochi	Sapind		Lami		
Nymphae	Anacardi		Lami		
Piper	Arali		Lami		
Saurur	Pittospor		Verbem		
Piper	Pittospor		Scrophulari		
Rut	Arali		Myopor		
Rut	Arali		Scrophulari		
Meli	Api		Acanth		
Cneor	Aster		Buddlej		
Rut	Aster		Gesnerj		
Myrt	Aster		Aster		
Myrt			Aster		
Onagr			Aster		
Ros					
Hamamelid					
Myrothamm					
Malv					
Euphorbi					
Euphorbi					
Com					
Dipsac					
Valerian					
Viol					
Salic					
Salic					

Adaptado de GOTTLIEB & SALATINO (1987) e de DAHLGREN (1980)

O papel fisiológico dos óleos aromáticos para as plantas não está totalmente esclarecido. A fragância de certas flores tem a capacidade de atrair abelhas polinizadoras, contribuindo para auxiliar a reprodução da planta. Algumas árvores possuem mecanismos de defesa contra insetos, devido a presença de óleos voláteis repelentes em sua casca. Outros óleos regulam a taxa de transpiração nas plantas, e até podem fazer parte do metabolismo normal, como também acontece com alguns alcalóides e taninos em certas espécies vegetais (HAAGEN-SMITH, 1972).

Sob o ponto de vista econômico os óleos essenciais têm ampla importância nos dias atuais, uma vez que são empregados industrialmente como aromatizantes para a manufatura de sabões e sabonetes, cosméticos, preparações farmacêuticas, desinfetantes etc. São utilizados mundialmente pela indústria de perfumaria cerca de 1.500 variedades de óleos aromáticos extraídos de plantas. Dentre as famílias mais importantes podem citar Coniferae, Ericaceae, Graminea, Labiteae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae, e Rutaceae (CRAVEIRO, et al, 1981).

Tendo em vista a imensa quantidade de substâncias presentes nos óleos essenciais, são reconhecidas diversas atividades farmacológicas promovidas pelas seus principais constituintes: metileugenol, isoeugenol, estragol, saffrol, timol, mentol, α - bisabolol, ascaridol, 1,8 - cineol, citronelol, cravacol, etc. Foram documentadas atividades antimicrobiana, para fungos, bactérias e protozoários (VILAR et al, 1986; PAULI e KNOBLOCH, 1987; JANSEN et al, 1987; De BLASI et al, 1990; LEMOS et al, 1990) sedativa, antiinflamatória, diurética, e antidiurética (ROSSI, et al, 1988; GU e DENG, 1987), anticonvulsivante (NWAIRN e AKALI, 1986), anti-séptica (CERUZZI e ABRAHAM, 1982) analgésica (LORENZETTI et al, 1991), espasmolítica (CRUZ et al, 1990) repelente para insetos (BRAGA, 1960) entre outras.

Ações mais específicas de componentes de óleos essenciais têm sido também descritas. O mentol, por exemplo, parece ter capacidade de inativar canais de cálcio

dependentes de voltagem em neurônios periféricos (SWANDULLA et al, 1987), tal ação pode contribuir para seus reconhecidos efeitos espasmolíticos. Foi também descrita a ação antiinflamatória do óleo essencial da Vanillosmopsis arborea, muito rico em alfabisabolol, provavelmente mediadas através da inibição de enzima ciclooxygenase (MENEZES et al, 1990). RAO e colaboradores, 1990, demonstraram que o mirceno um composto isolado de Cymbopogon citratus, produz analgesia central e periférica, envolvendo opióides endógenos.

É interessante salientar que certos constituintes de óleos fixos têm demonstrado grande importância como instrumento experimental em investigações científicas. Os ésteres de forbol, um grupo de substâncias pró-inflamatórias e promotoras de tumores, inicialmente isolados do óleo de Croton tiglium e outras espécies de gênero Croton, têm sido utilizadas para o estudo da função fisiológica, propriedades e distribuição da proteína quinase tipo C (GUYTON e KENSLER, 1993). A proteína quinase parece ser o alvo celular do ésteres de forbol; substâncias denominadas promotores de tumor ("tumor promoters") ativam esta enzima "in vivo" e "in vitro" (BLUMBERG, 1988). FERNANDES e associados (1978) estudando o óleo essencial de Croton aff zehntneri, uma planta de ocorrência no Nordeste do Brasil, também descreve atividade promotora de tumor.

Os estudos com óleos essenciais de plantas do Nordeste, têm demonstrado atividades antimicrobiana, espasmódica, antitumoral e promotora de tumor, antiinflamatórias e pró-inflamatórias. A flora nordestina é uma das mais ricas da Terra, necessitando de investigações mais abrangentes nas áreas de botânica, química e farmacologia, e no que se refere a presença de óleos essenciais principalmente, bem como de seus constituintes, possibilitando a descoberta de compostos com potencial emprego em farmacologia experimental e terapêutica.

1.4. Inflamação aguda e Farmacologia experimental

Um dos capítulos mais fascinantes do estudo da farmacologia é o da abordagem experimental utilizada para a demonstração das ações das drogas.

Até o fim do século XIX os pesquisadores adotavam testes diretamente na espécie humana a fim de avaliar as ações de novos compostos. A Farmacologia libertou-se das limitações e riscos destes métodos a partir do desenvolvimento dos ensaios biológicos realizados tanto "in vitro" (fora do animal) quanto "in vivo" (no próprio animal) utilizando animais de experimentação, nos quais o cientista simula um processo fisiopatológico semelhante aquele que ocorre no homem. O simples teste que consiste na indução de inflamação subplantar em ratos para medir o efeito de drogas na redução do edema foi essencial para a descoberta de centenas de substâncias que hoje fazem parte do arsenal de drogas denominadas antiinflamatórias não-esteroidais ou tipo aspirina, as quais são consumidas em quantidade superiores a cem mil toneladas por ano, e só nos Estados Unidos da América movimentam no mercado uma cifra superior a um bilhão de dólares (FERREIRA, 1985).

Na atualidade os ensaios experimentais empregados para avaliar a atividade de drogas antiinflamatórias ou pró-inflamatórias têm como base a inibição ou a indução de um fenômeno inflamatório que possa ser quantificado. Esta reação inflamatória pode ser produzida por agentes físicos (traumas mecânicos, por exemplo), químicos (histamina, serotonina, etc.) ou biológicos (venenos de animais peçonhentos, toxinas bacterianas, etc.) e normalmente é capaz de reproduzir sintomas e sinais que caracterizam o processo inflamatório: calor, rubor, tumor, dor e perda de função. Dentre os métodos empregados experimentalmente destacam-se:

a - Edema de pata no rato

b - Permeabilidade capilar e migração celular em cavidades corporais (pleura e peritônio, principalmente) de ratos, coelhos e cobaias.

c- Estudos histopatológicos, os quais consistem de uma avaliação morfológica ao nível microscópico da área inflamada.

O edema na pata traseira do rato produzido pela injeção de um agente flogístico é uma das técnicas mais utilizadas em nossos dias como modelo de inflamação experimental. Durante muito tempo, os materiais flogísticos mais empregados incluíam levedura de cerveja, formalina, dextrana, e até ovoalbumina. Entretanto, o edema induzido por tais substâncias não é influenciado especificamente por drogas antiinflamatórias, outras variedades de compostos são capazes de reduzir suas resposta edematogênica. Por exemplo, sabe-se que o edema de pata induzido por dextrana pode ser inibido por agentes adrenérgicos, mas não por cortisona (WINTER, et al, 1962). Assim, após testar uma variedade de substâncias capazes de produzir efeito edematogênico na pata do rato, WINTER, RISLEY e NUSS (1962) estabeleceram a carragenina como instrumento experimental para testar drogas antiinflamatórias neste modelo. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado derivado de *Condrus criptus*, uma espécie de alga marinha existente no litoral irlandês, que produz efeitos pró-inflamatórios altamente reproduzíveis na indução do edema da pata no rato. além de não promover efeitos colaterais de natureza sistêmica nas doses e via utilizadas neste modelo(WINTER et al, 1962).

No intuito de ampliar os estudos sobre a fisiopatologia do processo inflamatório agudo novos trabalhos surgiram a fim de permitir a abtenção de maiores informações quanto a natureza do agente irritante, aos sítios da resposta inflamatória, bem como quanto a cinética da produção e elaboração de um vasto espectro de substâncias conhecidas como mediadores inflamatórios. Com base nestes objetivos foram estabelecidos vários esquemas experimentais, dentre os quais destacam-se o modelo da pleurisia em ratos e coelhos, principalmente, tendo sido empregado aqui variados agentes irritantes.

A literatura salienta que a pleurisia induzida por carragenina em ratos é um excelente modelo de inflamação aguda experimental, o qual permite avaliar o extravasamento vascular a migração leucocitária, além de vários parâmetros bioquímicos a

partir do exsudato inflamatório. (MAYASAKA e MIKAMI, 1982). Outros agentes flogísticos também têm sido utilizados para a indução de pleurisia em animais de laboratório, um deles é a essência de terebintina (oil of turpentine), uma substância tipo oleoresina extraída de Pinus. O óleo de terebintina foi um dos primeiros óleos essenciais a ter sua preparação definida, tendo sido mencionado inclusive na obra "De Materia Medica" de DIOSCORIDES, um tratado que dominou a terapêutica médica por mais de 1.500 anos, DI ROSA e colaboradores (1971) demonstraram que o óleo de terebintina produz um padrão de reação inflamatória similar ao da carragenina em modelos de pleurisia e edema de pata em ratos, podendo ser inibido inclusive por drogas que reduzem a resposta promovida pela carragenina.

Outro importante aspecto a ser ressaltado no contexto de estudos experimentais foi a utilização do microscópio, o que abriu enormes possibilidades para a avaliação dos eventos celulares que acompanham o desenvolvimento do processo inflamatório. Os trabalhos de JULIUS COHNHEIM e ELIE METCHNIKOFF, estudiosos do século XIX, foram pioneiros. COHNHEIM estudou a migração dos glóbulos brancos do sangue para os tecidos, numa preparação em que aplicava um estímulo lesivo ao olho de um batráquio e, em seguida, verificava a infiltração celular ocorrida na borda da área lesionada,. COHNHEIM enfatizou a idéia da participação de alterações vasculares e suas consequências (Vasodilatação, edema, migração celular, etc.) no contexto da resposta inflamatória (denominada teoria humoral da inflamação). METCHNIKOFF, por sua vez acreditava que a fagocitose era o fenômeno central da reação inflamatória, e que as alterações na microcirculação eram necessárias para que os fagócitos atingissem o local em que se encontravam os microorganismos invasores, promovendo a fagocitose desses micróbios (denominada teoria celular de inflamação). Acredita-se, em face dos conhecimentos atuais, que ambos os pontos de vista são de grande importância e estão intimamente relacionados (LEWIS, 1986).

VINEGAR e colaboradores (1987) apresentaram uma excelente abordagem das alterações histológicas que acompanham o desenvolvimento do edema da pata do rato induzido por carragenina. Trata-se de um estudo experimental delineado com base na avaliação sequencial em 43 etapas das alterações locais ao nível da derme e epiderme. Alguns estudos das alterações microscópicas também foram realizadas em modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos (VINEGAR et al, 1982).

Ao longo dos anos, os esforços de inúmeros pesquisadores permitiram a aquisição de imensa riqueza de conhecimento na área de Farmacologia da Inflamação e, muito embora tenham sido desenvolvidas algumas novas técnicas de estudo experimental (SVENSJO, 1990), os bioensaios clássicos, estabelecidos pelos pesquisadores precursores, mostraram-se eficazes (OTTORNESS e GANS, 1988) e continuam a ser empregados rotineiramente para a triagem de drogas antiinflamatórias.

1.5. A Planta

1.5.1. Descrição botânica e distribuição geográfica

Pilocarpus spicatus St. Hill é um arbusto de 1/2-2m de altura, com ramos densamente folhosos, folhas alternas, na parte superior dos ramos subpostos: pecíolo 1-2cm de comprimento, lâmina oblonga ou oblongo-elíptica de ápice obtuso, base aguda, margem revoluta de 15-17cm de comprimento e 4-5cm de largura com glândulas translúcidas: racemos terminais de até 30cm de comprimento; pedicelo florífero de 2-4mm de comprimento, tênue; botão oboral; cálice com lobos de 1/2-3/4mm de comprimento de margem esticada, pétalas esverdeadas com 2mm de comprimento e 1mm de largura; estames com filetes do tamanho das pétalas, anteras com 1/2mm de comprimento; cápsula, geralmente com 5 cocas comprimidas, carenados nos dois lados, de 7mm de comprimento com glândulas avermelhadas. -São Paulo, Rio de Janeiro e Ceará.(PIO CORRÊA, 1984).

1.5.2. - Estudos Químicos

O óleo essencial *Pilocarpus spicatus* (OEPS) foi obtido do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

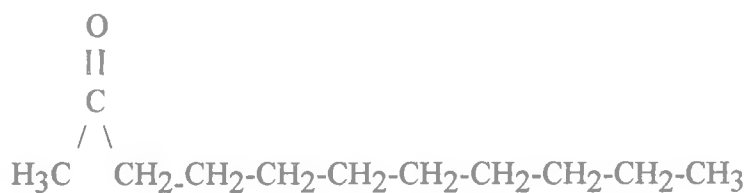
Pilocarpus spicatus, bem como outras espécies de referido gênero, apresenta óleo essencial basicamente nas glândulas esquizógenas das folhas. Foi documentado, no entanto, a presença de alguns constituintes nas raízes da planta (ANDRADE NETO, 1990).

O óleo essencial aqui empregado foi extraído a partir das folhas por arraste com vapor d'água e está constituído quimicamente com maior percentagem de metil cetonas alifáticas de onze e treze átomos de carbono, além de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (raro). Não foi isolado pilocarpina em *Pilocarpus spicatus* St. HILL (KAASTRA, 1982). A figura 2 apresenta a estrutura das cetonas descritas, estando o óleo constituído em 80% com metil-nonilcetona e 10% de metil-undecilcetona (MATOS, 1991).

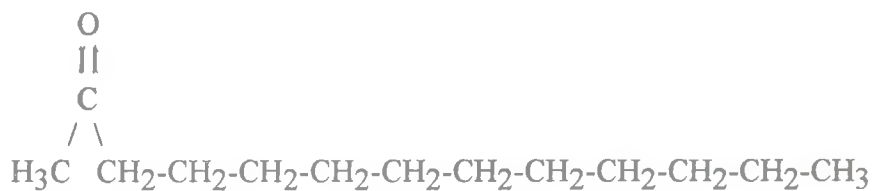
1.5.3.- Objetivos

Foram muito poucos os estudos sobre a farmacologia do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OESP), considerando a abundância do referido óleo em cetonas alifáticas, substâncias que apresentam propriedades irritantes teciduais, foi estabelecido um esquema de estudo baseado nos seguintes objetivos:

- 1- Analisar a ação pró-inflamatória do OEPS em modelos clássicos de inflamação aguda e sub-aguda;
- 2- Comparar os efeitos pró-inflamatórios do OEPS aos da carragenina, uma substância largamente empregada em estudos de inflamação experimental;
- 3- Caracterizar farmacologicamente os mediadores inflamatórios envolvidos no modelo de edema de pata induzido pelo OEPS em ratos.



METIL-NONILCETONA



METIL-UNDECILCETONA

FIGURA 2 Estrutura química das metilcetonas presentes
no óleo essencial de Pilocarpus spicatus

2. MATERIAL

2.1. A Planta:

O óleo essencial empregado nos ensaios experimentais foi obtido a partir das folhas de Pilocarpus spicatus provenientes do município de Maranguape - Ceará. Entre as variedades de "Jaborandi", presentes no Estado do Ceará, a espécie em questão foi identificada como Pilocarpus spicatus St. Hill pelo prof. Afrânio Gomes Fernandes, de acordo com informações procedentes do Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

2.2. Animais Experimentais:

Ratos albinos (*Rattus Norvegicus*) variedade Wistar, machos e fêmeas adultas, provenientes do Biotério Central do Pici e do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, mantidos a temperatura ambiente com ração padrão (Purina Chow) e "água ad libitum".

Camundongos albinos (*Mus musculus*), adultos do sexo masculino, mantidos em condições semelhantes aos ratos. Todos provenientes do Biotério Central do Pici e do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

3. Soluções Fisiológicas

Todas as soluções foram preparadas com sais de pureza analítica MERCK.

As concentrações encontram-se expressas em milimolar (mM):

-Salina Fisiológica

NaCl 154

-Salina Tamponada com Fosfato (PBS)

NaCl 137; KCl 2.68; Na_2HPO_4 4,40; NaH_2PO_4 1,45

4. Reagentes e Corantes:

- Álcool etílico (MERCK)

- Azul de Évans (SIGMA)

- Azul de Metileno (REAGEM)

- Corante Pancrômico de Rosenfeld:

- Giemsa - azul - eosina - azul de metileno 97,0 mg.

- May - Grunwald - eosina-azul de metileno 53,0 mg

-Metanol P.A. (MERCK) 1,0 l.

- Corante de Turk:

- Ácido acético glacial P.A. (MERCK) 20,0 ml

- Azul de metileno (REAGEN) 0,5 g

- Água destilada 1,0 l

- Dimetilsulfóxido (DMSO-GRUPO QUÍMICA)

- Éter etílico (GRUPO QUÍMICA)

- Formaldeído (HERZOG)

- Formamida (CARLO ERBA)

- Lauril Sulfato de Sódio (REAGEN)

- Tween 80 (SIGMA)
- Ovoalbumina (SERVA)
- Salina Tamponada com Fosfato - PBS (OXOID)

2.5. Drogas

- Carragenina (SIGMA)
- Clorfeniramina (SCHERING)
- Composto 48/80 (WELLCOME RESEARCH LAB)
- Dexametasona (UPJOHN)
- Fenilbutazona (GEIGY)
- Heparina sódica (ROCHE)
- Metisergida (SANDOZ)

1. MÉTODOS

3.1. Ensaio Farmacológicos

3.1.1. Edema de pata induzida pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos.

Foram escolhidos ratos Wistar machos, pesando entre 120 e 180 gramas. Os animais eram colocados em jejum sólido 24 horas antes do início do experimento. Transcorrido este período, mediu-se todas as patas traseiras direitas e esquerdas de cada animal. Em seguida, foram divididos em três grupos com seis animais cada, os quais receberam 0,1ml/rato do OEPS (2,5 e 5%) ou carragenina(1%) na superfície subplantar da pata traseira direita. Um volume igual dos veículos apropriados (salina e emulsão de Tween 80 1%) foi injetado nas patas contralaterais. O OEPS foi emulsificado em tween 80 (9:1 v/v) e diluído em salina 154 mM estéril. O volume de todas as patas nos diferentes grupos foi medido pletismograficamente antes e nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas após a indução do edema (WINTER et al, 1962). A diferença de volume entre as patas traseiras direita e esquerda em relação ao volume inicial das mesmas foi expressa em mililitros (ml) e representa a magnitude de formação do edema.

Pletismografia e determinação do volume da pata:

A medida do volume da pata dos animais foi baseada no método descrito por WINTER et al (1962). A figura 3 apresenta uma ilustração do aparelho aqui empregado.

O pletismógrafo foi colocado em local isento de vibrações. A pata traseira, demarcada ao nível da proeminência do calcanhar, foi firmemente estendida e imergida num recipiente (B), através do qual o fluido desloca-se para o interior de um tubo horizontal

graduado de 0,01ml (C). O fluido utilizado foi uma solução de Lauril sulfato de sódio a 0,05% diluído em álcool etílico hidratado (5%). Após o esvaziamento da solução e zeragem do aparelho a torneira da extremidade (D) e fechada impedindo a abertura ao vácuo, de modo a permitir a abertura do tubo graduado (E) à atmosfera. A pata do animal foi imersa no vaso (B) até o ponto de demarcação anatômica no qual alinhava-se o menisco do fluido observado visualmente por 2 a 4 segundos, ocorrendo o deslocamento do fluido. A pata foi retirada e a leitura registrada no tubo graduado (C).

3.1.2. Pleurisia experimental induzida pelo óleo essencial *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos.

Neste experimento foi empregado o método descrito por Di ROSA et al (1971).

Foram utilizados ratos Wistar (120-180g) de ambos os sexos, divididos em grupos de 6 animais cada. Após anestesia com éter, os animais receberam injeção intratorácica de 0,1 ml de OEPS (10%v/v), carragenina (1%) e veículo (emulsão de Tween 80 1%). Transcorrido período de 1, 5 e 24 horas; os animais foram sacrificados com "overdose" de éter, procedida uma pequena abertura de parede torácica direita e lavagem da cavidade com 1,0ml de PBS contendo heparina (5 UI/ml). O lavado pleural foi coletado e feita a determinação do volume de exsudato e contagem total e diferencial de células presentes. Foi obtida a média dos volumes do exsudato nos grupos teste e controle nos períodos de tempo supracitados, cujos valores foram expressos em mililitros (ml). Para a contagem total foram diluídos 20ul do lavado pleural em 0,2 ml de solução de Turk e feita a contagem em câmara de NEWBAUER. A contagem diferencial foi realizada em lâminas comuns, coradas com corante pancrômico Rosenfeld, utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo. Foram contadas 100 células por lâminas, identificando-se neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e mononucleares (macrófagos e linfócitos). O número de

cada tipo celular foi determinado a partir da percentagem encontrada em relação ao número total de células por mililitros de lavado pleural.

3.1.3. Lesão granulomatosa induzida por "pellets" de algodão impregnados com óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos

De acordo com o método descrito por WINTER e PORTER (1957), foram utilizados três grupos com 5 ratos em cada (Wistar 100-120g) os quais foram deixados em jejum por 12 horas. Em seguida, os animais foram anestesiados com éter e dois "pellets" de algodão (50 ± 1 mg), previamente esterilizados em autoclave, impregnados com 0,1ml de carragenina 1%, OEPS (10%v/v) e veículos apropriados, foram implantados cirurgicamente, no tecido subcutâneo de cada lado da linha média dorsal nos animais dos respectivos grupos. Uma semana depois os animais foram sacrificados, os pellets removidos e pesados logo em seguida (peso úmido), e após dessecação (peso seco) em estufa a 37°C durante 12 horas. Foi obtida a média de pesos úmido e seco dos granuloma nos grupos teste e comparados ao controle, sendo os valores expressos em miligramas.

3.1.4. Efeito do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina (Cg) na permeabilidade capilar na cavidade peritoneal em camundongos

Foram utilizados camundongos albinos de sexo masculino (25-30g) divididos em três grupos de 5 animais cada.

Todos os animais receberam 0,2ml de uma solução de azul de Evans (1%) por via endovenosa. Imediatamente após, os grupos foram tratados da seguinte maneira:

1° Grupo - 0,1 ml de OEPS (5% v/v), i.p.

2° Grupo - 0,1 ml de OEPS (10% v/v), i.p.

3° Grupo - 0,1 ml de Cg (2%), i.p.

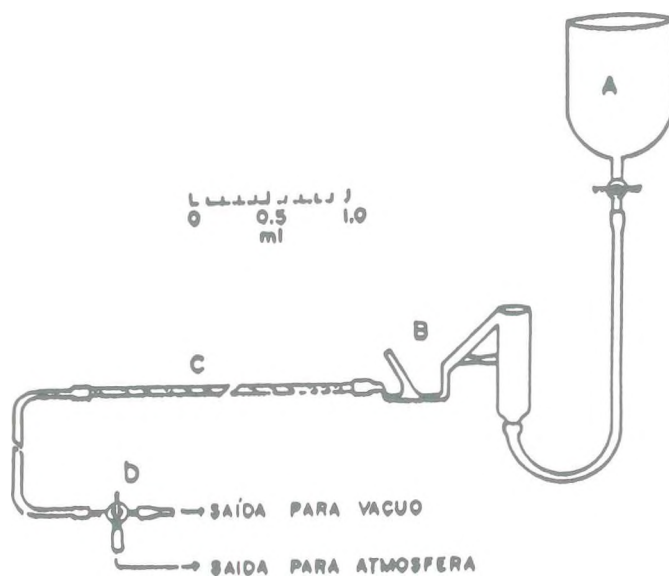


FIGURA 3 . Pletismógrafo - aparelho empregado para medida do volume da pata do rato

A pata é introduzida no vaso B, preenchido com líquido proveniente do reservatório A, fazendo o líquido transbordar para o tubo C, no qual procede-se a leitura correspondente a alteração de volume

Transcorridos 30 minutos a partir da injeção dos agentes flogísticos, os animais foram sacrificados em câmara com éter, fez-se lavagem da cavidade peritoneal com água destilada, sendo colhido o lavado, e medido espectofotometricamente (560nm) o extravasamento do corante, cujo valor final foi expresso em microgramas.(μ g).

3.1.5. Participação de mediadores do processo inflamatório no modelo de edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos:

3.1.5.1. Efeito de drogas antagonistas da histamina e da serotonina sobre a atividade edematogênica do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos.

Neste ensaio foram utilizados 3 grupos de ratos Wistar machos, 6 animais cada, com peso entre 120-180g, escolhidos aleatoriamente. O 1° grupo (controle) foi tratado com o veículo salina 154 mM na dose de 2ml/kg, i.p., o 2° com um bloqueador histaminérgico H1, clorfeniramina, na dose de 10mg/kg, i.p. e o 3° com um antagonista do receptor serotoninérgico, metisergida, na dose de 1mg/kg, p.o.: uma hora após todos os animais receberam 0,1ml de OEPS (5% v/v) na região subplantar da pata traseira livreita..

O volume da pata foi medido por antes e nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5, e 24 horas após a injeção de OEPS.

A ação anti-edematogênica das drogas foi determinada com base na inibição percentual de formação do edema de acordo com a seguinte fórmula:

Porcentagem de inibição = $1 - (V_t/V_c) \times 100$, onde V_t e V_c correspondem a média das diferenças entre as medidas das patas nos grupos tratados e controle, respectivamente.

1.5.2. Efeito de inibidores de ciclooxigenase e lipooxigenase no edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos.

Neste experimento foi analisado o efeito da fenilbutazona (inibidor de ciclooxigenase) e do EP 10161 (inibidor de lipooxigenase).

Foram escolhidos ao acaso 3 grupos de ratos Wistar machos (120-180g), com 6 animais cada, 1º grupo (controle) foi tratado com o veículo salina 154 mM (2ml/kg i.p.), o 2º com fenilbutazona (100mg/kg,p.o.) e o 3º com EP 10161 (20mg/kg, i.p.), uma hora antes da injeção subplantar de 0,1 ml de OEPS a 5%v/v na pata traseira direita dos animais. O EP 10161 foi suspenso em DMSO 5%, todas as demais drogas foram diluídas em salina 154mM estéril.

O volume das patas foi medido pletismograficamente antes e nos períodos de 2, 3, 4, 5 e 24 horas após a injeção do OEPS. A inibição percentual do edema foi calculada de acordo com a fórmula citada no item 3.1.5.1.

1.5.3. Efeito da dexametasona no edema subplantar em ratos produzidos pelo óleo de essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS).

Foram utilizados 2 grupos de 6 animais cada (ratos Wistar machos 120-180g). O grupo controle recebeu salina 154mM (2ml/kg, i.p.) e o grupo teste dexametasona (0,5mg/kg,i.p.) duas horas antes da injeção de 0,1 ml de OEPS (5%v/v) na pata traseira direita de cada animal. Em seguida, utilizando-se um pletismógrafo, foi medido o volume de patas antes e nos período de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas após a administração do OEPS. O efeito anti-edematogênico foi quantificado com base na expressão citada no item 3.1.5.1.

3.1.5.4. Efeito da degranulação de mastócitos no edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OESP) em ratos.

Foi empregado neste ensaio o composto 48/80, uma substância que depleta os estoques de histamina e serotonina de mastócitos, com o intuito de analisar seu efeito no edema de pata promovido pelo OEPS.

Ratos Wistar machos (120-180g) divididos em 2 grupos de 6 animais cada, foram tratados com 48/80 na dose 0,6 mg/kg duas vezes por dia durante 3 dias consecutivos e 1,2mg/kg no 4º dia, por via intraperitoneal.

Seis horas após a última injeção de 48/80 foi administrado OEPS (0,1ml - 5% v/v) na pata traseira direita e veículo respectivo na pata contralateral, nos grupos tratado e controle.

A diferença no volume entre as patas traseira, direita e esquerda, medida nos períodos de 1,2,3,4,5 e 24 horas em relação ao seu volume inicial foi quantificada e expressa em mililitros.

3.2. Estudo histopatológico

Foram realizados cortes histológicos das patas dos animais nos períodos de 1,5 e 24 horas após a injeção subplantar de 0,1 ml do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (5% v/v) no intuito de avaliar as alterações teciduais que acompanham o desenvolvimento da reação edematogênica ao nível microscópico. Nesse sentido, os fragmentos das superfícies dorsal e ventral das patas foram fixados com formol 10% v/v, durante 48 horas e incluídos em parafina. Cortes histológicos foram obtidos através de micrótomo e corados com hematoxilina eosina. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico e fotografados.

3.3. Análise Estatística:

Os resultados obtidos foram expressos em termos de média $\pm$ E.P.M. (Erro Padrão da Média). Os índices de significância estatística ($p < 0,05$ no mínimo) foram calculados empregando-se o teste "t" de Student. Quando exigido os resultados foram submetidos a análise de variância (COSTA NETO, 1978).

4. RESULTADOS

4.1. Edema de pata induzido pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos.

O efeito do OEPS e da carragenina no desenvolvimento do edema inflamatório agudo encontra-se apresentado na figura 4..

A injeção subplantar do OEPS (2,5 e 5mg/pata) induziu um aumento dose-dependente do edema da pata em todos os intervalos de tempo registrados. O efeito edematogênico do OEPS na dose de 5mg/pata, foi maior que aquele da carragenina (1mg/pata) no período de 1 hora, atingindo ambos o mesmo nível em 3 horas, e, permanecendo relativamente constante até 5 horas, após a injeção. Além disso, o aumento no volume da pata promovido pelo OEPS no período de 24 horas manteve-se em cerca de 50% do valor medido no período de 3 horas, correspondente ao pico da reação edematogênica.

Os veículos do OEPS e carragenina não promoveram aumento representativo no volume da pata contralateral (esquerda) nos respectivos grupos, sendo tais valores deduzidos do volume final de pata direita, injetada com OEPS e carragenina, a cada intervalo de tempo analisado.

A tabela 2 compara a potência do OEPS e carragenina no modelo de edema da pata em ratos.

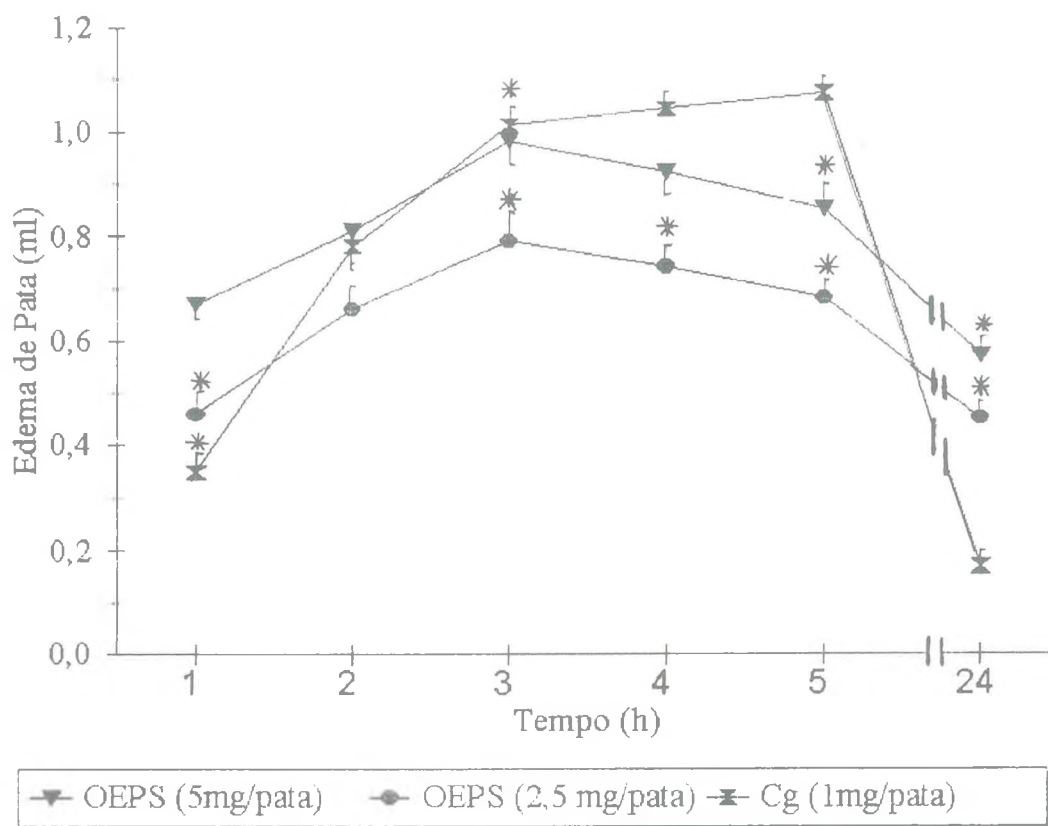


FIGURA 4 - Edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos. Curva de Cinética em função do tempo
Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo)
* p < 0,01 (teste "t" de Student)

TABELA 2. Comparação entre o efeito edematogênico induzido pelo óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina (Cg) na região subplantar do rato.

GRUPO	Edema de pata (ml)					
	1h	2h	3h	4h	5h	24h
OEPS (5mg/pata)	0.67* ± 0.02	0.81 ± 0.06	0.98* ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.85* ± 0.03	0.57* ± 0.02
OEPS (2.5mg/pata)	0.46* ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.79* ± 0.06	0.74* ± 0.05	0.68* ± 0.05	0.45* ± 0.03
Cg (1mg/pata)	0.35 ± 0.02	0.78 ± 0.04	1.01 ± 0.03	1.04 ± 0.03	1.07 ± 0.03	0.17 ± 0.02

Os valores são expressos em termos de média ± E.P.M. (n= 6 animais/grupo)

* p < 0,01 (teste "t" de Student)

4.2 . Pleurisia experimental induzida pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina em ratos.

Quando comparados ao grupo controle, os valores médios do volume de exsudato pleural medidos nos períodos de 1, 5 e 24 horas, foram maiores nos grupos tratados com OEPS (10mg v/v) e carragenina (1mg), tendo o OEPS demonstrado aumento significativo estatisticamente somente nos períodos de 1 hora ($p<0,05$) e 5 horas ($p<0,01$), enquanto a carragenina indicou diferença significativa apenas com 5 ($p<0,05$) e 24 horas ($p<0,02$) do início do tratamento. Os resultados encontram-se discriminados na tabela 3 e figura 5.

A contagem diferencial de leucócitos a partir do exsudato pleural de acordo com a tabela 4 e figura 6, demonstrou que nos grupos tratados com OEPS (10mgv/v) e carragenina (1mg) houve aumento significativo ($p<0,01$) da infiltração neutrofílica nos períodos de 5 a 24 horas, quando comparada ao grupo controle, tratado com o veículo, sendo que comparados os valores médios dos grupos que receberam OEPS e carragenina, não ocorreu diferença representativa. No período de 24 horas ambos os grupos estudados apresentaram predominância de células monucleares no exsudato pleural. Os valores médios de leucócitos/mm³ no exsudato dos grupos tratados com OEPS, Carragenina e veículo em 1 hora foram $2,83 \pm 0,38$, $3,83 \pm 0,83$ e $3,33 \pm 0,33$ respectivamente neste intervalo de tempo.

O veículo não promoveu migração de neutrófilos em nenhum dos períodos de tempo estudados.

TABELA 3. Formação de edema pleural induzido pelo óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina (Cg) na cavidade torácica de ratos

GRUPO	Edema Pleural (ml)		
	1h	5h	24h
Controle (veículo)	0.78 ± 0.07	0.80 ± 0.09	0.80 ± 0.11
OEPS (10 mg v/v)	1.15 ± 0.12 *	1.63 ± 0.13 * *	1.05 ± 0.11
Cg (1 mg)	1.03 ± 0.13	1.28 ± 0.17 *	1.17 ± 0.05 *

Os dados são expressos com média ± E.P.M. (n=6 animais/grupo)

* p < 0.05; ** p < 0.01 (Teste "t" de student)

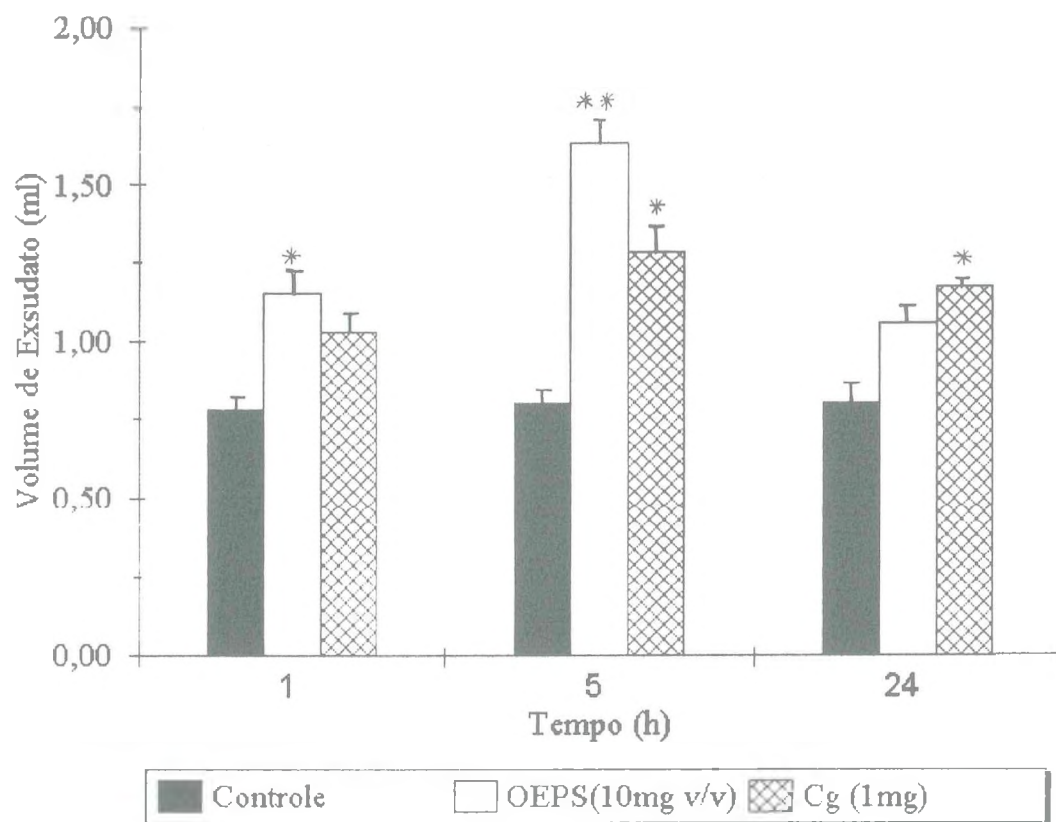


FIGURA 5 - Exsudação pleural induzida por injeção intratorácica de óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina (Cg) em ratos.

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo)

* p < 0,05; ** p < 0,001 (teste "t" de Student)

TABELA 4. Acumulação de leucócitos após injeção intratorácica do óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina (Cg) em ratos.

GRUPO	5h		24h	
	Neut.	Monon.	Neut.	Monon.
Controle (veículo)	87 ± 19	93 ± 27	13 ± 3	72 ± 8
OEPS (10 mg v/v)	751 ± 68 *	674 ± 49	49 ± 66*	2.518 ± 150
Cg (1 mg)	911 ± 165 *	1.035 ± 239	382 ± 72 *	1.889 ± 320

Os dados encontram-se expressos como média ± E.P.M. ($\times 10^3$ / ml)

n = 6 animais por grupo

* p < 0.01 (Teste "t" de Student)

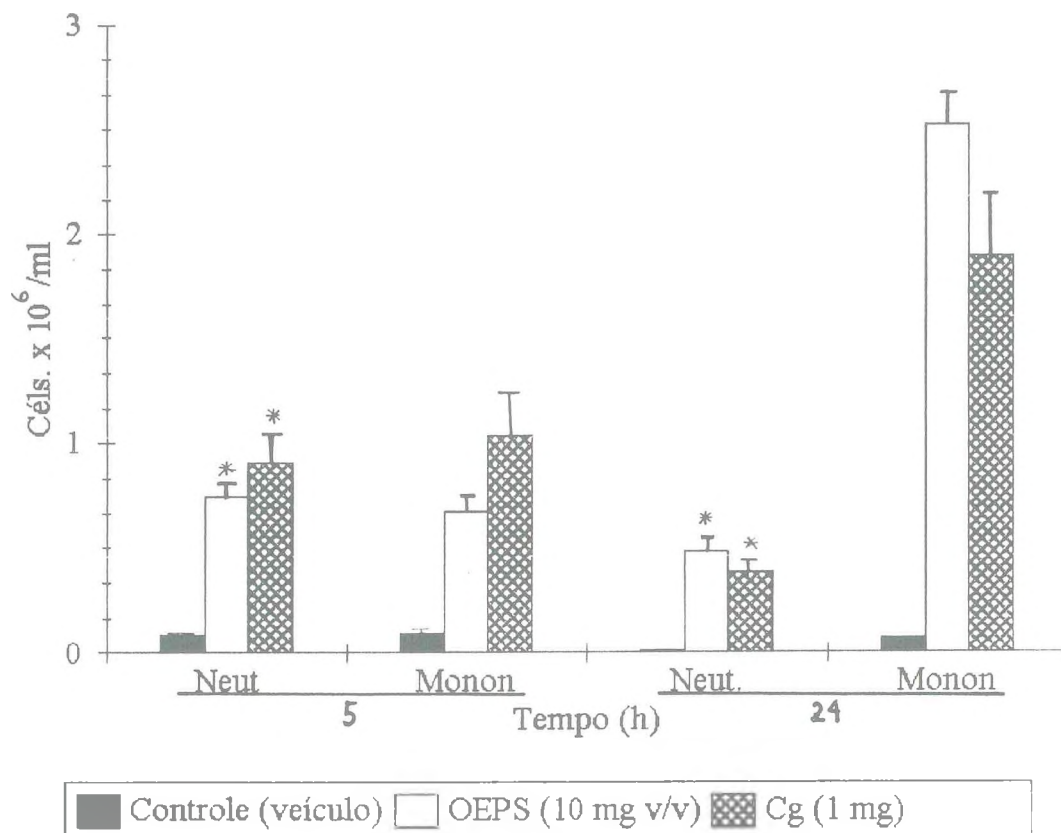


FIGURA 6 - Cinética da migração celular induzida pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina (Cg).

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo).

* p < 0,01 (teste "t" de Student)

4.3 . Lesão granulomatosa induzida por "pellets"de algodão impregnados com Óleo

Essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina em ratos.

Ambos, o OEPS (10mg v/v) e carragenina (1 mg), promoveram aumento representativo da formação do tecido granulamatoso, quando comparados ao grupo controle. O aumento do peso do granuloma úmido foi de maior índice de significância estatística ($P<0,001$) que o do granuloma seco ($P<0,01$). Em termos percentuais o aumento médio de peso do granuloma úmido e seco nos grupos tratados com OEPS e veículo foi correspondente a 88 e 58% e 88 e 57%, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com carragenina (tabela 5).

Os dados obtidos encontram-se representados na figura 7.

4.4. Efeito do Óleo Essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina na permeabilidade capilar na cavidade peritoneal em camundongos.

A tabela 6 e figura 8 comparam o efeito do OEPS e da carragenina na permeabilidade capilar peritoneal.

Neste experimento, tanto o OEPS quanto a carragenina promoveram aumento do extravasamento vascular. Os grupos que receberam OEPS nas doses de 5 e 10mg v/v, i.p. demonstraram valores médios de extravasamento vascular (759 ± 37 e 1.016 ± 40 mg) correspondentes a 64% e 85%, respectivamente, quando comparados aos tratados com carragenina na dose de 2mg,i.p. (1193 ± 26 mg).

TABELA 5. Comparação entre o óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina (Cg) no desenvolvimento de tecido granulomatoso em ratos

GRUPO	Peso do Granuloma (mg)	
	Peso Úmido	Peso Seco
Controle (veículo)	587 ± 33 (58%)	153 ± 10 (57%)
OEPS (10mg v/v)	887 ± 60** (88%)	208 ± 10* (88%)
Cg (1mg)	1.012 ± 84**	267 ± 26*

Os dados são expressos em termos de média ± E.P.M. (n=6 animais/grupo)

Os números entre parênteses representam percentuais de desenvolvimento do tecido granulomatoso em comparação a carragenina (Cg)

* p < 0,01;

* *p < 0,001 (teste "t" de Student)

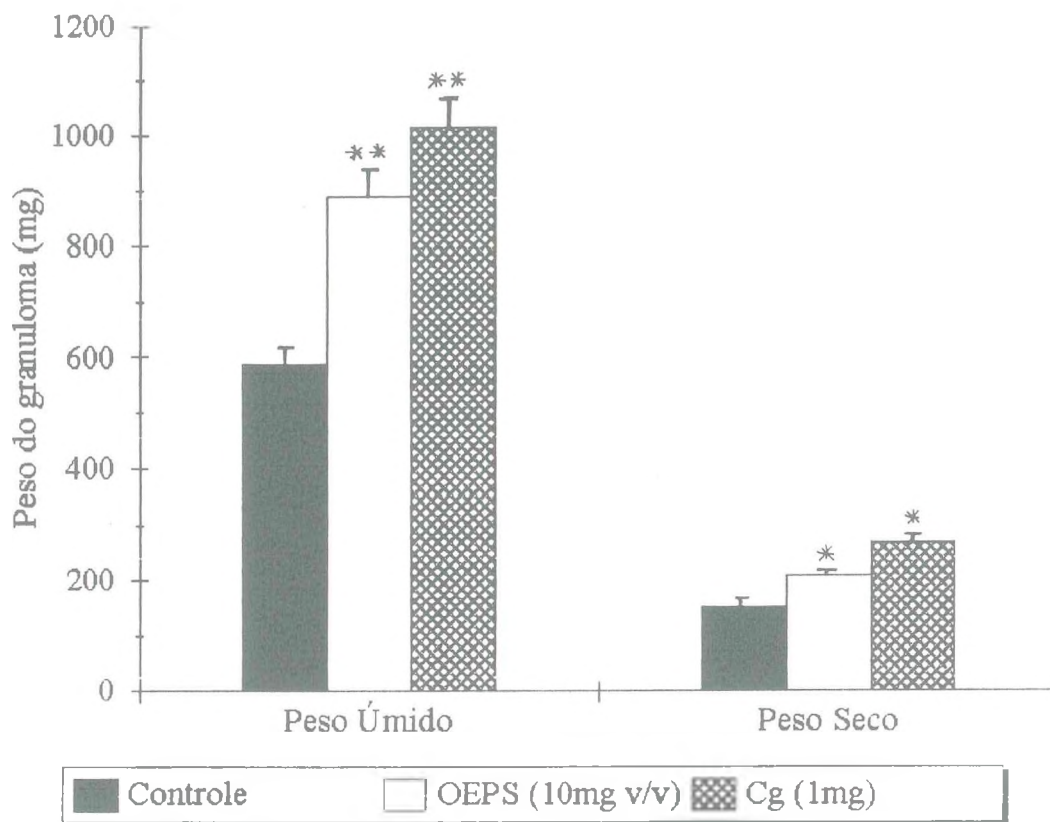


FIGURA 7 - Granuloma induzido por "pellets" de algodão impregnados com óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina (Cg) em ratos.

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 5 animais/grupo)

* p < 0,01; ** p < 0,001 (Teste "t" de Student)

TABELA 6. Exsudação peritoneal em camundongos tratados com óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) e carragenina (Cg).

GRUPO	DOSE	EXTRAVASAMENTO DO CORANTE(ug)	(%)
Cg	2mg, i.p.	1.193 $\pm$ 26	-----
OEPS	5mg v/v, i.p.	759 $\pm$ 37**	64
	10mg v/v, i.p.	1.016 $\pm$ 40*	85

Os resultados estão expressos em termos de média $\pm$ E.P.M. (n=6 animais/grupo).
Os valores percentuais representam a magnitude de extravasamento do corante em relação ao grupo tratado com carragenina (Cg.)

* p < 0,01

** p < 0,001 (teste "t" de Student)

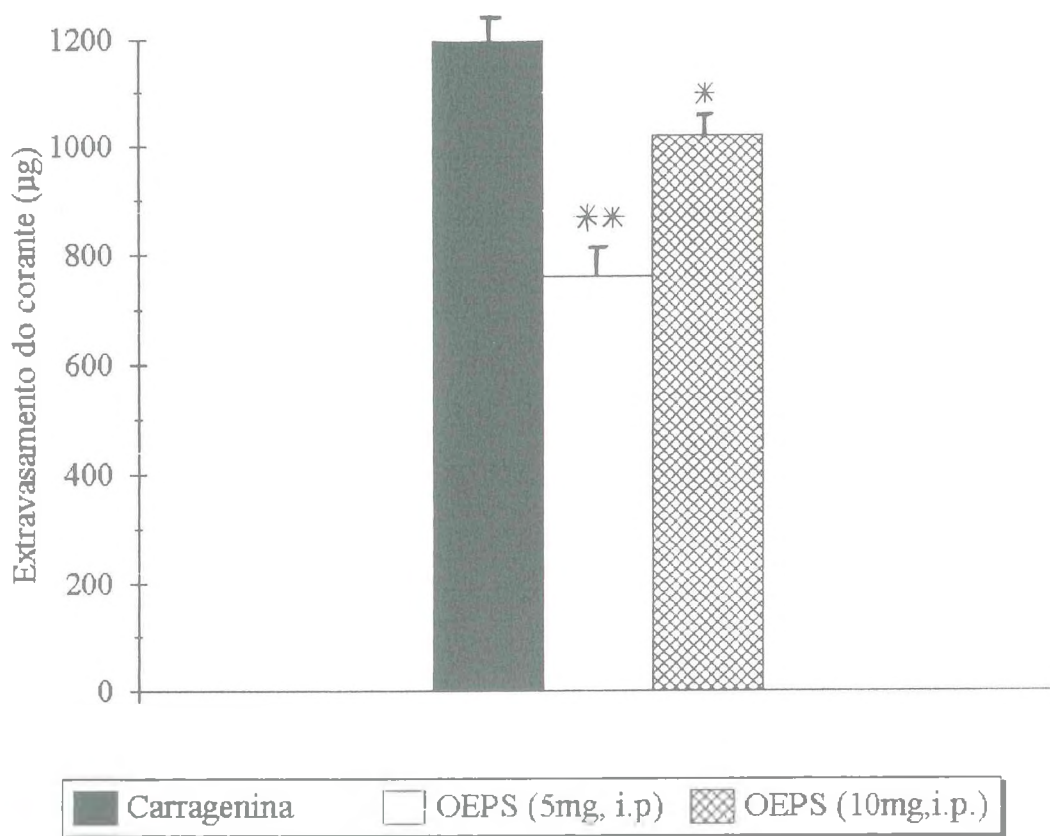


FIGURA 8 - Aumento da permeabilidade capilar peritoneal em camundongos promovido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) e carragenina.

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 5 animais/grupo).

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ (teste "t" de Student)

4.5. Participação de mediadores do processo inflamatório no modelo de edema de pata induzido pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos;

4.5.1. Efeito de drogas antagonistas da histamina e da serotonina sobre a atividade edematogênica do Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos;

A atividade de antagonistas histaminérgicos e serotoninérgicos sobre a reação edematogênica aguda induzida pelo OEPS encontra-se registrada na figura 9.

A clorfeniramina (10mg/kg, i.p.) não afetou o desenvolvimento do edema subplantar promovido pelo OEPS na dose de 5mg/pata, enquanto a metisergida (1mg/kg.p.o.) reduziu significativamente ($P<0,05$) o volume (ml) médio da pata apenas no período de 1 e 2 horas, o que representou uma inibição percentual de 25%, quando comparada ao controle.(Tabela 7).

4.5.2. Efeito de inibidores da ciclooxigenase e lipooxigenase no edema de pata induzido pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos;

Neste experimento o edema subplantar agudo promovido pelo OEPS (5mg/pata) foi reduzido significativamente ($P<0,05$) pela fenilbutazona (100mg/kg,p.o.) e pelo EP 10161 (20mg/kg,i.p.). No período de 3 horas , correspondente ao pico de reação edematogênica, a inibição percentual do edema foi de 25% e 65% para a fenilbutazona e o EP 10161, respectivamente, quando comparada ao grupo controle. No período de 24 horas o EP 10161 ainda demonstrou inibição significativa ($P<0,05$), o que corresponde a um percentual de 23% em relação ao controle (Tabela 8), enquanto a fenilbutazona somente produziu inibição estatisticamente representativa nos períodos 3, 4 e 5 horas.

Os resultados deste experimento encontram-se demonstrados na figura 10.

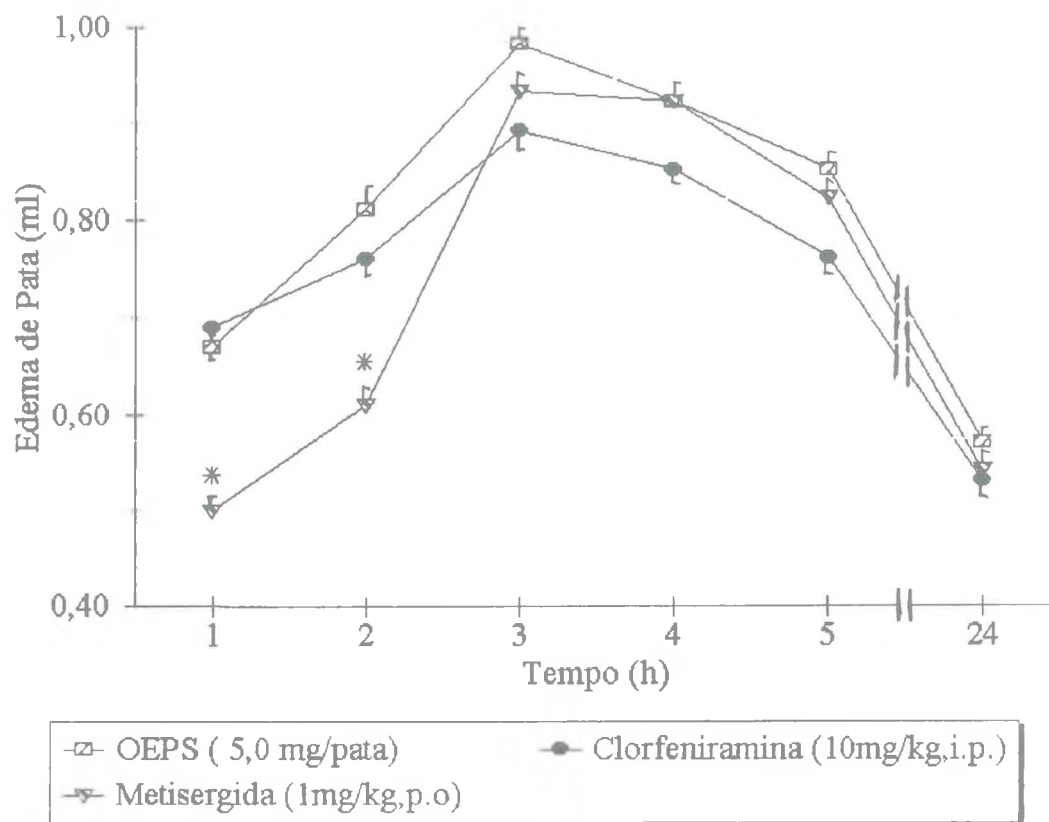


FIGURA 9 - Efeito inibitório de antagonistas histaminérgicos (clorfeniramina) e serotoninérgicos(metisergida) no edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos.

Todos os tratamentos foram realizados 1h antes da injeção do subplantar de OEPS(5mg v/v/pata).

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo)

* $p < 0,05$ (Análise de variância e teste "t" de Student)

TABELA 7. Inibição do edema subplantar promovido pelo óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) em ratos por antagonistas de histamina e serotonina.

GRUPO	Volume da pata (ml)	
	1h	2h
Controle (veículo)	0,67 ± 0.02	0.81 ± 0.06
Clorfeniramina (10 mg/kg,i.p.)	0,69 ± 0.04	0.76 ± 0.04 (6%)
Metisergida (1 mg/kg,p.o.)	0,50 ± 0.03* (25%)	0.61 ± 0.04* (25%)

Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n= 6 animais/grupo).

Os números entre parênteses representam os percentuais de inibição do edema em relação ao grupo controle.

* p < 0,05 (análise de variância e teste "t" de Student)

4.5.3. Efeito da dexametasona no edema subplantar em ratos produzidos pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS)

A dexametasona (0,5mg/kg,i.p.) promoveu inibição significativa ($P<0,05$) do volume (ml) da pata nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas quando, comparados ao grupo controle. No pico de reação edematogênica, a dexametasona demonstrou inibição de 65% do volume médio da pata. A inibição foi quase completa 86% ($0,08 \pm 0,04$) no período de 24 horas, em relação ao controle ($0,57 \pm 0,02$), de acordo com a tabela 8.

Os resultados obtidos estão sumarizados na fig. 11

4.5.4. Efeito da degranulação de mastócitos no edema de pata induzido pelo Óleo Essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos:

O composto 48/80 demonstrou inibição significativa ($P<0,05$ e $P<0,02$) do edema de pata somente nos períodos de 1 e 5 horas respectivamente, como registra a figura 11. No período de 1 e 5 horas, a inibição em termos percentuais foi de 31% e 28%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Tabela 9). Em 24 horas, os valores médios (ml) foram semelhantes ($0,56 \pm 0,07$ e $0,57 \pm 0,07$) nos dois grupos estudados, permanecendo ambos em torno de 50% do efeito máximo (3 horas).

TABELA 8. Inibição da resposta edematogênica subplantar induzida pelo óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) em ratos por inibidores da ciclooxygenase, lipooxygenase e dexametasona.

GRUPO	Volume da pata (ml)		
	1h	5h	24h
Controle (veículo)	0.67 ± 0.02	0.85 ± 0.03	0.57 ± 0.02
Fenilbutazona (100 mg/kg,p.o.)	0.60 ± 0.02 (10%)	0.63 ± 0.03* (26%)	0.48 ± 0.03* (16%)
EP 10161 (20mg/kg,i.p.)	0.55 ± 0.03 (18%)	0.49 ± 0.04* (42%)	0.44 ± 0.05* (23%)
Dexametasona (0.5mg/kg,i.p.)	0.46 ± 0.04* (31%)	0.23 ± 0.02* (73%)	0.08 ± 0.04* (86%)

Os valores são expressos como Média ± E.P.M. (n = 6 animais/grupo)

Os números entre parênteses representam o percentual de inibição do edema em relação ao grupo controle.

* p < 0.05 (Análise de variância e teste "t" de Student)

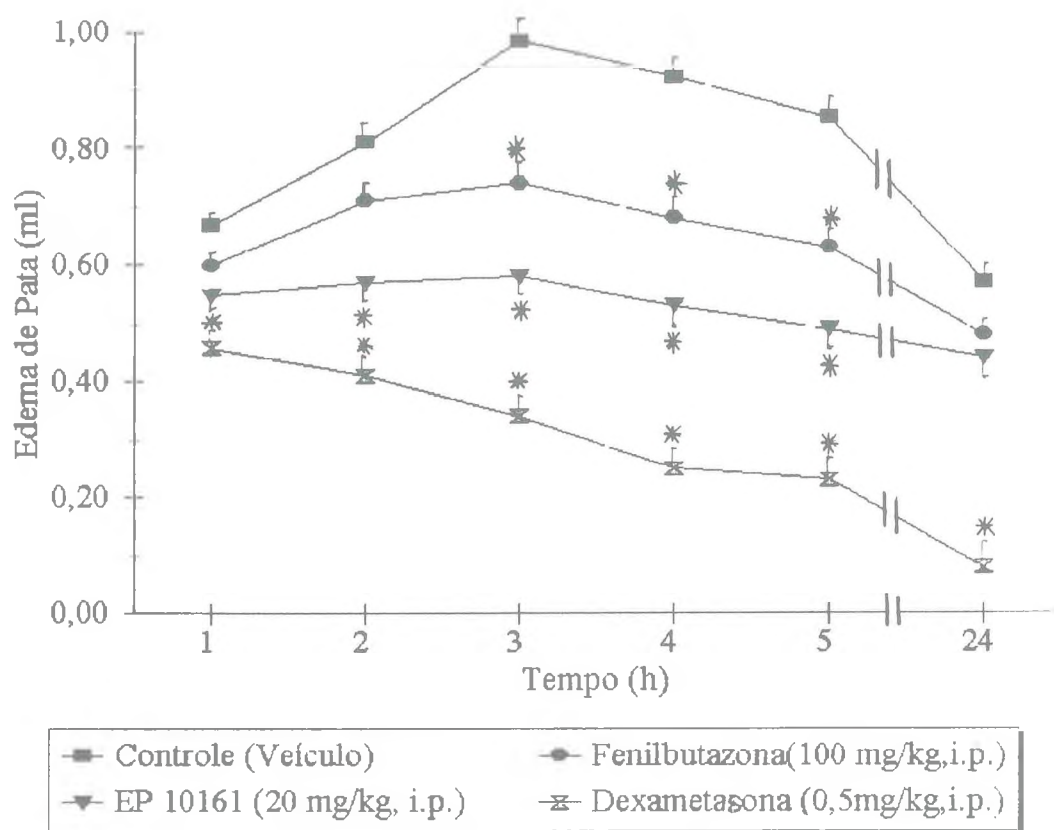


FIGURA 10 - Efeito de inibidores da ciclooxigenase (fenilbutazona), lipooxigenase (EP 10161) e dexametasona no edema subplantar promovido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos.

Todos os tratamentos foram feitos 1 hora antes da injeção subplantar de OEPS (5 mg v/v/pata).

Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo).

* $p < 0,05$ (Análise de variância e teste "t" de Student)

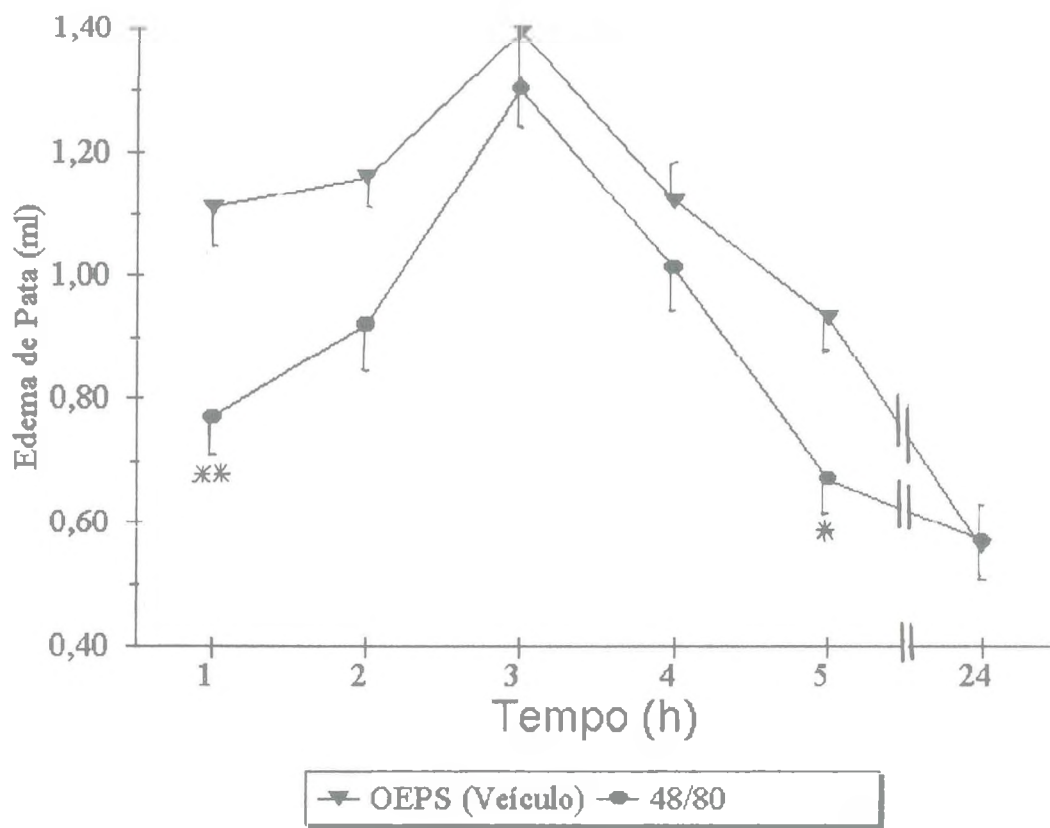


FIGURA 11 - Efeito do pré-tratamento com o composto 48/80 no edema de pata induzido pelo óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) em ratos. O composto 48/80 ou veículo (salina 2ml/kg) foram administrados durante 3 dias consecutivos (0,6mg/kg, i.p.) e no 4º dia (1,2mg/kg,i.p.), após período de 6h foi injetado o OEPS (5 mg v/v/pata). Os valores representam Média $\pm$ EPM (n = 6 animais/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,02 (teste "t" de Student)

TABELA 9. Inibição do edema subplantar promovido pelo óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) em ratos pelo composto 48/80.

GRUPO	Volume da pata (ml)		
	1h	5h	24h
Controle (veículo)	1.11 ± 0.11	0.93 ± 0.06	0.56 ± 0.07
48/80	0.77 ± 0.09** (31%)	0.67 ± 0.06* (28%)	0.57 ± 0.07

Os valores são expressos em termos de média ± E.P.M. (n=6 animais/grupo)

Os números entre parênteses representam o percentual da inibição do edema em relação ao grupo controle.

* p < 0.05; ** p < 0.02 (teste "t" de Student)

4.6. Estudo histopatológico

Feito o exame histopatológico, observaram-se alterações diferenciadas no decorrer do tempo:

Em 1h - Edema, congestão, infiltração neutrofílica moderada, inclusive em torno dos vasos, ao nível da derme.

Em 5h - Presença de bolhas sub-basais por destacamento da epiderme.

Intenso edema e infiltração neutrofílica na derme, com tendência ao aprofundamento da lesão.

Em 24 h - Edema pouco representativo, mas intensa infiltração de neutrófilos que se estende à fáscia e musculatura, na qual evidencia-se miólise.

A lesão organiza-se em planos com tendência a progressão.

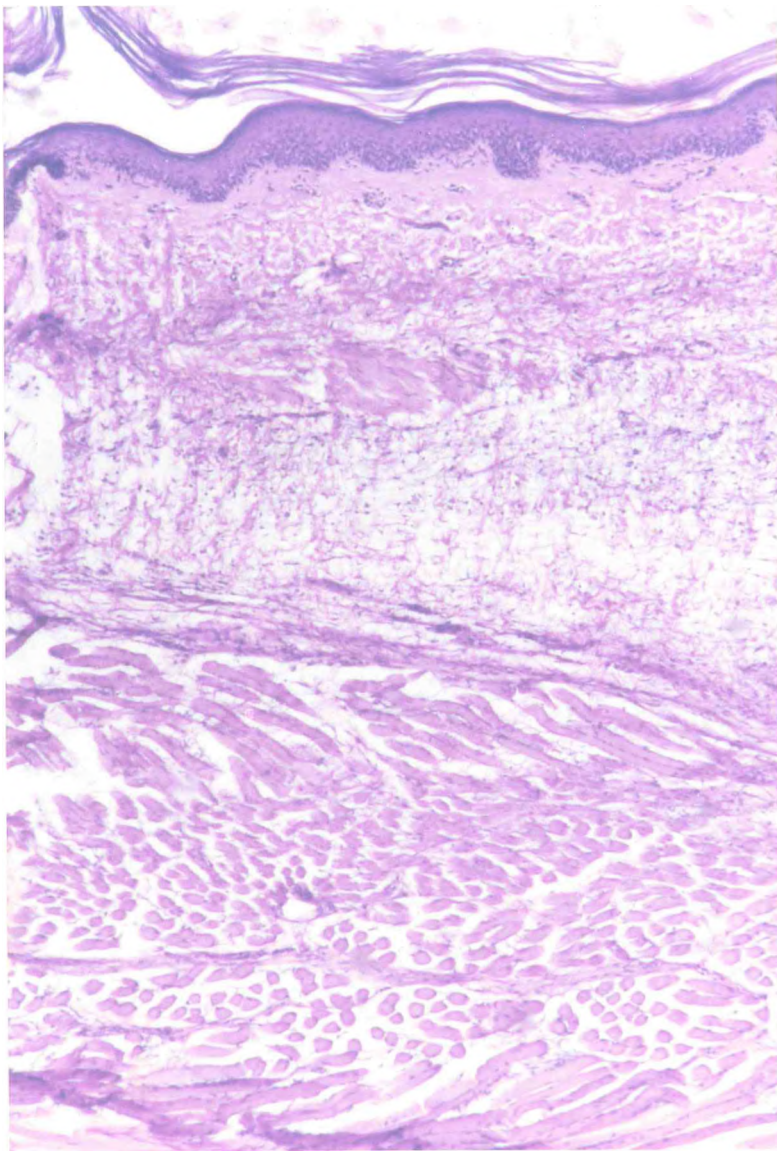


FIGURA 12.

Alterações histológicas na pata do rato no período de 1 hora após a injeção do OEPS (5mg/pata)

Coloração Hematoxilina Eosina

Objetiva 4 x Ocular 10

Fase inicial da reação inflamatória com presença de edema e infiltração neutrofílica moderados.

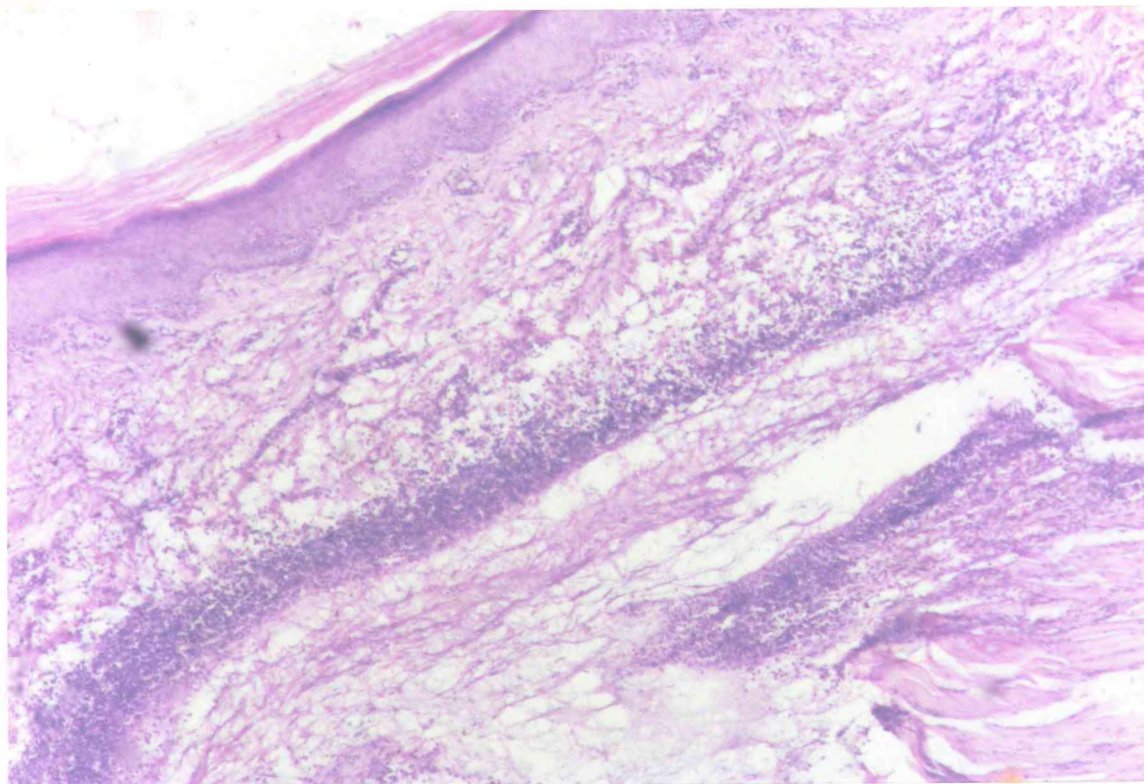


FIGURA 13

Alterações histológicas na pata do rato no período de 5 horas após a injeção do OEPS (5mg/pata)

Coloração Hematoxilina Eosina

Objetiva 10 x Ocular 10

Reação inflamatória com intenso edema e infiltração de neutrófilos.

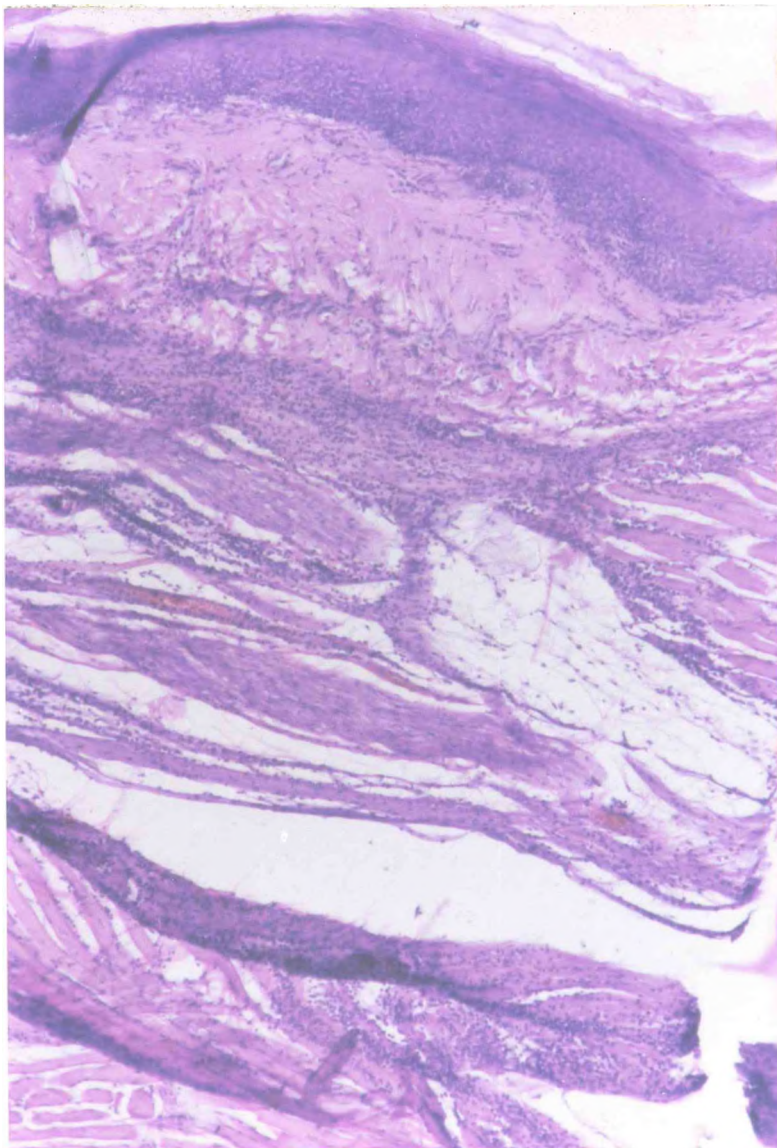


FIGURA 14

Alterações histológicas na pata do rato no período de 24 horas após a injeção do OEPS (5mg/pata)

Coloração Hematoxilina Eosina

Objetiva 4 x Ocular 10

Reação Inflamatória com edema reduzido, mas intensa infiltração neutrofílica à fáscia e musculatura. Lesão com tendência progressiva.

5- DISCUSSÃO

No presente estudo foram empregados os modelos de edema de pata, pleurisia e granuloma em ratos e permeabilidade capilar peritoneal em camundongos além de estudos histopatológicos, no intuito de investigar a ação pró-inflamatória potencial do óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS).

A inflamação representa uma resposta fisiológica multirregulada e multimodulada do tecido vivo a uma lesão de natureza mecânica, química ou infecciosa (GARCIA-LEME, 1981). Entretanto, se o processo inflamatório não for bem controlado pelo organismo pode ocorrer a geração de uma doença inflamatória, como a artrite reumatóide, hipersensibilidade, entre outras. A resposta inflamatória é denominada aguda ou crônica na dependência das respostas celulares e humorais que a acompanham. A resposta celular envolve a migração de leucócitos para os tecidos lesados. Assim, monócitos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos são recrutados com concomitante produção de mediadores solúveis, como os eicosanóides, citocinas, etc. A resposta humoral consiste na produção de anticorpos pelos linfócitos B, que se segue ao reconhecimento do antígeno por linfócitos T e macrófagos (WINROW et al, 1993).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da reação inflamatória são complexos e variam de acordo com a doença clínica e suas manifestações. Do mesmo modo, varia a ação das diferentes drogas antiinflamatórias empregadas em terapêutica. Consequentemente, tornou-se necessário o desenvolvimento de procedimentos que tornem possível a compreensão da dinâmica do processo inflamatório, possibilitando a descoberta de drogas mais eficazes para o tratamento das doenças inflamatórias. Assim, foram desenvolvidos uma multiplicidade de métodos para testar a atividade antiinflamatória

(WINTER, 1966). A atividade farmacológica dos antiinflamatórios não esteroidais (AINE), por exemplo, foi amplamente estudada em diversos modelos experimentais, os quais são considerados úteis para estabelecer a eficácia de tais drogas em humanos, tendo este tipo de correlação grande importância no delineamento dos estudos clínicos iniciais (LOMBARDINO, 1985). Um dos modelos experimentais que mais contribuiu neste sentido foi o edema subplantar promovido pela carragenina (WINTER et al, 1962). Estudos de OTTORNESS e GANS sugerem que o modelo de edema de pata induzido por carragenina mantém estreita correlação com o mecanismo dos AINE na artrite reumatóide (OTTORNESS e GANS, 1988), além disso WINTER e colaboradores demonstraram que os antiinflamatórios esteroidais são também capazes de inibir o edema promovido pela carragenina na pata do rato (WINTER et al, 1962).

Ainda na antiguidade, o romano CORNELIUS CELSUS descreveu os sinais cardiais da inflamação como calor, rubor, tumor e dor, aos quais VIRCHOW subsequentemente acrescentou, perda da função. Com base nestas observações ficou evidenciado que independentemente do estímulo inflamatório envolvido a sequência de eventos era similar, fato que sugeriu a possibilidade de que substâncias endógenas, os mediadores inflamatórios, pudessem ser responsáveis pela manifestação dos sinais descritos por CELSUS. A fim de caracterizar os mediadores inflamatórios Sir HENRY DALE propôs critérios semelhantes aqueles descritos por ele próprio quando descrevera a transmissão química nas sinapses autonômicas, tendo descrito pela primeira vez, juntamente com BARGER, as atividades biológicas da histamina, o primeiro mediador inflamatório, reconhecido (WILLOUGHBY, 1987; OWEN, 1987). Atualmente, sabe-se que a reação edematogênica subplantar promovida pela carragenina no rato é mediada por aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas e prostaglandinas (Di ROSA et al, 1971), sendo as atividades farmacológicas e interações entre os diversos mediadores complexas. Contudo, no contexto da reação inflamatória a histamina, atuando em receptores H_1 e H_2 (OWEN et al, 1980) e serotonina, atuando em receptores $5-HT_1$ e $5-HT_2$, principalmente (RANG e

DALE, 1993), produzem vasodilatação e aumento da permeabilidade na microvasculatura nas fases iniciais do processo. As cininas, como a bradicinina, atuam numa segunda fase do edema de pata. A bradicinina é um nonapeptídeo que demonstra potente ação vasodilatadora, aumento da permeabilidade venular e dor atuando em receptores B_1 e B_2 (REGOLI, 1987; REGOLI et al, 1990) sendo muitas de suas ações dependentes de endotélio (REGOLI, 1984) e mediadas por agentes endógenos - prostaglandinas, histamina e/ou serotonina e possivelmente renina e catecolaminas (REGOLI e BARABÉ, 1980). Na terceira fase da resposta edematogênica subplantar promovida pela carragenina, as prostaglandinas assumem importante papel, principalmente PGE_2 , mas também PGD_2 e PGI_2 , as quais promovem dilatação arteriolar diretamente (vasodilatação), causando eritema, além de hiperalgesia e aumento da permeabilidade venular agindo sinergicamente com cininas e aminas vasoativas, promovendo formação de edema (WILLIAN e MORLEI, 1973, FERREIRA, 1972; SALMON e HIGGS, 1987), VANE e outros, demonstraram que a inibição da biossíntese de prostaglandinas, pela inibição da ciclooxigenase, é responsável pelos efeitos antiinflamatórios dos AINE, notadamente aspirina e indometacina (VANE, 1971), e possivelmente também por muitos de seus efeitos colaterais (MONCADA e VANE, 1978).

A caracterização de uma substância como antiinflamatória ou pro-inflamatória deve, contudo, obedecer alguns critérios. Por exemplo, sabe-se que a carragenina, um reconhecido agente flogístico, quando administrada por via oral pode inibir o desenvolvimento do edema de pata do rato promovido pela própria carragenina, funcionando, assim, como uma substância antiinflamatória. Não é incomum, entretanto, que uma substância exiba ações pró-inflamatórias em certas condições experimentais, mas manifeste ação antiinflamatória em outras circunstâncias. RAMPAR e WILLIAMS (1986) demonstraram claramente que a injeção local de prostaciclina (PGI_2) aumenta o edema produzido por mediadores inflamatórios, mas administrada por via endovenosa, a PGI_2 reverte o efeito destes mediadores. Fato semelhante ocorre com alguns peptídios, como o

peptídio intestinal vasoativo (VIP), Neurotensina (NT), Fator liberador de corticotropina (CRF) e Calcitonina (SAID, 1991, RAUD et al, 1991; KARALIS et al, 1991). Tais discrepâncias resultam muitas vezes da influência da via de administração na hemodinâmica local (WEI e THOMAS, 1993). Certas substâncias, por exemplo, atuam em pontos diferentes do território vascular, promovendo vasodilatação ($\sim$ arteríolas) e outras vezes, diminuindo a permeabilidade vascular ($\sim$ vênulas) além do que, nos estudos "in vivo" algumas drogas que produzem intensa vasodilatação reduzem a pressão hidrostática necessária para produção de edema (BRAIN e WILLIAMS, 1988; GREGA e ADAMSKI, 1988). Ocorre também, controvérsias em relação aos efeitos das drogas antiinflamatórias de comprovada eficácia clínica em modelos animais. Os sais de ouro, reconhecidamente eficazes no tratamento da artrite reumatóide, não produzem efeito no edema de pata em ratos promovido pela carragenina (GOODWIN, 1984). Portanto, esforços são necessários com o objetivo de desenvolver novos modelos para caracterização de drogas antiinflamatórias.

O óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) é rico em metil-nonilcetona ($\sim$ 80%) e metil-undecilcetona ($\sim$ 10%), contendo, ainda, constituintes menores como terpenos e fenóis. Ambas as cetonas citadas são alifáticas saturadas, com propriedades irritantes, sendo utilizadas comercialmente como produto de base para a indústria de perfumaria. Os resultados do presente trabalho demonstram que o OEPS promove intensa reação edematogênica na região subplantar do rato. No intuito de caracterizar esta resposta foram empregados diversos antagonistas específicos. O pré-tratamento com um antagonista antihistamínico H_1 , clorfeniramina, não influenciou a reação edematogênica, enquanto a metisergida, um antagonista serotoninérgico $5-HT_2$, inibe significativamente a fase inicial da reação sugerindo a participação dos mastócitos locais através da liberação de serotonina na primeira fase da resposta edematogênica. Inúmeros autores destacam o importante papel da serotonina, em contraste com a histamina, como principal substância sintetizada e estocada nos mastócitos de roedores (GERSHON e ROSS, 1961; SPECTOR e WILLOUGHBY,

peptídio intestinal vasoativo (VIP), Neurotensina (NT), Fator liberador de corticotropina (CRF) e Calcitonina (SAID, 1991, RAUD et al, 1991; KARALIS et al, 1991). Tais discrepâncias resultam muitas vezes da influência da via de administração na hemodinâmica local (WEI e THOMAS, 1993). Certas substâncias, por exemplo, atuam em pontos diferentes do território vascular, promovendo vasodilatação (~arteríolas) e outras vezes, diminuindo a permeabilidade vascular (~vênulas) além do que, nos estudos "in vivo" algumas drogas que produzem intensa vasodilatação reduzem a pressão hidrostática necessária para produção de edema (BRAIN e WILLIAMS, 1988; GREGA e ADAMSKI, 1988). Ocorre também, controvérsias em relação aos efeitos das drogas antiinflamatórias de comprovada eficácia clínica em modelos animais. Os sais de ouro, reconhecidamente eficazes no tratamento da artrite reumatóide, não produzem efeito no edema de pata em ratos promovido pela carragenina (GOODWIN, 1984). Portanto, esforços são necessários com o objetivo de desenvolver novos modelos para caracterização de drogas antiinflamatórias.

O óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* (OEPS) é rico em metil-nonilcetona (~80%) e metil-undecilcetona (~10%), contendo, ainda, constituintes menores como terpenos e fenóis. Ambas as cetonas citadas são alifáticas saturadas, com propriedades irritantes, sendo utilizadas comercialmente como produto de base para a indústria de perfumaria. Os resultados do presente trabalho demonstram que o OEPS promove intensa reação edematogênica na região subplatar do rato. No intuito de caracterizar esta resposta foram empregados diversos antagonistas específicos. O pré-tratamento com um antagonista antihistamínico H_1 , clorfeniramina, não influenciou a reação edematogênica, enquanto a metisergida, um antagonista serotoninérgico $5-HT_2$, inibe significativamente a fase inicial da reação sugerindo a participação dos mastócitos locais através da liberação de serotonina na primeira fase da resposta edematogênica. Inúmeros autores destacam o importante papel da serotonina, em contraste com a histamina, como principal substância sintetizada e estocada nos mastócitos de roedores (GERSHON e ROSS, 1961; SPECTOR e WILLOUGHBY,

1964; PARRAT e WEST, 1958; DOUGLAS, 1985). A literatura revela ainda que a inibição da enzima ciclooxygenase não influencia o efeito da serotonina na indução do edema na pata do rato (WINTER, 1964), sendo provavelmente por esta razão que a fenilbutazona não afetou a fase inicial da reação edematogênica induzida pelo OEPS. Contudo, fenilbutazona, EP 10161 e dexametasona, inibidores da ciclooxygenase, lipooxygenase e fosfolipase A₂ respectivamente, demonstraram potente redução da fase tardia do edema subplantar induzido pelo OEPS, indicando a possível participação de eicosanóides como mediadores mais importantes nesta fase. Em termos de ordem de potência, a redução do edema foi maior com dexametasona que com o EP 10161, tendo este, por sua vez, apresentado maior efeito que a fenilbutazona. O fato de o efeito antiedematogênico do EP 10161 ter sido mais pronunciado que aquele de fenilbutazona sugere que os leucotrienos são mediadores mais importantes que as prostaglandinas neste modelo. É interessante salientar que o edema de pata no rato induzido pela carragenina, entretanto, envolve predominantemente a mediação das prostaglandinas (VINEGAR et al, 1987). A potente atividade anti-edematogênica da dexametasona observada no presente estudo, sugere que o OEPS pode promover ativação da enzima fosfolipase A₂ no endotélio vascular, com consequente liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidios de membrana. O metabolismo do ácido araquidônico através das vias da ciclooxygenase e lipooxygenase produz potentes mediadores inflamatórios denominados prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (De CLERCK et al, 1985; ZIPSER e LAFFI, 1985). Em face destas observações é razoável considerar que o edema de pata induzido pelo OEPS em ratos, envolve a participação de serotonina na fase inicial e eicosanóides, particularmente leucotrienos, na fase tardia.

No intuito de estudar a participação dos mastócitos locais na reação edematogênica subplantar promovida pelo OEPS, os animais foram tratados com um potente degranulador de mastócitos, o composto 48/80, uma poliamina obtida por polimerização da p. metoxifenetil-metolamina com o aldeído fórmico (PATON, 1951). Os estudos de LAGUNOFF e colegas (1983) evidenciaram que um mastócito completamente

diferenciado possui cerca de 500 a 1.000 grânulos, necessitando somente um estímulo apropriado para ocorrer liberação de seu conteúdo (histamina, serotonina, heparina, enzimas hidrolíticas, etc.) no tecido conjuntivo circundante, tendo sido também reconhecido que os mastócitos produzem diversos mediadores inflamatórios como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (SCHULMAN et al, 1981), enzimas como fosfolipase A₂ (MARTIN e LAGUNOFF, 1982), além de aminas vasoativas (RISLEY e WEST, 1953), podendo a biosíntese e/ou liberação destas substâncias ser moduladas por drogas antiinflamatórias esteroidais (SCHLEIMER et al, 1983). Os mastócitos são portanto, células do tecido conjuntivo altamente especializadas, as quais constituem um sistema capaz de responder a inúmeras substâncias estranhas através de diversos mecanismos (FOREMAN, 1981; ISHIZAKA, 1982; WINSLOW e AUSTEN, 1982). O presente estudo demonstra que o pré-tratamento com o composto 48/80 reduz significativamente o edema de pata induzido pelo OEPS, nas fase inicial (1h) e tardia (5h), não alterando o edema no período de 24 horas. O mecanismo através do qual o OEPS atua não está totalmente esclarecido, sabe-se entretanto, que a ação do composto 48/80 é secretagoga e não lítica (JOHNSON e MORAN, 1969), de modo que os mastócitos são degranulados provavelmente por exocitose, sem destruição celular. Assim o bloqueio pelo 48/80 da reação edematogênica sugere que o OEPS pode estimular a liberação de aminas vasoativas pelos mastócitos na fase inicial da reação, sem contudo, comprometer a integridade celular, modulando a função do mastócito na fase tardia de reação através da ativação da fosfolipase A₂ e/ou biossíntese de eicosanóides, possivelmente leucotrienos, como mostra o grande bloqueio pela dexametasona e EP 10161 neste período de tempo, tendo sido inclusive demonstrado por MARTIN e LAGUNOFF (1982) que a inibição da fosfolipase A₂ reduz a capacidade do mastócito de responder a diversas substâncias liberadoras de histamina, além das observações de SCHLEIMER (1985) de que no rato e camundongo o efeito protetor dos esteróides em modelos de reação anafilática pode dever-se a inibição da degranulação de mastócitos.

Os estudos histopatológicos revelaram um intensa exsudação no período inicial (1h), seguida por aumento progressivo da infiltração de neutrófilos (5 e 24h) após injeção intraplantar do OEPS. No modelo de pleurisia experimental, também foi constatado aumento do volume de exsudato pleural, além de significativa migração de neutrófilos e mononucleares nos períodos de 5 e 24 horas, provocada pelo OEPS. Assim, constata-se um aumento relativamente rápido no volume do exsudato nas cavidades corporais e espaço intersticial da pata dos animais tratados com OEPS. Entretanto em ambos os locais a infiltração neutrofílica e o aumento mais intenso na formação do exsudato são manifestações mais tardias da ação do OEPS, como também ocorre com a reação promovida com a carragenina (VINEGAR et al, 1976), sendo descrito ainda que o aumento de permeabilidade vascular e a migração celular são eventos independentes, podendo ser inibidos por drogas que inibem a ciclooxigenase e lipooxigenase (HIGGS et al, 1979), respectivamente. Estes resultados, analisados em conjunto, fornecem evidências da participação de prostaglandinas e fatores quimiotáticos no aumento de permeabilidade capilar e migração celular pelo OEPS em ratos de modo similar a carragenina (KATORI et al, 1978). Sabe-se que o recrutamento de leucócitos para a área inflamada pode favorecer a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para o desenvolvimento do quadro inflamatório (JACOBSON e JACOBS, 1992), tendo sido demonstrado que os leucotrienos, particularmente o leucotrieno B₄, um produto derivado da ação catalítica da 5-lipooxigenase sobre o ácido araquidônico (YOSHIMOTO et al, 1983), está envolvido na quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (PIKE et al, 1990), além de componentes derivados da ativação do sistema complemento como C_{5a} e C_{3a}, por exemplo (HUGLI e MULLER-EBERHARD, 1978; GORSKI et al, 1979). Também têm sido descrito que as ações antiinflamatórias das drogas esteroidais (BISHOP et al, 1968) e não esteroidais (VINEGAR et al, 1976; Di ROSA, 1972) dependem direta ou indiretamente da inibição da migração celular para a área lesada (GARCIA LEME et al, 1977). Foi evidenciado, ainda, que a injeção intraperitoneal do OEPS promove intenso extravasamento do corante azul de Evans na cavidade peritoneal

de camundongos no período de 1 hora, de modo similar a carragenina. Tendo em vista que o corante liga-se seletivamente a proteínas plasmáticas, e levando-se em conta a presença de células sanguíneas em grande número, o acúmulo de líquido evidenciado na cavidade peritoneal promovido pelo OEPS, e possivelmente na cavidade torácica e na pata dos animais tem as características de um típico exsudato inflamatório.

A maior parte das doenças inflamatórias em humanos é de natureza sub-aguda ou crônica, de modo que o desenvolvimento de modelos que tornem possível compreender melhor a fisiopatologia desse processo está tornando-se cada vez mais necessário, como é o caso dos estudos experimentais de poliartrite em ratos induzida pelo adjuvante completo de FREUND. A formação do tecido granulomatoso em ratos através da implantação subcutânea de pellets de algodão, tem sido amplamente utilizado como modelo de inflamação sub-aguda para triagem de drogas antiinflamatórias (WINTER, 1966). O crescimento do granuloma pode ser estimulado pela impregnação de "pellets" de algodão com agentes irritantes como a carragenina e terebintina.(ATKINSON et al, 1962; MEIER, 1950). No presente estudo, os "pellets" de algodão impregnados com OEPS promoveram desenvolvimento significativo do tecido granulomatoso, quando comparado aos "pellets" sem irritante, não havendo diferença representativa entre a ação do OEPS e carragenina nas doses aqui empregadas. O mecanismo preciso envolvido na formação do granuloma não é conhecido. É possível, contudo, que o OEPS, a semelhança com carragenina possa estimular o crescimento do tecido de granulação por interferir no recrutamento de células sanguíneas e/ou com a proliferação local de macrófagos, uma célula que tem papel central na inflamação sub-aguda e crônica em virtude de sua imensa capacidade de síntese de compostos biologicamente ativos, tais como mediadores inflamatórios, enzimas e fatores de crescimento, todos contribuindo de maneira complexa para a progressão da lesão tecidual (ROBINS e COTRAN, 1983)

O OEPS demonstrou efeitos pró-inflamatórios altamente reproduzíveis em vários ensaios farmacológicos de comprovada credibilidade, não produzindo efeitos tóxicos

ou colaterais aparentes no decorrer dos estudos experimentais nas doses e vias empregadas, tornando-se um candidato atrativo como instrumento farmacológico para pesquisa de drogas antiinflamatórias. Os mecanismos envolvidos na geração dos efeitos pró-inflamatórios observados com o OEPS não estão totalmente esclarecidos. Portanto, estudos posteriores serão necessários no intuito de analisar parâmetros bioquímicos a partir do exsudato inflamatório e a função das células residentes na mediação dos fenômenos inflamatórios promovidos pelo OEPS, bem como caracterizar farmacologicamente a atividade pró-inflamatória potencial de seus principais constituintes metil-nonilcetona e metil-undecilcetona.

6. CONCLUSÕES

- 1- O estudo demonstrou que o óleo essencial de Pilocarpus spicatus (OEPS) possui atividade pró-inflamatória, promovendo edema de pata, pleurisia e desenvolvimento do tecido granulomatoso em ratos, bem como aumento da permeabilidade capilar peritoneal em camundongos, de maneira similar a carragenina.
- 2- A participação dos mastócitos e neutrófilos polimorfonucleares é, provavelmente, importante no contexto da ação pró-inflamatória do OEPS.
- 3- O potente efeito inibitório da dexametasona no edema subplantar promovido pelo OEPS sugere o envolvimento da fosfolipase A₂ e metabolismo do ácido araquidônico no mecanismo de ação pró-inflamatória do OEPS.
- 4- As evidências experimentais sugerem que as propriedades pró-inflamatórias do OEPS envolvem serotonina e leucotrienos, em contraste com as ações da carragenina, que são mediadas predominantemente pelas prostaglandinas.
5. É possível que o OEPS seja útil como instrumento para pesquisa experimental visando o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias e/ou antiartríticas mais seletivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.P.; BAYER, B.M., HORAKOVA, Z, BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: Studies with carrageenin-induced inflammation in rats. **J. Pharmacol Exp. Therap.** , v.,214;p. 74-79, 1980.
- ANDRADE-NETO, M. Contribuição ao conhecimento químico do gênero *Pilocarpus*: *P. spicatus* St. Hill e *P. trachyllophus* Holmes (Mestrado), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, 1990.
- ARRIGONI-MARTELLI, E. SCHIATTI, P. , SELVA, D. the influence of anti-inflammatory and immunosuppressant drugs on Nystatin-induced oedema. **Pharmacology**, v. 5; p.215-224, 1971.
- ATKINSON, R.M.; JENKINS, L. , TOMICH, E.G., WOOLET, E.A. The effect of some anti-inflammatory substances on carrageenin-induced granuloma. **J. Endocrinol.** v.25;P.85, 1982.
- BISHOP, C.R. , ATHENS, J.W., BOGGS, D.R., WARNER, H. R., CATWRIGHT, G.E. et al. Leukokinetic Studies XII. A non steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. **J. Clin Inv.** v. 47, p.249-260. 1968.
- BLUMBERG, P.M. Protein kinase C as a receptor for the forbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads memorial award lecture. **Cancer Res.** v.48., p.1-8, 1988.

- .BRAGA, R.A. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**, Mossoró, ESAM, 1960.
- .BRAIN, S. D., WILLIAMS, T.J. Neuropharmacology of peptides in the skin. **Semin. Dermatol**, v.7, p.278-283, 1988.
- .CERRUZI, F. , ABRAHAM, A.A. El aceite esencial de atamisqui (*Atamisquia emarginata*, M.) e su poder antiseptico. **Rev. Fac. Ciens. Med. Univ. Nac. Cordoba**, v.40; p.10-25, 1982.
- .CHUNKHORN, P., MEACOCK, S.C.R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **Br.J. Pharmacol.**, v.42; p.392-402, 1972.
- .COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. São Paulo: Blucher, p.108-115, 1978.
- .CRAVEIRO, A.A., FERNANDES, A.G. ANDRADE, C.H.S., MATOS, F.J.A., ALENCAR, J. W. MACHADO, M.I.L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza-CE., Imprensa Universitária, UFC, 1981.
- .CREWS, P. Bio-active monoterpenes from red seaweeds. **Phytochemistry**, v. 23, p.1449-1451, 1984.
- .CRUZ, T., CABO, M.M., JIMINEZ, J.Z . Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata* -II spasmolytic activity.**Fitoterapia** v.61; p.247-251, 1990).
- .De BLASI, V., DEBROT, S., MENOUD, P.A., GENDRE, L., SHOWING, J. Amoebicidal effect of essential oils "in vitro". **J. Toxicol. Clin. Exp.** v.10: p.361-373, 1990.

- .De CLERCK, F. , LOOTS, W., SOMERS, Y., VAN GORP, L., VERHEYEN A., WOUTER, L. Thromboxane A₂-induced vascular endothelial cell damage and respiratory smooth muscle contraction: : inhibition by flunarizine, A Ca²⁺-overload blocker. **Arch. Int. Pharmacodyn Ther.** v.274:p.4-24, 1985.
- .Di ROSA, M. Biological properties of carrageenin. **J. Pharm. Pharmacol**, v.24, p.89-102, 1972.
- .Di ROSA, M. GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine, **J. Path**, v.104; p.15-29, 1971.
- .Di ROSA, M. , SORRENTINO, L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat , **Br. J. Pharmacol**, v.38, p.214-220, 1970.
- .DOUGLAS, W.W. Histamina, 5- hidroxitriptamina e seus antagonistas. In: GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S., RALL, T. W., MURAD, F. (orgs): **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Ed. Guanabara, 1985.
- .ELISABETSKY, E. New directions ind ethnopharmacology. **J. Ethnobiol.**, v.6; p.121-128, 1986.
- .EHRlich, P.R., RAVEN, P.H. Butterflies and plants, a study in co-evolution. **Evolution**, v.18; p.586-608, 1965.

- ERCAN, Z.S.; EREN, S., ZENGIL,, H., TURKER, R.K. Possible involvement of eicosanoids in alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema and alteration of angiotensin-converting enzyme activity. **Pharmacology**, v.46:p.274-280. 1993.
- FARNSWORTH, N.R. Medicinal plants in therapy. **Bull WHO**, v.63: p.965-981. 1985.
- FERNANDES, A.A., ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A., CRAVEIRO, A.A., ANDRADE, C.H.S., FONTELES, M.C., VIANA, G.S.B., CAPELO, F.F., MATOS, F.F. Canelas Silvestres Nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. **V Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, São Paulo, 4 a 6 de setembro de 1978.
- FERREIRA, S.H. Aspirina X Dor. Como funcionam estas drogas. **Ciênc. Hoje**, v.3:p56-62, 1985.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin - like drugs and analgesia. **Nature**, v.240:p.200-203, 1972.
- FOREMAN, J.C. The pharmacological control of immediate hypersensitivity. **Ann Rev. Pharmacol.** v.21: p.63-81, 1981.
- FORSTER, S.J. , McCORMICK, M.E., HOWARTH, A., AKED, D. Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by Leucotriene B4. **Biochem, Pharmacol.**, v.35:p.1709-1717, 1986.
- GARCIA-LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation, new aspects of autopharmacology. **Br. J. Pharmacol.** 12:15.24, 1981.

.GERSHON M.D., ROSS, L.L. Studies on the relationship of 5-hydroxytryptamine and enterochromaffin cell to anaphylactic shock in mice. **J. Exp. Med.**, v.115: 367-382,1961.

.GOODWIN, J.S. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory agents. **Am. J. Med.** v.77: p.790-795, 1984.

.GORSKI, J. P., HUGLI, T.E., MULLER-EBERHARD, H.J. C₄a: The third anaphylatoxin of the human complement system, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76:p.5299-5302, 1979.

.GOTTLIEB, O.R. Evolução química vegetal, **Cienc. Cult.**, v.39: p.357-360, 1987.

.GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A.C. A importância dos produtos naturais para o homem. **II Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de produtos naturais**, 1983.

.GOTTLIEB, O.R., SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Cienc. Cult.** v.39:p.707-717, 1987.

.GREGA, G.J. , ADAMSKI, S.W. The role venular endothelial cells in the regulation of macromolecular permeability. **Microcirc. Endothelium Lymphat.**, v.4:p.143-167, 1988.

.GU, W.Z., DENG, L.J. Studies on the chemical constituents of the essential oils in the seed of *Lactuca setiva* L.and its diuretic action. **Chung. Yao Tung. Pao**, v. 12:p.33-35, 1987.

- .GUYTON, K.Z., KENSLER, T.W. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **Brit Med. Bull.** v.49, p.523-544, 1993.
- HAAGEN-SMITH, A. J. The Chemistry, origin and function of essential oils in plant life. In: GUENTER, E. **The Essential Oils**, v.1, Robert e. Krieger Publishing company, 1972
- .HEGNAUER, R. Verbreitung ätherischer Ole in pflanzenreich In: KUBECKA, K.A (Org.), **Verkommen und Analyphic Atherischer ole** ,Thieme, stuttgart, p.1-10, 1979.
- .HEROUT, V. Terpenoides in plants (volatile and nonvolatile) and their possible function, In: **INTERNATIONAL CONGRESS ESSENTIAL OILS**, 7, KIOTO, pP.75-80, 1977.
- .HIGGS, G.A., FLOWER, R. J., VANE, J.R. A new approach to anti-inflammatory drugs. **Biochem, Pharmacol.**, v.28:p 1959-1961, 1979.
- .HUGLI, T.E., MULLER-EBERHARD, H.J. Anaphylatoxins: C_{3a} and C_{5a}. **Adv. Immunol.** v.26:p.1-53, 1978.
- .HURLEY, J.V., KATHRYN, N.H., RYAN, G.B. The Mechanism of delayed prolonged phase of increased vascular permeability in mild thermal injury in the rat. **J. Pathol Bacteriol** . v.94:p.1-12, 1967.
- .HUXTABLE, J.R. A disappearing history of healing. **TIPS**; v.12: p.236-237, 1991.
- .ISHIZAKA, T. Biochemical analysis of triggering signals induced by bridging of IgE-receptor. **Fed. Proc.**, v.41:p.17-21, 1982.

- JACOBSON, P. B., JACOBS, R.S. Fuscoidin: An anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. Part. I. Physiological and Biochemical studies in murine inflammatory models. **J. Pharmacol Exp. Therap.** v.262: p.866-873., 1992.
- JACOBSON, P.B. , JACOBS, R.S. Fuscoidin: An anti-inflammatory marine natural product which selectively, inhibits 5-lipoxygenase. Part II: Biochemical studies in the human neutrophil. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.262: p.874-p882, 1992.
- JANSEN, A.M. SCHEFFER, J.J., BAERHEIN-SVENDSEN, A antimicrobial activity of essential oil; a 1976-1986. Literature Review. **Planta Med.** V.53:p.395-398, 1987.
- JOHNSON, A.R., MORAN, N. C. Selective release of histamine from rat mast cell by compound 48/80 and antigen. **Am. J. Physiol.** v.216:p.453-459, 1969.
- KAASTRA, R.C. Pilocarpinae. Monograph number 33. **Flora Neotropica**. Ed. by the New York Botanical Garden., 1982.
- KARALIS, K., SANA. H., REDWINE, J., LISTWAK, S., WILDER, R. L. et al. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone "in vivo". **Science.** v.-254: p.421-423, 1991.
- KATORI, M., IKEDA, K., HARADA, Y., UCHIDA, Y. , TANAKA, K. OH-SHI, S. A possible role of prostaglandins and bradykinin as a trigger of exudation in carrageenin-induced rat pleurisy. **Agents Actions**, v.8: P.108-112, 1978.

- LAGUNOFF, D., MARTIN, T.W. , READ, G. Agents that release histamine from mast cells. **Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.** V. 23:p.331-351, 1983.
- LEE, M. , ALDRED, K., LEE, E. , FELDMAN, M. Aspirin-induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil-dependent process in rats. **Am J. Physiol.**v.263:p.g920-g926, 1992.
- LEMOS,T.L.G., MATOS,F.J.A., ALENCAR,J.W., CRAVEIRO,A.A,CLARK,A.M.,McCHESNEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants.**Phytother Res.** V.4: p.82-84, 1990.
- LEWIS. G.P. Introduction In: **Mediators of Inflammation.** WRIGTH, Bristol, p.2-4, 1986.
- LOMBARDINO, J.G. In **Nonsteroidal antiinflammatory drugs.** Lombardino, J.G. (Ed.) by John Wiley and sons: new York, NY, 1985.
- LORENZETTI, B.B., SOUZA, G.E, SARTI, S.J., SANTOS FILHO, D.,FERREIRA,S.H.Myrcene mimics the pheripheral analgesic activity of lemongrass tea, **J. Ethnopharmacol**, v.34: p.43-48, 1991
- MATOS, F. J. A. Plantas medicinais brasileiras - Um desafio para nossos químicos orgânicos. **Desafio, Revista de Extensão**, v.3: p.5-12, 1990.
- MATOS,F. J. A. Informação pessoal, 1991.

- .MARTIN, T.W., LAGUNOFF, D. Rat mast cell phospholipase A2: Activity towards exogenous phosphatidylserine and inhibition by (7-nitron-2,1,3 - benzoxadiazol - 4- yl) phosphatidylserine. **Biochemistry**. v.21:p.254-260, 1982.
- .MAX , B. This and that: the essential pharmacology of herbs and spices. **TIPS**, v.13: p.15-20,1992.
- .MAYASAKA, K., MIKAMI, T. Comparison of the anti-inflammatory effects of dexamethasone, indomethacin and BW-755 on carrageenin - induced pleurisy in rats. **Eur. J. Pharmacol.**; v.77: p.229-236, 1982.
- .MEIER, R. Antihistamine agents in allergy: antistine and related imidazolines. **Ann New York Acad. Sci**, v.50: p.1161-1176, 1950.
- .MENEZES, A.M., ALMEIDA, F.R.C., RAO, V.S.N., MATOS, M. E. O. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. **Fitoterapia**, v.61: p.252-254, 1990.
- .MILLER, S. L., ORGEL, L.E. **The origins of life on Earth**. Englewood Cliffs., Prentice-Hall, p.91, 1974.
- .MILLER, R.A., TU, A.T. Factors in snake venoms that increase capillary permeability. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.41: p.7922-794, 1989.
- .MONCADA, S., VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and Prostacilin. **Pharmacol. Rev.** v.230: p.293-331, 1978.

- MURAY, M. D., BRATER, D.C. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol** , v.32:p.435-465, 1993.
- NAGEL, VON M., REINHARD, E. Das Ätherisöl der calluskulturen von *Ruta graveolens* L. **Planta Méd.**, v.27: p.151-158.
- NWAIWN, J. I., AKAH, P.A. Anticonvulsant activity of the volatile oil from the fruit of tetrapetala. **J. Ethnopharmacol**, v.18: p.103-107, 1986.
- OKAMOTO, M., EPSTEIN, W.L., SUYA, H. KANAZASA, K., FUKUIAMA, K. Transfer of granulomatous inflammation with nonviable preparations of shistosoma granulomas in naive mice. **Exp. Cell. Biol.**, v.55: p.173-178, 1987.
- OTTORNESS, I.G., GANS, D.G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling. **J. Pharm. Sci.** ; v.77: p.790-795, 1988.
- OWEN, D.A.A. Inflammation - histamine and 5-hydroxytryptamine. **Brit. Med. Bull.** v.43: p.256-269, 1987.
- OWEN, D.A.A., POY, E., WOODWARD, D.F. Evaluation of the role of histamine H₁ and H₂ receptor in cutaneous inflammation in the guinea-pig produced by histamine and mast cell degranulation. **Br. J. Pharmacol.** v.9: p.615-623, 1980.
- PARRAT, J. R., WEST, G.B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, eggwhite and compound 48/80. **Br. Pharm. Chem.**, v.13: p.65-70, 1958.

- .PATON, W.D.M. Compound 48/80: a potent histamine liberator **Br. J. Pharmacol**, v.6: p.499-508, 1951.
- .PAULI, A., KNOBLOCH, K. inhibitory effects of essencial oil on growth of food-contaminating fungi. **Z. Lebensm Unders Forsh.** v.185: p.10-13, 1987.
- .PIKE, M.C., BRUCK, ME, ARNDT, C., LEE, C.S. Chemoattractants stimulate phosphatidylinositol-4phosphate Kinase in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Biol. Chem.** v.265: p.1873-1866, 1990.
- .PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol.IV, p.363, 1984.
- .RAMPART, M., WILLIAMS, T.J. Polymorphonuclear leukocyte dependent plasma leakage in the rabbit skin is enhaced or inhibit by prostacyclin, depending on the route of administration. **Am. J. Pathol**, v.124: p.66-73, 1986.
- .RANG, H.P., DALE, M.M. Hormônios locais, Inflamação e Alergia, In: **FARMACOLOGIA**, 2a edição, Guanabara-Koogan, 1993.
- .RAO, V.S.N., MENEZES, A.M.S., VIANA, G.B.S. Effect of myrcene on nociception in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** v.42: p.877-878.,1990.
- .RAUD. J., LUNDBERG, T., BRODDA-JANSEN, G., THEODORSSON, E., HEDQUIST, P. Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.180: p. 1429-1435, 1991.

.REGOLI, D. Neurohumoral regulation of precapillary vessels. The Kallikrein-kinin system.

J. Cardiovasc. Pharmacol. v.6: suppl.2: p.401-403, 1984.

.REGOLI, D. Kinins. **Brit. Med. Bull.**, v.43: p.270-284, 1987.

.REGOLI, D., BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, v.32: p.1-46, 1980.

.REGOLI, D., RHALEB, N.E., DION, S., DRAPEAH, G. New selective bradykinin receptor antagonist and bradykinin B₂- receptor characterisation. **TIPS**, v.11: P.156-161, 1990.

.RHOADES, D.F. Evolution of plant Chemical defense against herbivores. In G.A. Rosenthal e D.H. Jansen (Orgs). **Herbivores: their interaction with secondary metabolites**. Academic press, New York. p.3-54, 1979.

.RIBEIRO, M. N. S., ZOGHBI, M. G. B., SILVA, M. N., GOTTLIEB O.R., REZENDE, C.M. M. **Cadastro Fitoquímico Brasileiro**, Manaus. p.70, 1970.

.RISLEY, J. F., WEST, G.B. The presence of histamine in tissue mast cell. **J. Physiol.** v.120, p.528, 1953.

.ROBINS, S.L., CONTRAN, R.S. Inflamação e Reparo. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. 2ª Ed. Rio de Janeiro, Interamericana, cap.3, p.47-89, 1983.

- ROSSI T., MELEGARI, M., BIANCHI, A., ALBASINI, A., VAMPA, G. sedative, anti-inflammatory and anti-diuretic effects induced in rats by essential oils of varieties of *Anthemis nobilis*: a comparative study. **Pharmacol. Res, Commun**, vol.5 suppl.20: p. 71-74, 1988.
- SAID, S.I. Neuropeptides (VIP and Tachykinins); VIP as a modulator of lung inflammation and airway constriction. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.143: p.522-524. 1991.
- SALMON, J.A., HIGGS, G.A. Prostaglandins and leucotrienes as inflammatory mediators. **Br. Med. Bull.**, v.43: p.2285-296, 1987.
- SAUDER, D.N. Interleukin I. **Arch. Dermatol.**, v.125: p.679-682, 1989
- SCHLEIMER, R.P. The mechanism of antiinflammatory steroid action in allergic diseases. **Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.** v.25: p.381-412, 1985.
- SCHLEIMER, R.P., SCHULMAN, E.S., Mac GLASHAN, D.W.Jr., PETER, S.P., HAYES, E.C. et al. Effects of dexamethasone on mediator release from human lung mast cell. **J. Clin. Invest.** v.71: p.1830-1835, 1983.
- SCHULMAN, E.S., NEWBALL, H.H., DEMERS, L.M., FRITZPATRIC, P.A., ADKINSON, N.F. Jr. Anaphylactic release of thromboxane, A₂, prostaglandin D₂ and prostacilin from human lung parenchyma. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.124: p. 402-406, 1981.

- .SILVA, J.C.R., RAO, V.S.N. Involvement of serotonin and eicosanoids in the rat paw oedema response to the essential oil of *Pilocarpus spicatus*. **Mediators Inflammation**, v. 1: p.167-169, 1992.
- .SILVA, M.R. Antiálgicos e Antiinflamatórios. In: **Fundamentos da Farmacologia e suas aplicações a terapêutica**. Edt. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 1961. p.327-346, 1961.
- .SIMÕES, E.R.B., MOTA, L.L., VIANA, G.S.B., JOVENTINO, F. P. Efeito edematogênico de carrageninas extraídas de algas do litoral nordestino. **Rev. Bras. Farm.**, v.72: p.64-66, 1991.
- .SOLOMON. L. M., JUHLIN, N., KIRSCHENBAUM, M.V. Prostaglandins on cutaneous vasculature. **J. Invest. Derm.** v.51: p.280-282, 1968.
- .SPECTOR, W.G., WILLOUGHBY, D.A. Vasoactive amines in acute inflammation. **Ann N.Y. Acad. Sci.**, v.116; p.839-846, 1964.
- .SVENJO, E. The hamster cheek pouch as a model in microcirculation research. **Eur. Respir. J.** v.3: p.595-601, 1990.
- .SWAIN, T. Tannins and lignins. In Rosenthal, G. A. Janzen, D U. (orgs). herbivores: Their interaction with secondary metabolites. **Academic Press. New York**, p.657-682, 1979.
- .SWANDULLA, D., CARBONE, E., SCHAFFER, K., LUX, A.D. Effects of mentol on two types of Ca^{++} currents in cultured sensory neurons of vertebrates. **Pflügers Arch.** v. 409, p.52-52, 1987.

- .VANE, J.R. Inhibition of prostaglandins synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New. Biol.** v.231: p.232-239, 1971.
- .VANE, J.R. Prostaglandins in the inflammatory response. In: LEPOW, I. H. ; WARD, P.A. (Eds). **Inflammation: Mechanism and control.** New York: Academic Press, p.261-279, 1972.
- .VILAR, A., RECIO, M.C., RUOS, J.H., ZAFRA-POLO, M.C. antimicrobial activity of essential oils from Sidert species. **Pharmazie**, v.41: p.298-299, 1986.
- .VINEGAR, R., TRUAX, J.R., SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenin inflammation. **Fed. Proc.** v.35: p.2447-2454, 1976.
- .VINEGAR, R., TRUAX, MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenin-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed. Proc.** v.46: p.118-126, 1987.
- .VINEGAR, R., TRUAX, J.R., SELPH, J.L., VOLKER, F.A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenin pleurisy in the rat. **Fed. Proc.** v.41:p.2588-2595, 1982.
- .WEI, E.T., THOMAS, H.A. Anti-inflammatory peptide agonist **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.33: p.91-108, 1993.
- .WHITLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesic. **Brit. J. Pharmacol.** v.22: p.246-253, 1964.

- .WILLIAN, T.J., MORLEI, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability inflammation. **Nature**, v.246: p.215-217, 1973.
- .WILLIAN, T.J. , YARWOOD, H. H. Effects of glucocorticosteroids on microvascular permeability, **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.141: p.539-543, 1990.
- .WILLOUGHBY, D.A. Inflammation - Mediators and mechanisms. **Brit Med. Bull**, v.43: p.245-255, 1987.
- .WINROW. V.R., WINYARD, P.G., MORRIS, C.J., BLAKE, D.R. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. **Brit. Med. Bull**, v.49: p.506-522, 1993.
- .WINSLOW, C.M., AUSTEN, K.F. Enzymatic regulation of mast cell activation and secretion by adenylate cyclase and Cyclic AMP-dependent protein kinases. **Fed. Proc.** v.41: p.22-29, 1982.
- .WINTER, C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs . Garantini, S. (Ed) **Excerpta Medica**, p. 190-202, 1964.
- .WINTER, C.A. Non-steroidal anti-inflammatory Drugs. Garantini, S. and Dukes, M.N.G. (Eds). **Excerpta Med Found Int. cong. Ser. N° 82**, Amsterdam, 1965.
- .WINTER, C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory agents, **Ann.Rev. Pharmacol** v.6:p.157-174, 1966.

- .WINTER, C.A., PORTER, C.C. Effects of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hidro cortisone esters. **J. Amer. Pharm Ass. Ed.** , v.46: p.515-519, 1957.
- .WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol.Med.**, v.11: p.544-547, 1962.
- .YOSHIMOTO, T., FURUKAWA, M, YAMAMOTO. S., HORIE, T., WATANABE-KOHNO, S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. **Biochem Bioph. Res. Comm.**, v.11: p.612-618, 1983.
- .ZIPSER, R.D., LAFFI, G. Prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes in clinical medicine. **West J. Med.**, v.143: p.485, 1985.