



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



VALÉRIA SILVA GÓES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA, ANTINOCICEPTIVA, ANTI-
INFLAMATÓRIA E SOBRE O SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE *MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS* (MART.
EX BENTH.) J.F.B. PASTORE.**

VALÉRIA SILVA GÓES

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA, ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA E SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE *MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS* (MART. EX BENTH.) J.F.B. PASTORE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof . Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Lopes da Rocha
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana – BA

2015

Ficha catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

G543a Góes, Valéria Silva
Avaliação toxicológica, antinociceptiva, anti-inflamatória e sobre o sistema nervoso central de *Martianthus Leucocephalu* (Mart. Ex Benth) J.F.B. Pastore. / Valéria Silva Góes. – Feira de Santana, 2015.

88 f.: il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira
Co-orientadora: Marilene Lopes da Rocha
Co-orientadora: Angélica Maria Lucchese

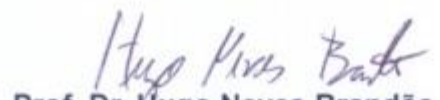
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéricos Vegetais, 2015.

1. *Martianthus Leucocephalu*. 2. Plantas medicinais. I. Oliveira, Lenaldo Muniz de, orient. II. Rocha, Marilene Lopes da, coorient. III. Lucchese, Angélica Maria. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.949.2

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz
(UFRB)


Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
(UEFS)


Prof.^a. Dr.^a. Marilene Lopes da Rocha (UEFS)
Coorientadora e Presidente da Banca

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por abrir os meus caminhos e abençoar os meus projetos.

À meus maravilhosos pais, **Gerusa** e **Jeová**, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Obrigada por me ajudarem a cuidar da minha filha, especialmente durante os dois últimos anos.

À **Tião**, meu grande amor, por estar sempre ao meu lado e me ajudar, sempre, em tudo que preciso. Obrigada pelas horas de espera na UEFS.

À minha **Valentina**, por todo amor que existe entre nós. Mamãe agora terá mais tempo para brincar de Polly com você.

Aos meus amados irmãos, **Carol e Wagner**, por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Ao meu pequeno sobrinho **Joaquim**, meu “cotoco”, por encher meus dias de alegria e diversão.

À minha amiga chiquíssima e inteligente, **Aline Nascimento**, pela amizade sincera e toda colaboração. Obrigada por me tranquilizar ao dizer que a banca é um bate papo rrsrs

À minha cunhada **Lisy**, por ter colaborado sempre que precisei

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira**, pela oportunidade e confiança.

À **Profª. Drª. Marilene Lopes da Rocha**, minha querida co-orientadora, por chegar junto sempre, pelos ensinamentos e contribuições.

À **Profª. Drª. Angélica Maria Lucchese**, pela paciência, ensinamentos e prestatividade no LAPRON e em sala de aula.

Aos meus **professores do PPG/RGV** pelos ensinamentos valorosos.

Às lindas, **Débora Marchesine, Ana Caroline Barbosa e Addla Thaine**. Meninas o que dizer de vocês? Amo vocês! A nossa convivência no LAFAR vai ficar pra sempre guardada no meu coração.

À muito querida **Amanda Santana**, pela amizade, companhia e prestatividade. Meu eterno carinho.

À **Ingrid Gutierrez e Edna Peralta** pelos ensinamentos no LAPRON.

Aos funcionários do biotério, especialmente **Júnior Brandão**, pela ajuda indispensável.

Às minhas colegas do PPG/RGV, especialmente **Maiane Neves e Flávia Sousa**, pela amizade e companhia.

À equipe gestora do **CETEP/LNAB** e do **Colégio Municipal Dr. Jairo Azi**, por terem me permitido conciliar trabalho e mestrado.

À **UEFS**, pela oportunidade.

À **todos** que vibraram por mim.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros gigantes”.
(Isaac Newton)

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- FIGURA 01. (A).** *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore cultivada em canteiros na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS; **(B)** Inflorescências lilás (maduras). Feira de Santana – BA 24

CAPÍTULO 1

- Figura 01. (A).** Material vegetal de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore secando à temperatura ambiente; **(B).** Moinho de facas; **(C).** Pesagem do material pulverizado; **(D).** Extração com metanol; **(E).** Rotaevaporador sob pressão reduzida; **(F).** Partição líquido-líquido com clorofórmio; **(G).** Extrato metanólico seco. **(H).** Frações clorofórmica e hidrometanólica. 34

- Figura 02.** Efeito de diferentes doses do extrato metanólico obtido a partir da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore sobre a coordenação motora de camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,01$. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 39

- Figura 03.** Efeito de diferentes doses da fração clorofórmica obtida a partir da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore sobre a coordenação motora de camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,01$. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 39

- Figura 04.** Efeito de diferentes doses da fração hidrometanólica obtida a partir da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore sobre a coordenação motora de camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,01$. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 40

CAPÍTULO 2

- Figura 01.** Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,01$. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 53
- Figura 02.** Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 54
- Figura 03.** Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 54
- Figura 04.** Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 56
- Figura 05.** Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 56
- Figura 06.** Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 57
- Figura 07.** Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 57
- Figura 08.** Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 58

- Figura 09.** Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 58
- Figura 10.** Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 59
- Figura 11.** Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 60
- Figura 12.** Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015. 61
- Figura 13.** Efeito do extrato metanólico (300 mg/kg), da fração clorofórmica (300 mg/kg) de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore e da morfina (10 mg/kg) no teste da placa quente. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação com o grupo controle (*** $p < 0,001$). Os sustentados representam o nível de significância entre os grupos tratados com naloxona e aqueles tratados com EMMML, FCML e morfina. (### $p < 0,001$). (ANOVA – seguido de Tukey). 62

CAPÍTULO 03

Figura 01. Efeito do extrato metanólico (300 mg/Kg) obtido da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01; *p<0,05. (ANOVA – seguido de Dunnet). 78

Figura 02. Efeito da fração clorofórmica (300 mg/Kg) obtida da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01. (ANOVA – seguido de Dunnet). 78

Figura 03. Efeito da fração hidrometanólica (300 mg/Kg) obtida da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01. (ANOVA – seguido de Dunnet). 79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01

Tabela 01. Determinação do rendimento do extrato metanólico e frações clorofórmica e hidrometanólica (%) de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore, massa inicial (g) e massa final do extrato seco (g). UEFS, Feira de Santana, 2015. 38

CAPÍTULO 03

Tabela 01. Efeito do extrato metanólico da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. UEFS, Feira de Santana, 2015. 76

Tabela 02. Efeito da fração clorofórmica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. UEFS, Feira de Santana, 2015. 77

Tabela 03. Efeito da fração hidrometanólica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/Kg) sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. UEFS, Feira de Santana, 2015. 77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL – Microlitro

°C – Graus Celsius

A δ – A delta

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais

COX – Ciclooxigenase

e.p.m. – Erro padrão da média

et al. – E colaboradores

EMML – Extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus*

FCML – Fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus*

FHMML – Fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus*

g – Grama

IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor

i.p. – Intraperitoneal

Kg – Quilograma

LAFAR – Laboratório de Farmacologia

LAPRON – Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos

mg – Miligramas

ms⁻¹ – Milisegundo

min- Minutos

n – Número de animais

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

r.p.m. – Rotação por minuto

s- Segundos

s.c.- Subcutânea

s.p. – Sub-plantar

SNC – Sistema Nervoso Central

Tween – Polioxetileno Sorbitano Monoleato

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

UESB – Universidade do Sudoeste da Bahia

v.o. – Via oral

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 1. O uso de plantas medicinais | 18 |
| 2. Desenvolvimento de novos fármacos | 19 |
| 3. Considerações gerais sobre dor, nocicepção e inflamação | 20 |
| 4. Flora medicinal do semiárido brasileiro | 22 |
| Referências | 25 |
| Capítulo 1: Ação toxicológica e sobre o sistema nervoso central do extrato metanólico e suas frações obtidos de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore. | 29 |
| 1.Introdução | 32 |
| 2. Material e Métodos | 33 |
| 3.Resultados | 37 |
| 4.Discussão | 40 |
| 5.Referências | 42 |
| Capítulo 2: Atividade antinociceptiva do extrato metanólico e suas frações obtidos de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em modelo animal. | 45 |
| 1.Introdução | 48 |
| 2.Material e Métodos | 49 |
| 3.Resultados | 53 |
| 4.Discussão | 62 |
| 5.Referências | 65 |
| Capítulo 3: Atividade anti-inflamatória do extrato metanólico e suas frações obtidas de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae) em modelo animal. | 68 |
| 1.Introdução | 71 |

| | |
|-----------------------------|----|
| 2.Materiais e Métodos | 73 |
| 3.Resultados | 76 |
| 4.Discussão | 79 |
| 5.Referências | 81 |
| Considerações Finais | 84 |
| Anexos | 85 |

RESUMO

A família Lamiaceae tem uma grande importância na região do semiárido brasileiro devido às suas espécies detentoras de propriedades farmacológicas. *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore pertence à família Lamiaceae e já teve a atividade antimicrobiana do seu óleo essencial comprovada. No entanto, a referida espécie carece outros de estudos farmacológicos que avaliem seu potencial biológico. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito sobre o sistema nervoso central, a toxicidade aguda, bem como investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *Martianthus leucocephalus* proveniente de cultivo. O possível mecanismo de ação da espécie também foi estudado. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos e no Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. O efeito sobre o sistema nervoso central foi avaliado por meio da Triagem Farmacológica Comportamental e pelo teste do Rota Rod. A toxicidade aguda foi averiguada utilizando o protocolo Organization for Economic Cooperation and Development (OECD – 420/2001). A atividade antinociceptiva foi investigada nos testes do ácido acético, formalina e placa quente. O mecanismo de ação foi apurado utilizando o antagonista opioide naloxona no modelo da placa quente. O estudo da atividade anti-inflamatória foi realizado utilizando os testes do edema de pata induzido por carragenina e da permeabilidade capilar induzida por ácido acético. Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA). *Martianthus leucocephalus* não mostrou toxicidade aguda nem ação miorelaxante sobre o sistema motor. As propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória foram evidenciadas de forma significativa em relação aos animais do grupo controle.

Palavras-chave: Plantas medicinais e aromáticas. Semiárido. Atividade biológica.

ABSTRACT

The Lamiaceae family has a great importance in the Brazilian semiarid region due to their species of pharmacological properties. *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) JFB Pastore belongs to the Lamiaceae family and has had the antimicrobial activity of essential oil proven. However, this species lacks pharmacological studies that evaluate its biological potential. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect on the central nervous system, the acute toxicity, as well as investigate the antinociceptive and anti-inflammatory of *Martianthus leucocephalus* extract. The possible mechanism of action of species was also studied. The experiments were performed in the Chemistry Laboratory of Bioactive Natural Products and in the Laboratory of Pharmacology at the State University of Feira de Santana. The effect on the central nervous system was evaluated through Behavioral Pharmacological Screening by Rota Rod test. The acute toxicity was determined using the protocol Organization for Economic Cooperation and Development (OECD - 420/2001). The antinociceptive activity was investigated in the tests of acetic acid, formalin and hot plate. The mechanism of action was determined using the opioid antagonist naloxone in the hot plate model. The study of anti-inflammatory activity was performed using the paw edema induced by carrageenan tests and capillary permeability induced by acetic acid. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA). *Martianthus leucocephalus* showed no acute toxicity or muscle relaxant effects action on the motor system. The antinociceptive and anti-inflammatory properties were found significantly compared to the control group animals.

Keywords: Medicinal and aromatic plants. Semiarid region. Biological activity.

INTRODUÇÃO GERAL

1. O uso de plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais pela humanidade é tão antiga quanto a história do homem. O processo de evolução da “arte de cura” se deu de forma empírica, em processos de descoberta por tentativas, erros e acertos (ALMEIDA, 2003). O interesse popular no uso de plantas medicinais cresceu consideravelmente na segunda metade do século 20 e os estudos sobre a química e farmacologia de produtos naturais em muitas partes do mundo, incluindo o nordeste brasileiro, tem resultado no aumento da preocupação com a potencial perda de biodiversidade e a necessidade de garantir o uso sustentável dos recursos naturais (ALBUQUERQUE et al., 2007).

O Brasil é detentor de grande biodiversidade e tem uma riqueza de conhecimento tradicional acumulado pelos habitantes locais que tem acesso direto à natureza e aos produtos da biodiversidade (ALBAGLI, 2001). O conhecimento tradicional relacionado às ervas medicinais é a base da medicina popular no Brasil, que é derivado a partir de uma mistura de culturas indígenas brasileiras e europeias e influências africanas desde o período de colonização (MARTINS et al., 2000).

Nas regiões mais pobres do país e mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são vendidas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em quintais residenciais (AMAZORO; GELY, 1988; PRANCE, 1992). As observações populares a respeito da utilização e ação de plantas medicinais contribuem significativamente para a difusão dos atributos terapêuticos dos vegetais, que por sua vez são prescritos com frequência, em virtude do efeito farmacológico que produzem, mesmo não tendo sua composição química conhecida (MACIEL et al., 2002).

Pessoas que vivem em comunidades localizadas em áreas isoladas tendem a se tratar com plantas medicinais com uma extensão muito maior do que pessoas que habitam regiões onde os centros de saúde e médicos são mais facilmente disponíveis (ALMEIDA et al., 2005). Os curandeiros tradicionais têm conhecimento considerável do uso medicinal de plantas locais e cultivadas e a experiência etnomedicinal e o conhecimento dos recursos locais para uma ampla variedade de

doenças são passados de gerações anteriores às gerações atuais (AGRA et al., 2007).

Segundo Rodrigues (2006), o conhecimento das comunidades tradicionais relativo a plantas utilizadas em tratamentos de diversas doenças transcende sua natureza medicinal. Esse conhecimento se estende para noções de toxicidade, contra-indicações, doses diferenciadas e interação entre plantas. O conhecimento dessas propriedades é tão importante quanto, ou mais importante que o reconhecimento das propriedades curativas. A suspeita de que certas espécies de plantas podem ser tóxicas ou produzir reações adversas, com base em um registro detalhado de seu uso em levantamentos etnofarmacológicos, pode ser uma ferramenta auxiliar para a farmacovigilância dos medicamentos fitoterápicos, com conhecimento mais amplo dos recursos vegetais na flora mundial.

2. Desenvolvimento de novos fármacos

As atividades extrativas no meio natural consistem em um dos principais usos da diversidade biológica. As ervas medicinais têm recebido atenção especial pelos diferentes significados que assumem em nossa sociedade como recurso biológico e cultural. Os vegetais são uma importantíssima fonte de produtos naturais biologicamente ativos, e muitos deles consistem em modelos para a síntese de grande número de fármacos (GUERRA; NODARI, 2004). Em décadas recentes, muitas informações sobre recursos genéticos vegetais em florestas tropicais tem aumentado (LUCENA et al., 2007; BUSSMANN; SHARON, 2006).

O patrimônio genético do Brasil tem valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade. Estima-se que 25 a 50% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% a partir de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas já tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância à química medicinal (KINGSTON, 2011). Além disso, apesar da biodiversidade brasileira ser considerada a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 56.000 espécies catalogadas, apenas 15% a 17%

foi estudada, e somente para algum efeito específico (GIULIETTI et al.,2005). A vegetação brasileira apresenta uma abundância de plantas nativas, com carência de completos estudos químicos e farmacológicos, distribuídos em biomas com características diversas de clima e solo, como a floresta amazônica, a mata atlântica, o cerrado, o pantanal e a caatinga. Mas é no Nordeste que está presente um dos climas mais complexos, que pela sua grande área, somada às variações de relevo e disponibilidade irregular de chuvas, levou ao aparecimento de distintos tipos vegetacionais, com grande riqueza de metabólitos de interesse farmacológico (GIULIETTI et al., 2005).

Apesar desse enorme potencial e dos diversos incentivos governamentais para estudos nesta região nos últimos anos, existe ainda grande desconhecimento sobre a biodiversidade do Nordeste brasileiro, tornando o uso dos produtos naturais oriundos desta região fragmentado e escasso. Somado a isso, o interesse em fontes naturais de novas moléculas foi recentemente retomado, pois embora nas últimas décadas do século passado os esforços para a busca de drogas tenham sido desviados para produtos sintéticos, esta mudança não levou a um aumento na descoberta de novos fármacos (KINGSTON, 2011).

3. Considerações gerais sobre dor, nocicepção e inflamação

A dor é uma experiência subjetiva, difícil de ser definida, embora todos saibam o seu significado. Reconhecidamente, é a resposta direta a um estímulo não desejável e associado à lesão tecidual, como trauma, inflamação ou câncer, mas a dor intensa pode ter origem independentemente de qualquer causa aparentemente óbvia, como na neuralgia do trigêmeo, ou persistir por muito tempo depois que a lesão esteja resolvida, tal qual na dor do membro fantasma (RANG et al., 2011). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceituou a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais.

A dor pode ter início espontaneamente e/ou por sensibilização, ou seja, pela hiperalgesia, mas também em resposta a estímulos não nocivos (alodinia) (KIDD et al., 2001; MILLAN, 1999). Em função dos neurotransmissores e/ou tipo de lesão, pode-se classificar a dor em: neurogênica, neuropática, nociceptiva ou psicogênica,

respectivamente vinculadas à lesão neural, disfunção neural, ativação aumentada dos nociceptores ou fatores psicológicos (FURST, 1999; MILLAN, 1999).

Nocicepção é a percepção de um estímulo pelo sistema nervoso central (SNC), desencadeado pela ativação de receptores sensoriais especializados, intitulados nociceptores, existentes na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. As fibras nervosas nociceptivas que transmitem a mensagem ao SNC são fibras aferentes primárias mielinizadas de pequeno calibre (fibras A δ), com velocidade de condução de 12 a 30 ms⁻¹ e respondem a estímulos térmicos e mecânicos; e as fibras não-mielinizadas (fibras C), com baixa velocidade de condução (0,5 a 2 ms⁻¹) e respondem a estímulos de origem térmica, mecânica e química (FÜRST, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001). A nocicepção consiste nos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. Basicamente, pode ser considerada como uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (TRANQUILLI, 2004).

A inflamação é uma resposta não específica da microcirculação do tecido lesionado provocado por estímulos biológicos, físicos, químicos ou pela combinação destes (NATHAN, 2002). É uma resposta fundamentalmente protetora, destinada a livrar os organismos tanto da causa inicial da injúria celular quanto das consequências de tal injúria (KUMAR et al., 2010). A reação inflamatória se caracteriza por uma cascata de eventos onde sinais clássicos da inflamação, tais como, rubor, calor, tumor e dor, se fazem presentes (GILROY et al., 2004). Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos, necrose, apoptose e liberação de mediadores químicos são alterações fisiológicas que se associam aos sinais clássicos (VIVIER; MALISSEN, 2005).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais, que são drogas utilizadas no tratamento da inflamação, são uma das classes de drogas mais amplamente utilizadas em todo o mundo, mas os seus efeitos adversos sobre a mucosa gástrica, rim, brônquio e sistema cardiovascular são bastante conhecidos e têm limitado sua utilização (WALLACE; VONG, 2008).

A tendência atual de pesquisa é a investigação de medicamentos de origem vegetal por sua acessibilidade e poucos efeitos colaterais (IBRAHIM et al., 2012).

Não é de causar admiração que o alívio da sensação dolorosa é um dos grandes objetivos da medicina moderna na incessante tentativa de desenvolver substâncias que sejam capazes de cessar a dor, ou até mesmo a descoberta de fármacos com eficácia semelhante, ou maior que aqueles usados na terapêutica atual, mas com menor incidência de efeitos colaterais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

4. Flora medicinal do semiárido brasileiro

O semiárido possui vegetação com grande variação fisionômica e florística, devido à grande heterogeneidade de clima, solo e relevo. Os principais tipos de vegetação que compõem essa região são a caatinga, campos rupestres, florestas, cerrado, brejos e ecossistemas aquáticos (QUEIROZ et al., 2006). A caatinga destaca-se por ser o maior e mais importante ecossistema existente nessa região, ocupando praticamente 70% (800.000 km²) de sua área (CASTELLETTI et al., 2004). Seu clima é marcado por altas temperaturas e duas estações bem definidas, uma seca e outra seca e úmida. O solo é alcalino, pedregoso e raso, dificultando a agricultura. A vegetação, predominantemente um estrato arbóreo ou arbustivo-arbóreo, fica submetida à deficiência hídrica sazonal, agravada nos anos de seca (QUEIROZ et al., 2006).

Esse ecossistema está sob grande pressão devido ao desmatamento, além disso, o uso irracional do solo provoca erosão devido a falhas agrícolas. Isso dificulta a sustentabilidade dos recursos florestais, agravando a pobreza da região, restringindo renda familiar e a oferta de forragem. Sob o ponto de vista da conservação da biodiversidade, a caatinga precisa de ação prioritária, pois é o lar de espécies endêmicas da flora e da fauna. Muitas destas espécies têm grande potencial medicinal, e o extrativismo tem reduzido suas populações drasticamente (ALMEIDA et al., 2005).

Fazendo parte da flora do semiárido, Lamiaceae está entre as famílias que apresentam o maior número de espécies com uso medicinal na caatinga (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA et al., 2005; MORAIS et al., 2005; CARTAXO et al., 2010). Atualmente, a família apresenta cerca de 7200 espécies, o maior dentro da ordem Lamiales, com 240 gêneros, divididos entre sete subfamílias. Quase cosmopolita, pois só não ocupa regiões mais frias de alta altitude ou longitude (HARLEY et al., 2004), essa família tem grande importância econômica por

ser fonte de óleos essenciais aromáticos voláteis, além de sua utilização na culinária, com muitas espécies utilizadas como condimentos importantes, sendo apreciados pelo aroma ou pelo sabor que atribuem aos alimentos (JUDD,1999).

Martianthus leucocephalus (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore pertence à família Lamiaceae, é uma erva aromática endêmica do semiárido baiano (HARLEY; PASTORE, 2012), tem cerca de 20 cm de altura, apresenta folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadas (OLIVEIRA, 2011) (Figura 1A e 1B), e vem sendo utilizada por comunidades locais para o tratamento de distúrbios respiratórios (AZEVEDO, 2014). Em 2012, Harley e Pastore realizaram um estudo taxonômico do gênero *Hyptis* e baseado em análises morfológicas e moleculares, a espécie *Hyptis leucocephala* (Mart. Ex Benth.) passou a pertencer ao gênero *Martianthus*, sendo designada agora *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore.

Muitas espécies de Lamiaceae, como as do gênero *Hyptis* são bastante utilizadas por comunidades tradicionais, pois são caracterizadas por apresentar substâncias com grande potencial farmacológico e representam uma importante fonte de compostos bioativos, conhecidos pelas atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, anti-inflamatória, anti-HIV, inseticida, e anti-câncer (FALCÃO; MENEZES, 2003; McNEIL et al., 2011). As classes de compostos químicos encontrados nas Lamiaceas são predominantes de metabólitos da via do acetato-mevalonato, mas com algumas substâncias de origem biossintética mista e da via do ácido chiquímico, como classes de terpenos, flavonoides, lactonas, lignanas e ácidos graxos (JUDD, 1999).

Essencialmente, os principais responsáveis pelo efeito citotóxico e anti-HIV, parecem ser os metabólitos terpenoides, com os triterpenos encontrados preferencialmente (MENEZES, 1994). Devido à importância econômica do gênero, muitos pesquisadores investigaram a composição química dos óleos essenciais de suas espécies, identificando assim, como componentes majoritários, os monoterpenos e sesquiterpenos, além de outras substâncias como hidrocarbonetos, ácidos graxos, esteroides e lactonas α -pirônicas (FALCÃO; MENEZES, 2003). Alguns estudos sobre o potencial biológico de *Hyptis* foram realizados, onde a atividade antimicrobiana foi revelada em *H. leucocephala* Mart. ex Benth., *H. platanifolia* Mart. ex Benth., *H. irwinii* Harley e *H. nubicola* Harley (SANTOS et al.,

2011; PINTO et al., 2009; LUCCHESI, et al., 2006). A espécie, *H. fruticosa* Salzm. ex Benth., foi investigada quanto a atividade analgésica, e os resultados obtidos estão de acordo com o uso popular das folhas desta planta no combate à dor (ALVES et al., 2005).

M. leucocephalus vem sendo alvo de estudos fitoquímicos, agrônômicos e farmacológicos na Universidade Estadual de Feira de Santana. Os estudos fitoquímicos revelaram rendimento médio de 0,2% de óleo essencial nas folhas com formiato de isobornila como componente majoritário (LUCCHESI et al., 2005) e os estudos farmacológicos comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo frente a *Bacillus cereaus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (LUCCHESI et al., 2006).

No entanto, ainda não existem trabalhos publicados sobre a atividade farmacológica dessa espécie e sobre sua toxicidade. Portanto esse projeto se propõe a avaliar a toxicidade aguda e a atividade biológica do extrato metanólico e das frações clorofórmica e hidrometanólica da parte aérea de *M. leucocephalus* em camundongos, averiguando os possíveis efeitos sobre o sistema nervoso central, assim como avaliar a ação dos extratos e das frações na coordenação motora dos animais e verificar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dessas substâncias.



Figura 01: (A) *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth) J.F.B. Pastore cultivada em canteiros na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS. (B) inflorescências lilás (maduras). Feira de Santana – Ba.

REFERÊNCIAS

- ALBAGLI, S. **Amazônia**: fronteira geopolítica da biodiversidade. Parcerias Estratégicas (Brasília), Brasília 4, 2001. 5–19.
- AGRA, M.F., et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P., OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 156–170, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p. 325–354, 2007.
- ALMEIDA, M. Z. de; UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Plantas medicinais**. 2. ed. Salvador: EDUFBA, 2003. 214p.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p.127-142, 2005.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. *In*: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 179-188.
- ALVES, P.B. et al. Efeito analgésico do óleo essencial de *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2005.
- AMAROZO, M.C.M.; GELY, A.; Uso de Plantas Medicinais por Caboclos do Baixo Amazonas Barcarena, PA, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 4, p. 47,1988.
- AZEVEDO, B.O. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex. Benth.) J.F.B. Pastore em condições de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Feira de Santana-Ba. 2014. 77f.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.
- BUSSMANN, R.W, SHARON, D. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing cultures. **Journal of Ethnopharmacology and Ethnomedicine**, v. 2, p. 47, 2006.
- CASTELLETTI, C.H.M.; et al. Quanto ainda resta da caatinga? Uma estimativa preliminar. *In*: SILVA, I. M. C.; et al. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p. 91-100.

CARTAXO, S.L., SOUZA, M. M. A., ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p.326-342, 2010.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p.129-141, 1999.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-16, 2004.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, Rio Grande do Sul, 5. ed., 2004. p. 13-28.

HARLEY, R.M. Labiatae. In: Kadereit, J.W. (ed.). **The families and genera of vascular plants** 7. Springer, Berlin & Heidelberg, 2004, p. 167–275.

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

IBRAHIM, B. et al. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrate* (Lim) Blume (Amaranthaceae). **J. Ethnopharmacol**, v.141, p. 282-289, 2012.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 463p.

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

KIDD, B.L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.87, n.1, p.3-11, 2001.

KINGSTON, D.G.I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation, **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KUMAR, V. et al. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 43-77, 2010.

LUCCHESI, A. M., et al. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do Semiárido da Bahia. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2005,

Campinas. In: **Anais do III Simpósio Brasileiro de óleos essenciais**. Instituto Agrônomo de Campinas, 2005.

LUCCHESI, A.M., et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindoia, 2006.

LUCENA, R.F.P., ARAÚJO, E. L., ALBUQUERQUE, U.P. Does the local availability of woody *Caatinga* plants (Northeastern Brazil). Explain their use value? **Economic Botany**, v.61, p. 347-361, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CATELLANE, D. C., Dias, J. E. **Plantas Mediciniais**. Editora Universidade/UFV, Viçosa, 2000.

MCNEIL, M.;FACEY, P.;PORTER, R. Essential oils from the *Hyptis* genus – a review. **Natural Products Communications**, v. 6, p.1775-1796, 2011.

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

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

MORAIS, S. M., et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 169–177, 2005.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

OLIVEIRA, L. M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p 73-78, 2011.

PINTO, R. P. et al. Variação circadiana da composição química e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Hyptis platanifolia*. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza, 2009.

PRANCE, G. T.; Out of the Amazon; **Her Majesty's Stationery Office**. p. 83, 1992.
QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Nordeste Semi-árido: caracterização geral e lista de fanerógamas. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Brasília: IMSEAR (MCT), 2006., v.1, p.15-359.

RANG, H. P., et al. Fármacos analgésicos. In: **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier. p. 503-524, 2011.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111. p. 295–302, 2006.

SANTOS, S.N. et al. Atividade antimicrobiana de *Hyptis leucocephala*. In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2011. Campinas. Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitoquímica, 2011.

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

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.

WALLACE, J. L.; VONG, L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDS. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, v.9, p.1115-1156, 2008.

CAPÍTULO 1

**AÇÃO TOXICOLÓGICA E SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL
DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDOS DE
MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS (MART EX. BENTH.) J. F. B.
PASTORE.**

RESUMO

O uso de medicamentos a base de vegetais é um hábito antigo da humanidade. As plantas medicinais são encontradas em todo território brasileiro e embora as populações que as utilizam tenham noções de toxicidade, contra-indicações e doses diferenciadas, ainda é grande o número de casos de intoxicações e óbitos provocados pelo uso de plantas e seus derivados. *Martianthus leucocephalus* é uma erva aromática do semiárido brasileiro pertencente à família Lamiaceae, e vem sendo utilizada por comunidades tradicionais no combate a doenças respiratórias. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do extrato metanólico e das frações clorofórmica e hidrometanólica da parte aérea de *M. leucocephalus* sobre o sistema nervoso central de camundongos através da triagem farmacológica comportamental e do teste do rota rod. O diazepam foi utilizado como fármaco padrão no teste do rota rod. Foi também propósito desse trabalho avaliar a toxicidade aguda do extrato e das frações da referida espécie, conforme o guia Organization for Economic Cooperation and Development – 420/2001. Os resultados da triagem farmacológica mostraram ação analgésica e sedativa. O teste do rota rod não evidenciou atividade miorrelaxante. O extrato metanólico e as frações clorofórmica e hidrometanólica não produziram toxicidade aguda em camundongos. Os resultados obtidos mostram a potencialidade do extrato e das frações de *M. leucocephalus* como agentes depressores do sistema nervoso central.

Palavras-chave: Plantas medicinais e aromáticas. Lamiaceae. Atividade miorrelaxante. Toxicidade.

ABSTRACT

The use of plant-based medicines is an old habit of humanity. Medicinal plants are found throughout Brazil and although the people who use them have toxic notions, contraindications and different doses, there is a huge number of cases of poisoning and deaths caused by the use of plants and their derivatives. *Martianthus leucocephalus* is an aromatic herb belonging to the Brazilian semiarid region, belonging to the family Lamiaceae and has been used by traditional communities in combating respiratory diseases. The objective of this research was to evaluate the effect of the methanol extract and chloroform fractions and hydromethanol shoots of *Martianthus leucocephalus* on the central nervous system of mice through behavioral pharmacological screening and of the rod route test. Diazepam was directory to use as the standard drug in the rod route test. Purpose of this study was to evaluate the acute toxicity of the extract and the fractions of that species, as the Guide Organization for Economic Cooperation and Development – 420/2001. The results of pharmacological screening showed analgesic and sedative action. The route rod test not showed muscle relaxant effects. The methanol extract and chloroform and hydromethanol fractions did not produce acute toxicity in mice. The results show the extract capability and *M. leucocephalus* fractions as depressants of the central nervous system.

Keywords: Medicinal and aromatic plants. Lamiaceae. Miorrelxante activity. Toxicity.

1. INTRODUÇÃO

A revisão da literatura para o Nordeste do Brasil revela que as práticas farmacêuticas tradicionais têm sido utilizadas no tratamento de muitas doenças, incluindo tuberculose, infecções do trato urinário, doenças de pele e distúrbios gastrointestinais (AGRA et al., 2007). No entanto, muitas dessas práticas ainda não foram submetidas a um estudo científico para confirmar a sua eficácia para uma dada doença (CARTAXO, 2010).

A informação etnobotânica em sistemas de cuidados de saúde popular em todo o mundo é de importância inestimável, pois é reconhecidamente valioso para bioprospecção (QUAVE et al., 2008). No entanto, o uso popular e tradicional não basta por si só para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (BRASIL, 1995). Dessa forma, para avaliar a segurança das plantas que são utilizadas como medicamentos são imprescindíveis a realização de estudos farmacodinâmicos, toxicológicos pré-clínicos e clínicos de medicamentos. Os protocolos para a avaliação toxicológica de medicamentos, quando realizados por profissionais competentes e com precisão científica, possibilitam boa avaliação da toxicidade potencial para a espécie humana, permitindo, ainda, evidenciar os órgãos alvos principais (LAPA, 2004).

Martiatthus leucocephalus (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore pertence à família Lamiaceae, é uma erva aromática endêmica do semiárido baiano (HARLEY; PASTORE, 2012), tem cerca de 20 cm de altura, apresenta folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadas (OLIVEIRA, 2011), e tem sido utilizada por comunidades locais para o tratamento de distúrbios respiratórios (AZEVEDO, 2014). Análises fitoquímicas mostraram que o óleo essencial de suas folhas possui um teor médio de 0,2% com formiato de isobornila como componente majoritário, e atividade antimicrobiana e antifúngica (LUCCHESI et al., 2005). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivos fazer uma avaliação sobre o sistema nervoso central (SNC) e um estudo toxicológico pré-clínico do extrato metanólico (EMML), da fração clorofórmica (FCMML) e da fração hidrometanólica (FHMML) da parte aérea de *M. leucocephalus*.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Indivíduos de *M. leucocephalus* foram cultivados em solo corrigido com adubado antes do cultivo, de acordo com a análise química do solo. Para tal, foram aplicados 6.160 g de calcário dolomítico e 732,6 g de fósforo (superfosfato simples) na área total e 10 litros de composto orgânico por canteiro. As plantas foram coletadas no período da manhã, entre nove e dez horas, durante o mês de agosto do ano de 2013, na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, (UEFS), localizada a 12° 16' 00" de latitude sul e 38° 58' 00" de longitude oeste, apresentando altitude de 234 metros e temperatura média anual de 24°. A identificação botânica foi realizada no herbário da UEFS (HUEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 25.322). Após a coleta, foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPRON). O material recém coletado foi colocado para secar à temperatura ambiente e posteriormente a parte aérea das plantas (caule, folhas e flores) foi triturada com auxílio de um moinho de facas.

2.2. Preparo do extrato e frações

Após secagem e moagem, o pó foi então pesado e submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com metanol em erlenmeyer (Figura 1C e 1D). Os extratos brutos foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom 802), sob pressão reduzida (Figura 1E), em temperaturas de 40-45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão para obtenção do EMMML seco (Figura 1F). 20g do EMMML foi dissolvida em metanol à temperatura ambiente e filtrada, adicionando-se água destilada a esta solução a uma proporção de 7:3 (água; metanol, v/v), particionando-se por três vezes com clorofórmio (1:1) (Figura 1G), resultando nas FCML e FHMML (Figura 1H). A FCML foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-45°C. Enquanto a FHMML teve o metanol evaporado em capela de exaustão e a solução final foi liofilizada (Liofilizador Terrone Enterprise I). Esses experimentos foram realizados no

LAPRON, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana – Ba.



Figura 01: (A) Material vegetal de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore secando à temperatura ambiente. (B) moinho de facas. (C) Pesagem do material pulverizado. (D) extração com metanol. (E) rotaevaporador sob pressão reduzida. (F) extrato metanólico seco. (G) partição líquido-líquido com clorofórmio (H). Fração hidrometanólica e fração clorofórmica. Feira de Santana, 2015.

2.3. Animais

Todas os experimentos foram realizados com camundongos suíços (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) machos, adultos, com peso corporal variando entre 25-35g, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso à comida e água. Duas

horas antes de cada procedimento, os animais receberam apenas água para evitar que os alimentos pudessem interferir com a absorção da substância. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS, protocolo número 006/2012) – Anexo 1 .

2.4. Administração das drogas e extratos

O EMMML e as FCML e FHMMML foram dissolvidos em Tween 80 e em água destilada e administrados via oral (v.o) em doses de 100, 200 ou 500 mg/kg (triagem farmacológica comportamental) e nas doses de 75, 150 ou 300 mg/kg (teste do Rota rod). O diazepam (1,5 mg/kg), utilizado como fármaco padrão de referência no teste do rota rod, foi administrado por via intraperitoneal (i.p.). Aos animais do grupo controle foi administrado um veículo (água destilada e Tween 80, 0,1ml/10g, v.o.).

2.5. Triagem farmacológica comportamental

A partir da metodologia proposta por Almeida e Oliveira (2006), são estabelecidos critérios comparativos para uma série de comportamentos normalmente exibidos pelos animais (Anexo 02), foi feita a análise dos parâmetros estabelecidos no protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental para observação de possíveis alterações induzidas pelo EMMML, FCML e FHMMML de *M. leucocephalus*, relacionadas com a atividade no SNC. Os camundongos foram divididos em grupos de seis, tratados com EMMML e FCML e FHMMML (doses: 100, 200 ou 500 mg/kg), e o grupo controle que recebeu apenas o veículo. Após as administrações, os animais foram observados em intervalos de tempo pré-estabelecidos (30, 60, 120 e 240 min.) quanto à presença ou ausência de diversos sinais, estabelecidos no protocolo experimental padrão de comportamento. Após as quatro primeiras horas do experimento os animais foram mantidos em observação por um período de até 72 horas, para registro da possível ocorrência de mortes.

2.6. Atividade miorrelaxante

A atividade miorrelaxante foi determinada com a utilização do aparelho de rota rod – Modelo EFF – 411- INSIGHT – Brasil, constituído de uma barra giratória

não escorregadia, dividida em quatro segmentos iguais com 5 cm de diâmetro. A velocidade de rotação do cilindro por minuto (rpm), o tempo de permanência dos camundongos na barra, assim como o número de quedas são controlados e registrados por dispositivos que integram o aparelho. Para este experimento, 24h antes foi realizado um pré-teste para selecionar os animais, escolhendo-se aqueles que conseguiram permanecer na barra giratória durante 3 minutos (7 rpm) em até três tentativas, conforme metodologia proposta por Bonjardim et al. (2011). No dia do teste os animais foram tratados com o EMMML, FCML, FHMMML, veículo ou diazepam, totalizando cinco grupos de tratamento (n=8). O tempo em que cada animal permaneceu na barra em até 180s foi registrado 60 minutos após cada administração (BONJARDIM et al.,2011).

A Triagem Farmacológica Comportamental e o teste do rota rot foram realizados no Laboratório de Farmacologia (LAFAR), UEFS, Feira de Santana – Ba.

2.7. Toxicidade aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado conforme a Organization for Economic Cooperation and Development, Guia OECD-420/2001 “Procedimento de dose fixa” (OECD, 2001). A dose inicial é selecionada com base em teste preliminar, no qual se observa a dose que produza sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade. Em seguida realiza-se o estudo com 5 animais por grupo, iniciando com a dose definida no pré-teste.

O experimento foi realizado com 23 camundongos suíços, adultos, provenientes do Biotério Central da UEFS.

Inicialmente foi realizado o pré-teste, no qual o EMMML e as FCML e FHMMML foram administrados por via oral, a um único animal, na dose provável de produzir toxicidade evidente. A dose inicial escolhida para iniciar o pré-teste foi baseado em estudos prévios (triagem farmacológica comportamental) que testaram a dose de 500 mg/kg, com a qual não se observou sinais de toxicidade nem mortalidade, desta forma a dose fixa maior de acordo com o protocolo seria de 2000 mg/kg e, portanto, foi a dose escolhida para o pré-teste.

Depois de determinada a dose inicial através do pré-teste, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle com 5 animais tratados com o veículo (água destilada e Tween 80), e 3 grupos de 5 animais cada, tratados com o

EMML, FCML ou FHMML, na dose de 2000 mg/kg de acordo com os resultados do teste preliminar. Antes da administração os animais foram submetidos a jejum de 3 horas, com acesso livre apenas a água. O acesso à ração foi permitido apenas após 2 horas da administração. Em seguida, os animais foram observados durante as primeiras 8 horas, com especial atenção nas primeiras 4 horas, e durante 14 dias para avaliação de sinais clínicos de caráter geral e tóxicos.

Os parâmetros foram avaliados segundo o protocolo de toxicidade aguda descrito por BRITO (1994), através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 pontos, sendo 0 (zero) o valor representante da normalidade, ou através de escalas bipolares variando de 0 a 8 pontos, sendo 4 o valor representante da normalidade.

Os animais foram pesados no início e no final do experimento. No último dia de observação, os animais foram eutanasiados e submetidos a laparotomia para retirada, pesagem e observação macroscópica dos rins, fígado, coração e pulmões.

Este experimento foi realizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Jequié – Ba.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados do teste do rota rod foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnet, utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 6.0.

No teste de toxicidade aguda, os dados estatísticos foram analisados utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 6.0.

Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.0. RESULTADOS

3.1. Rendimento dos extratos

Os resultados obtidos demonstraram que o EMML apresentou rendimento final de 8,1%, enquanto que as FCML e FHMML apresentaram rendimento final de 32,4% e 53,5%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 01- Determinação do rendimento do extrato metanólico e frações clorofórmica e hidrometanólica (%) de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore, massa inicial (g) e massa final do extrato seco (g). UEFS, Feira de Santana, 2015.

| Extrato / Fração | Massa inicial (g) | Massa final (g) | Rendimento do extrato / fração total (%) |
|------------------------|-------------------|-----------------|--|
| Extrato metanólico | 2718,47 | 221,49 | 8,1 |
| Fração clorofórmica | 20 | 6,48 | 32,4 |
| Fração hidrometanólica | 20 | 10,7 | 53,5 |

3.1. Triagem Farmacológica Comportamental

De acordo com os resultados obtidos na triagem farmacológica, baseando-se nos parâmetros descritos na metodologia proposta por Almeida e Oliveira (2006), pode-se depreender que o EMMML, e as FCML e FHMML nas doses de 100, 200 e 500 mg/kg não apresentaram ação estimulante do SNC dos animais. Em relação à ação depressora do SNC, o EMMML, FCML e a FHMML provocaram analgesia nos camundongos em todas as doses (100, 200 e 500 mg/kg) em todos os tempos de observação. Foi possível observar que a FCML foi responsável pela sedação dos animais em todas as doses e em todos os tempos avaliados. Além disso, é necessário destacar que, em 72 h de observação nenhuma morte foi registrada.

3.2 Teste do rota-rod

O teste da barra giratória (rota rod) foi realizado para verificar uma possível interferência sobre a coordenação motora dos roedores após administração do EMMML e das FCML e FHMML nas doses de 75, 150 ou 300 mg/kg. Não houve diferença significativa no parâmetro avaliado em animais do grupo controle daqueles tratados com EMMML, FCML e FHMML, nas doses acima citadas (Figuras 02, 03 e 04). Como esperado, o diazepam, droga depressora do SNC utilizada, diminuiu o tempo de permanência no aparelho.

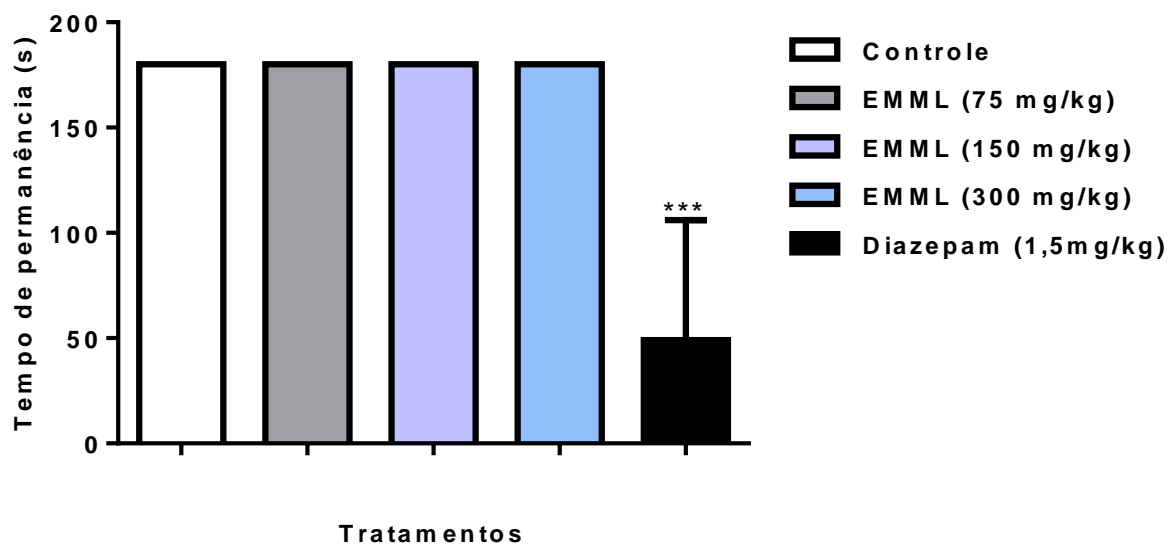


Figura 02: Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (75, 150, 300 mg/kg, v.o.) no teste da coordenação motora em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$. (ANOVA seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

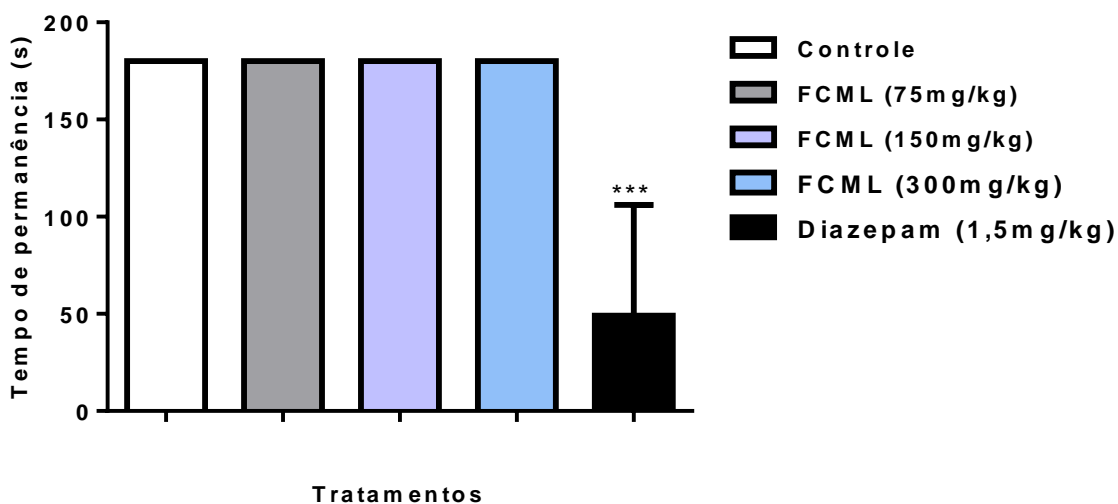


Figura 03: Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (75, 150, 300 mg/kg, v.o.) no teste da coordenação motora em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$. (ANOVA seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

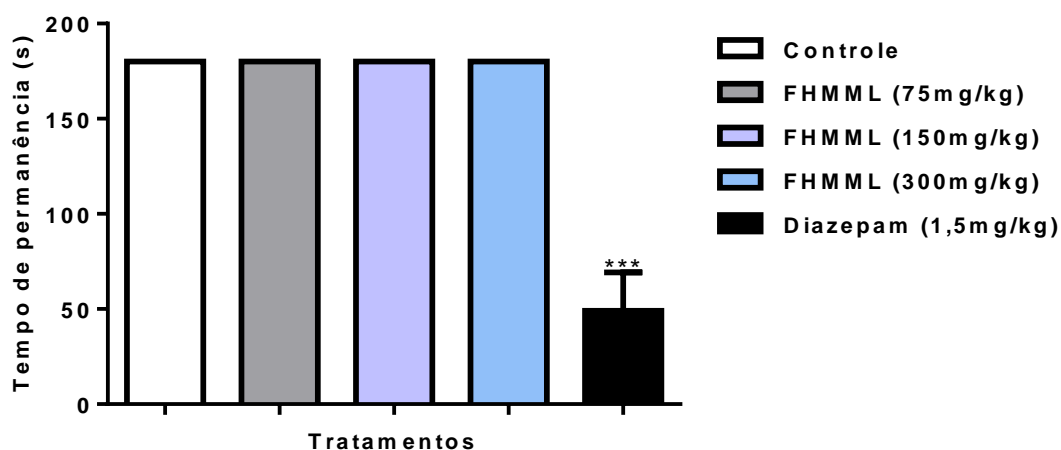


Figura 04 : Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (75, 150, 300 mg/kg, v.o.) no teste da coordenação motora em camundongos. Resultados expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$. (ANOVA seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

3.3. Toxicidade Aguda

Os resultados obtidos no pré-teste demonstraram que a dose inicial de 2000 mg/kg do extrato e das frações não produziram sinais de toxicidade graves e nenhuma mortalidade. Portanto, foi a dose escolhida para realização do teste.

Após a realização do procedimento de dose fixa, verificou-se que nem o extrato nem as frações da parte aérea de *M. leucocephalus* apresentou sinais de toxicidade evidente, nem mortes, por via oral, na dose de 2000 mg/kg (Anexo 3). A análise do peso corpóreo dos animais no início e final do teste, bem como os pesos dos órgãos (rins, fígado, pulmões e coração) não apresentou diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey entre o grupo controle e os grupos testes que receberam o extrato e as frações. A análise macroscópica dos rins, fígado, coração e pulmões também não detectou nenhuma alteração.

4. DISCUSSÃO

A fase inicial ou de triagem de efeitos farmacológicos de um derivado vegetal ou droga sintética deve ser considerada de extrema importância, pois dela depende o abandono da substância testada ou o prosseguimento do estudo (CARLINI, 2011). Muitos trabalhos abordam a forma de condução e os sinais que devem ser

observados como parte da triagem inicial de um fármaco sintético ou extrato de planta (MALONE; ROBICHAUD, 1962; ALMEIDA et al., 1999).

A triagem farmacológica comportamental ou screening farmacológico fornece uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida. Neste procedimento, as doses utilizadas do EMMML e das FCML e FHMMML administrados v.o provocaram alterações comportamentais sugestivas de substâncias que inibem a atividade no SNC, entre as quais, antinocicepção ou analgesia e sedação. Almeida & Oliveira (2006) define sedação como um grau de depressão do SNC caracterizada por sonolência, relaxamento, serenidade e diminuição da atividade motora, sem, no entanto, perder a consciência. Já a antinocicepção ou analgesia, foi evidenciada na triagem pela redução da resposta a estímulos mecânicos. O fato de a atividade sedativa ter sido observada apenas nos animais tratados com o extrato clorofórmico pode estar relacionado com os constituintes químicos presentes nas diferentes frações. Estudos posteriores da composição química do extrato e das frações se fazem necessários para identificação das classes de metabólitos secundários responsáveis por essas atividades.

O teste que avalia a coordenação motora dos roedores (Rota-rod) é um método que avalia a integridade do sistema motor. Dessa forma, o teste do rota rod detecta enfraquecimento neurológico, abrangendo incoordenação motora e relaxamento muscular, consequência comum de neurotoxicidade (MATTE; FRANÇA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). O extrato e as frações de *M. leucocephalus* testados não alteraram a coordenação motora dos animais, sugerindo ausência de atividade miorelaxante (Figuras 02; 03; 04). Dessa forma, a possível ação depressora do extrato e das frações não interferiu na coordenação motora dos camundongos.

As plantas medicinais são constituídas por um agregado de componentes químicos com atividades biológicas que podem causar efeitos adversos e interatuar com outros medicamentos quando utilizados concomitantemente (JORDAN et al., 2010; VENKATARAMANAN et al., 2006). As pessoas têm a crença de que, devido a sua origem natural, o uso de plantas como medicamentos é seguro, todavia, estudos sinalizam que muitos vegetais usados por comunidades tradicionais com fins terapêuticos podem produzir sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, entre outros efeitos tóxicos (DEBELLE et al., 2002; BALIGA et al., 2004). Diante disso, é

evidente a importância de se conduzir estudos toxicológicos para avaliar a segurança da utilização de plantas medicinais.

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto em teste ou, eventualmente, com doses parceladas em período não superior a 24h. A manutenção de alguns desses animais tratados agudamente por 7 a 14 dias, permitirá, também, verificar os efeitos tardios do tratamento e se a recuperação da ação tóxica ocorre durante esse período de observação dos animais sobreviventes. O exame patológico indicará as lesões dos órgãos afetados (LAPA et al., 2004).

Os resultados obtidos no teste de toxicidade evidenciam que o EMMML e as FCML e FHMML, administrado agudamente, não se mostraram tóxicos por via oral em camundongos, uma vez que não foram observados sintomas adversos, mortalidade ou alterações macroscópicas nos órgãos após a administração da dose limite de 2000 mg/kg. Não foi possível determinar a DL₅₀ devido a ausência de mortes. Como não houve indícios de toxicidade aguda, a realização de testes que avaliem a toxicidade crônica deverá ser o próximo passo no estudo toxicológico da espécie, assim como estudos farmacocinéticos.

Em síntese, tanto o EMMML quanto a FCML e a FHMML parecem ser atóxicos e parecem ser potencialmente promissores como agentes depressores no SNC, e o mais importante, sem promover alteração na coordenação motora, como demonstrado no teste do rota rod.

5. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F., et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora “ Cariri paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.

ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para Avaliação de Plantas com Atividade no Sistema Nervoso Central e Alguns Dados Experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia**: fundamentos práticos, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.131-137.

AZEVEDO, B.O. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex. Benth.) J.F.B. Pastore em condições de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Feira de Santana-Ba.2014.77f.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

BALIGA, M.S. et al. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of *Sapthaparna (Alstonia scholaris)* in mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 151, p.317-326, 2004.

BONJARDIM, L.R. et al. *Sida cordifolia* Leaf Extract Reduces the Orofacial Nociceptive Response in Mice. **Phytorappy Research**, v.25, n. 8, p.1236-1241, 2011.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº 6. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 1995.

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da Unicamp, 1994.p.15-30.

CARLINI, E.A. Testes Iniciais para Estudo de Drogas e Extratos com Efeito Central. In: CARLINI, E.A; MENDES, F.R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental**, São Paulo: Fap-Unifesp, 2011, p. 131-158.

CARTAXO, S.L., SOUZA, M.M., ALBUQUERQUE, U.P., 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.326-342, 2010.

DEBELLE, F.D. et al., Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, p. 431-436, 2002.

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

JORDAN, S.A.; CUNNINGHAM, D.G., MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology ans Applied Pharmacology**, v. 243, p.198-216, 2010.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2004.p.247-262.

LUCCHESI, A. M., et al. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do Semiárido da Bahia. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2005, Campinas. In: **Anais do III Simpósio Brasileiro de óleos essenciais**. Instituto Agrônômico de Campinas, 2005.

MALONE, M.H. & ROBICHAUD, R.C. A hypocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p.320-332, 1962.

MATTEI, R.; FRANÇA, C.I.F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.138-142.

OLIVEIRA, L.M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Rev. Bras.PI. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.73-78, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemecals, OECD 420. Acute oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001.

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

QUAVE, C.L., et al. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p.418-428, 2008.

VENKATARAMANAN, R.; KOMOROSKI, B.; STROM, S. In vitro and in vivo assessment of herb drug interactions. **Life Sciences** 78, 2105-2115.

CAPÍTULO 2

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO METANÓLICO E SUAS
FRAÇÕES OBTIDOS DE *MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS* (MART EX. BENTH)
J.F.B. PASTORE (LAMIACEAE) EM MODELO ANIMAL.**

RESUMO

Martianthus leucocephalus Mart. ex Benth. J.F.B. Pastore pertence à família Lamiaceae, a qual apresenta inúmeras espécies com uso medicinal. A espécie é endêmica do semiárido nordestino, onde é utilizada por comunidades locais para tratamento de distúrbios respiratórios, contudo, inexistem trabalhos que confirmem sua atividade biológica. O extrato metanólico, a fração clorofórmica e hidrometanólica dessa espécie, foram avaliados quanto à atividade antinociceptiva nos modelos do ácido acético, formalina e placa quente, utilizando-se a indometacina e a morfina como fármacos de referência. O mecanismo de ação foi avaliado no teste da placa quente utilizando naloxona. O extrato e as frações reduziram significativamente o número de contorções abdominais e o número de lambida e mordida na pata na primeira e na segunda fase do teste da formalina em todas as doses testadas. O extrato metanólico, a fração clorofórmica e a hidrometanólica aumentaram o tempo de latência ao calor no modelo da placa quente em todas as doses e em todos os tempos observados. A administração de naloxona reverteu o efeito antinociceptivo do extrato e da fração clorofórmica. Esses resultados mostram que o extrato e as frações têm ação antinociceptiva confirmados nos testes das contorções abdominais, formalina e placa quente. O mecanismo de ação confirmou que a ação é de natureza opioide. Fica demonstrado assim, o potencial de *M. leucocephalus* para a produção de fitoterápicos.

Palavras-chave: Plantas medicinais e aromáticas. Atividade biológica. Teste do ácido acético e da formalina.

ABSTRACT

Martianthus leucocephalus Mart. ex Benth. J.F.B. Pastore belongs to the Lamiaceae family, which features numerous species with medicinal use. The species is endemic to northeastern semiarid region, where it is used by local communities for treatment of respiratory disorders, however, are nonexistent studies to confirm their biological activity. The methanol extract, the chloroform fraction and hydromethanol of this species, were evaluated for antinociceptive activity in models of acetic acid, formalin and hot plate. The indomethacin and morphine were used as reference drugs. The mechanism of action was evaluated in the hot plate test using naloxone. The extract and the fractions significantly reduced the number of writhing and the number of lick and bite on the leg in the first phase of the formalin test in all tested doses. In the second phase of the formalin test, the methanol extract, the chloroform fraction and hydromethanol fraction also showed significant results. The methanolic extract and chloroform fraction increased the latency to heat in the model hot plate at all dose levels and in all observed times. The hydromethanol fraction was also capable of increasing latency to heat in doses of 75, 150 and 300 mg/Kg in all the observed times. The administration of naloxone reversed the antinociceptive effect of the extract and chloroform fraction. These results show that the extract and fractions have antinociceptive confirmed in the writhing test, hot plate and formalin. The mechanism of action confirmed that the action is opioid nature. It is thus demonstrated the potential *M. Haliaetos* for the production of herbal medicines.

Keywords: Medicinal and aromatic plants. Biological activity. Test acetic acid and formalin.

1. INTRODUÇÃO

Os remédios oriundos de plantas medicinais são utilizados em todas as partes do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é restrita (AGRA et al., 2007). A medicina moderna tem avançado bastante nas últimas décadas, no entanto, os vegetais continuam sendo utilizados e estima-se que 25 a 50% dos medicamentos utilizados como agentes terapêuticos são derivados de plantas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Contudo, devido à infinidade de espécies vegetais e de metabólitos secundários existentes na natureza, uma abordagem de bioprospecção que tem fornecido resultados promissores é a que se baseia em estudos etnofarmacológicos. Essa abordagem faz uma seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico demonstrado por comunidades tradicionais (MACIEL et al., 2002).

Nesse contexto, encontra-se a família Lamiaceae, que está entre as famílias que apresentam o maior número de espécies com uso medicinal no mundo. A família apresenta aproximadamente 7200 espécies, com 240 gêneros (HARLEY et al., 2004). O gênero *Hyptis* se destaca nessa família por ser rico em espécies de grande importância farmacológica, apresentando atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, anti-inflamatória, anti-HIV, inseticida, antinociceptiva (FALCÃO; MENEZES, 2003; RAYMUNDO et al., 2011). O gênero ocorre preferencialmente na América tropical (JUDD et al., 2009), ocupando desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, com exceção do extremo sul. O Brasil é seu centro de diversidade, com maior concentração de espécies distribuídas nos campos cerrados do Brasil Central, especialmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (BORDIGON, 1990). No bioma da caatinga encontram-se oito espécies de *Hyptis* que são endêmicas, *H. calida*, *H. leptostachys* ssp. *Caatingae*, *H. leucocephala*, *H. martiuni*, *H. pinheiroi*, *H. platanifolia*, *H. simulans* e *H. visticum* (SAMPAIO et al., 2007).

Martianthus leucocephalus (Marth. ex Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae), anteriormente designada de *Hyptis leucocephala* Marth. ex Benth. é uma erva aromática decumbente de cerca de 20 cm de altura, folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadada, ocorrente no semiárido baiano (OLIVEIRA et al., 2011), e utilizada por comunidades locais para tratamento de desordens

respiratórias (AZEVEDO, 2014). Em virtude de sua ampla utilização pelas populações locais, pesquisas na área de agronomia, buscando a domesticação, conservação e cultivo (NEPOMUCENO, et al., 2014; OLIVEIRA, et al., 2011; CERQUEIRA, et al., 2010), assim como na área fitoquímica (LUCCHESI et al., 2006) vem sendo desenvolvidas na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) com esta espécie. Esses estudos têm mostrado o potencial fitoquímico e econômico de *M. leucocephalus*, o que possibilitará a sua inserção em uma cadeia de manufatura de fitoterápicos, envolvendo desde populações locais até a indústria biotecnológica, contribuindo assim para a melhoria da renda da população do semiárido. Contudo, pesquisas que investiguem o potencial biológico de *M. leucocephalus* se fazem necessários, uma vez que inexistem estudos publicados na literatura acerca dessas propriedades na referida espécie.

Diante disso, essa pesquisa buscou avaliar a atividade antinociceptiva (*in vivo*) do extrato metanólico (EMML), da fração clorofórmica (FCML) e da fração hidrometanólica (FHMML) da parte aérea de *M. leucocephalus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Indivíduos de *M. leucocephalus* foram cultivados em solo corrigido com adubado antes do cultivo, de acordo com a análise química do solo. Para tal, foram aplicados 6.160 g de calcário dolomítico e 732,6 g de fósforo (superfosfato simples) na área total e 10 litros de composto orgânico por canteiro. As plantas foram coletadas no período da manhã, entre nove e dez horas, durante o mês de agosto do ano de 2013, na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, (UEFS), localizada a 12° 16' 00" de latitude sul e 38° 58' 00" de longitude oeste, apresentando altitude de 234 metros e temperatura média anual de 24°. A identificação botânica foi realizada no herbário da UEFS (HUEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 25.322). Após a coleta, foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPRON). O material recém coletado foi colocado para secar à temperatura

ambiente e posteriormente a parte aérea das plantas (caule, folhas e flores) foi triturada com auxílio de um moinho de facas.

2.2 Preparo do extrato e frações

Após secagem e moagem, o pó foi então pesado e submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com metanol em erlenmeyer. Os extratos brutos foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom 802), sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão para obtenção do EMMML seco. 20g do EMMML foi dissolvida em metanol à temperatura ambiente e filtrada, adicionando-se água destilada a esta solução a uma proporção de 7:3 (água; metanol, v/v), particionando-se por três vezes com clorofórmio (1:1), resultando nas FCML e FHMML. A FCML foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-45°C. Enquanto a FHMML teve o metanol evaporado em capela de exaustão e a solução final foi liofilizada (Liofilizador Terrone Enterprise I). Esses experimentos foram realizados no LAPRON, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana – Ba. As etapas do processo encontram-se ilustradas na figura 01 do capítulo 01.

2.3 Animais

Todos os experimentos foram realizados com camundongos suíços (n=8) (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) machos, adultos, com peso corporal variando entre 25-35g, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso à comida e água. Duas horas antes de cada procedimento, os animais receberam apenas água para evitar que os alimentos pudessem interferir com a absorção da substância. Todos os experimentos foram previamente aprovados pela Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS, protocolo número 006/2012) – Anexo 1.

2.4 Administração das drogas e extratos

Como controle positivo do experimento foi utilizado indometacina, a qual foi diluída em solução de bicarbonato de sódio imediatamente antes da utilização. O EMMML e as FCML e FHMML foram dissolvidos em twenn 80 e em água destilada e administrado via oral (v.o) em doses de 75, 150 e 300 mg/kg. A indometacina intraperitoneal (i.p.) e morfina (v.o.) (10mg/kg) foram utilizadas como fármacos padrão de referência. Aos animais do grupo controle foi administrado o veículo (água destilada e Twenn 80, 0,1ml/10g, v.o.).

2.5 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A metodologia empregada para realização deste teste foi descrita por Koster et al. (1959). Grupos de oito camundongos foram tratados com as três doses do extrato e das frações, além de dois grupos que foram tratados com indometacina e veículo. Após 60 minutos da administração do EMMML, FCML, FHMML, e do veículo e 30 minutos da indometacina, o ácido acético a 0,85% (0,1mL/10g) foi injetado por via i.p. e o número de contorções abdominais foi contado durante um período de 15 minutos após 5 minutos iniciais.

2.6 Teste da formalina

Grupos (n=8) de animais receberam o veículo, as dosagens do EMMML, da FCML e FHMML e a indometacina, que foi usado como controle positivo. Uma hora depois dos tratamentos com o extrato e veículo, e meia hora depois da aplicação da indometacina, os indivíduos receberam na região intraplantar da pata posterior direita uma injeção de formalina a 2,5% (20µL de formalina). O tempo de lambida (s) e/ou mordidas na pata foi cronometrado em duas fases da resposta nociceptiva: 0-5 minutos após a injeção de formalina e 15-30 minutos após a injeção de formalina, conforme metodologia proposta por HUNSKAAR e HOLE (1987).

2.7. Teste da placa quente

Os animais foram testados de acordo com o método descrito por Woolfe e MacDonald (1944). A placa quente (equipamentos Insight, Brasil) foi mantida a temperatura de $55^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (PIETROVSKI et al, 2006). Os grupos (n=8) de camundongos receberam as dosagens do EMMML, da FCML e da FHMML, o veículo e a morfina, em seguida, foram acondicionados na superfície da placa 30, 60 e 120 minutos após a administração dos compostos. O tempo decorrido entre a colocação do animal na placa e a ocorrência de lambida das patas traseiras ou comportamento de pular foi registrado como latência. Para minimizar danos às patas dos animais, o tempo máximo de permanência na placa foi de 30 segundos (SILVA et al, 2005).

2.8. Avaliação do mecanismo de ação

O possível envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo do EMMML e na FCML (300mg/kg) foi testado. O ensaio da placa quente foi usado para investigar este mecanismo. Grupos de oito animais foram pré-tratados com o antagonista opióide naloxona (5mg/kg, via subcutânea, s.c.) 30 minutos antes da administração do EMMML, FCML e da morfina. Os grupos tratados com morfina (10mg/kg), EMMML e FCML foram usados como controle positivo, enquanto que o controle negativo foi tratado com água destilada e Tween 80 (v.o). Os testes do ácido acético, formalina sub-plantar e placa quente foram executados no LAFAR, UEFS, Feira de Santana, Ba.

2.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados dos testes do ácido acético, formalina e placa quente foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnet, utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 6.0. No mecanismo de ação da placa quente foi utilizado o pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os resultados obtidos demonstraram que o EMMML, FCML e FHMML apresentaram efeito significativo de antinocicepção no modelo animal testado. Os animais, após tratamento com o EMMML nas doses de 75,150 ou 300 mg/kg, apresentaram uma redução significativa nas contorções abdominais (Figura 01) com valores de $16,30 \pm 1,30$; $11,70 \pm 1,59$; $10,70 \pm 1,87$, respectivamente, em relação ao grupo controle tratado com veículo com valor de $39,80 \pm 4,15$ contorções. A indometacina (i.p.), droga padrão utilizada, demonstrou uma redução significativa ($p < 0,001$) com valores de $2,30 \pm 4,15$ contorções, como esperado.

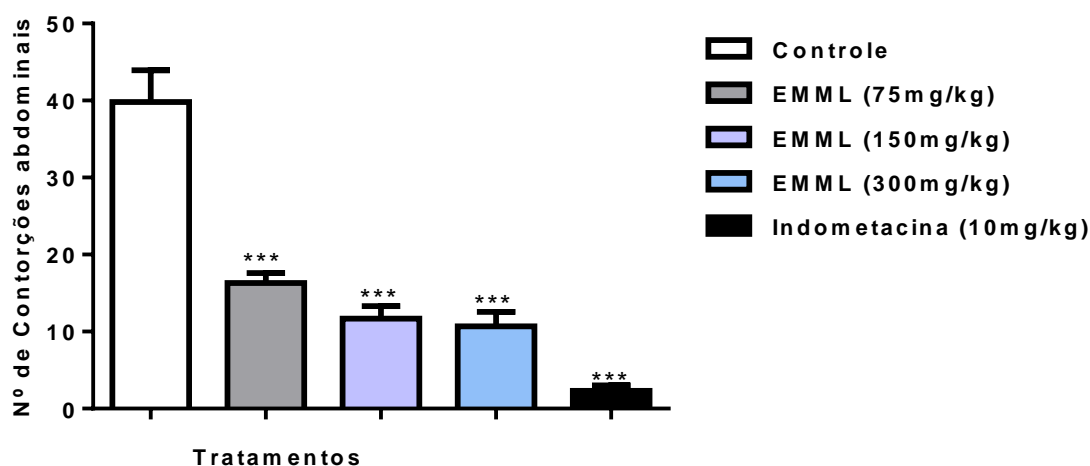


Figura 01: Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

A FCML promoveu inibição significativa no número de contorções abdominais nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg (Figura 02) com valores de $16,2 \pm 2,74$; $20,50 \pm 2,13$; $16,70 \pm 2,76$, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle, com $34,6 \pm 3,43$ contorções, bem como no grupo tratado com indometacina com valores de $1,50 \pm 0,79$ contorções abdominais.

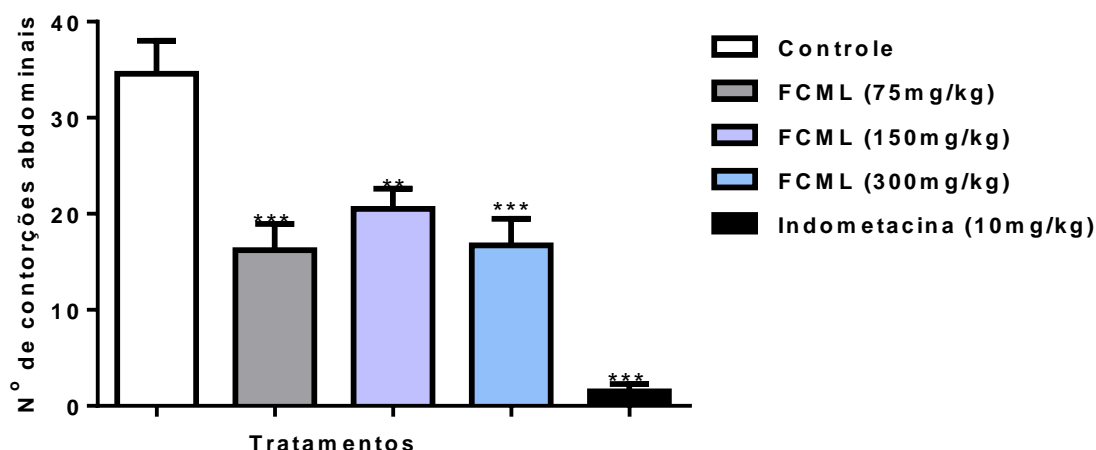


Figura 02. Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). ***p<0,001; **p<0,01 vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Os animais tratados com as doses de 75, 150 ou 300 mg/kg da FHMML apresentaram redução bastante significativa das contorções abdominais com valores de $11,25 \pm 0,75$; $11,0 \pm 1,23$; $11,75 \pm 2,16$, respectivamente (Figura 03), quando comparados com os animais do grupo controle com $41,0 \pm 2,97$ contorções. A indometacina promoveu inibição de $1,37 \pm 0,41$ contorções, de acordo com o esperado.

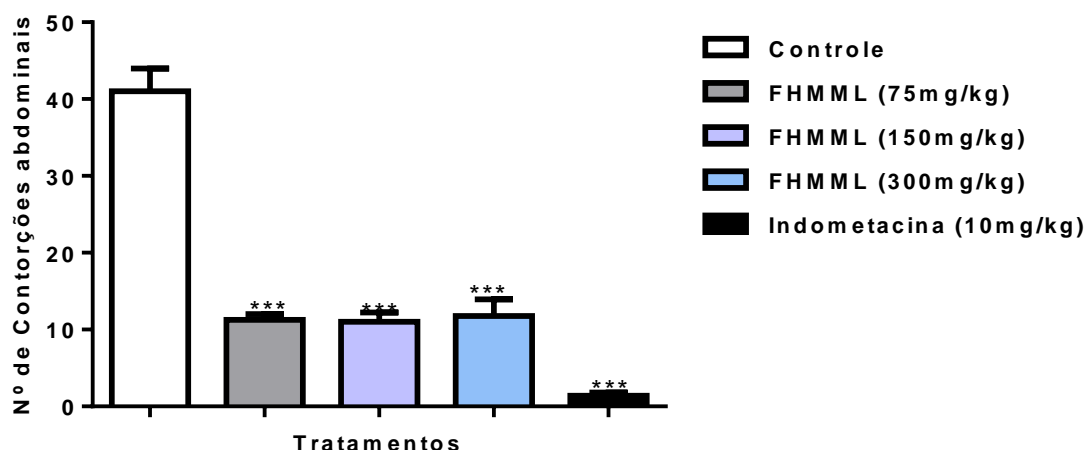


Figura 03: Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). ***p<0,001 vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

3.2 Teste da formalina

O EMMML nas doses de 75, 150 ou 300 mg/kg reduziu de forma significativa o tempo de lambidas e mordidas na pata dos animais, tanto na fase 1 (neurogênica) com valores de $22,00 \pm 2,232$; $26,88 \pm 3,93s$; $20,13 \pm 1,17s$, respectivamente (Figura 04), quanto na fase 2 (inflamatória) com valores de $33,75 \pm 6,45s$; $39,63 \pm 9,86s$; $33,25 \pm 14,78s$, respectivamente (Figura 05), quando comparadas aos animais do grupo controle (fase1: $68,38 \pm 3,48s$; fase 2: $103,5 \pm 20,43s$). Essa redução foi similar à provocada pela indometacina.

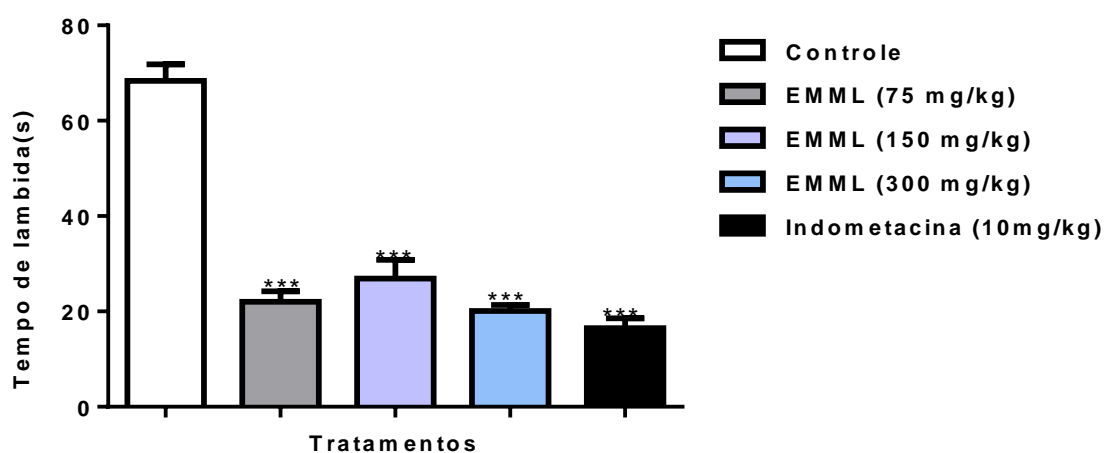


Figura 04: Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m.(n=8). ***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet).Feira de Santana, 2015.

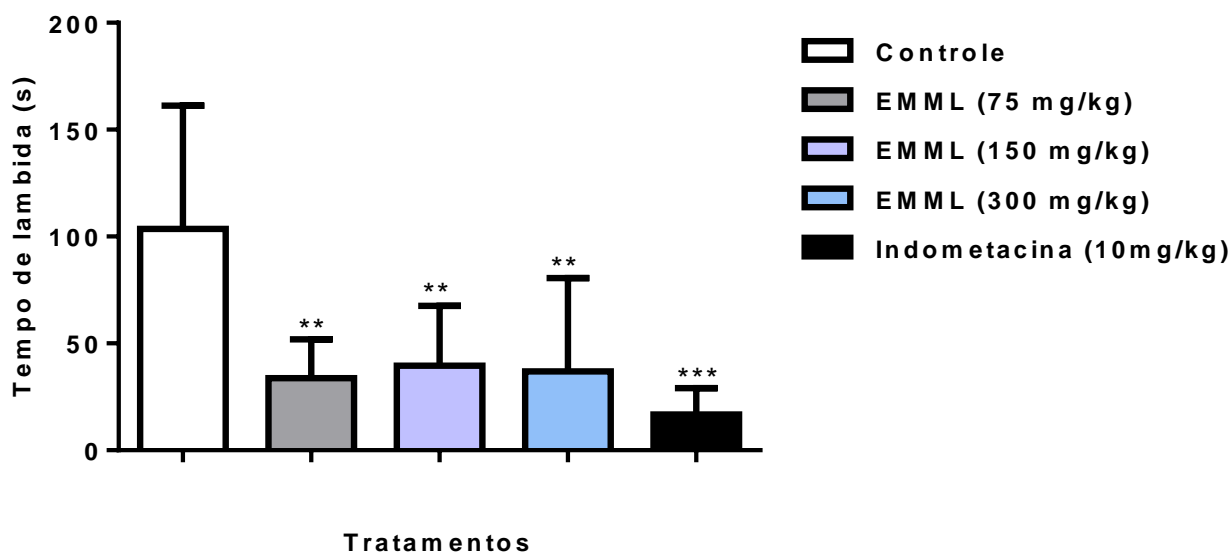


Figura 05. Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01;***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

De modo semelhante, os camundongos administrados com a FCML apresentaram redução significativa no tempo de lambidas e mordidas na pata quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$), com redução similar à indometacina em ambas as fases. Na fase 1 (Figura 06), o tempo foi de $12,88 \pm 2,66s$; $23,50 \pm 5,16s$; $14,50 \pm 2,73s$; nas doses de 75, 150 ou 300mg/kg, respectivamente, quando comparados ao grupo controle, com $68,38 \pm 3,48s$. Na segunda fase (Figura 07), o tempo de lambidas e mordidas tiveram valores de $17,38 \pm 6,29s$; $9,25 \pm 3,73s$; $9,75 \pm 9,47s$; nas dosagens de 75, 150 ou 300mg/kg, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle com valores de $101,0 \pm 20,78s$.

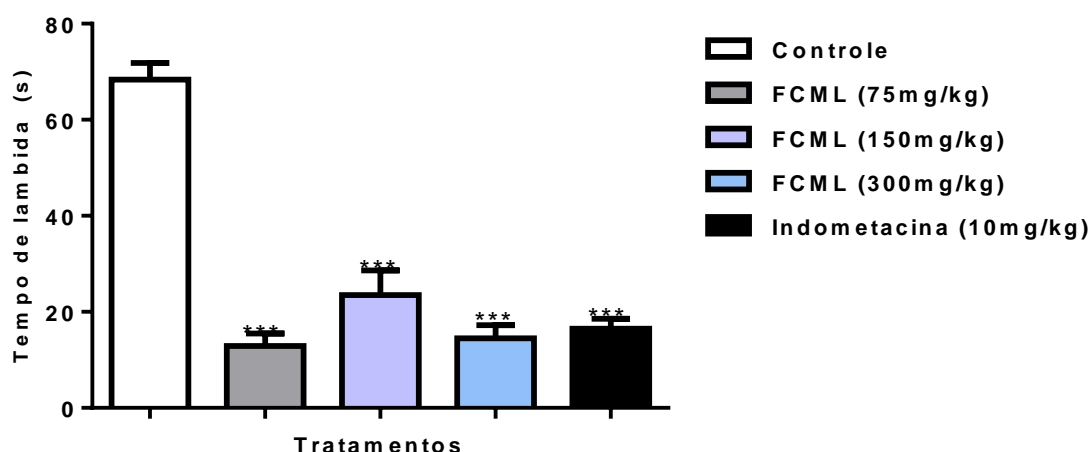


Figura 06. Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média ± e.p.m.(n=8). ***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

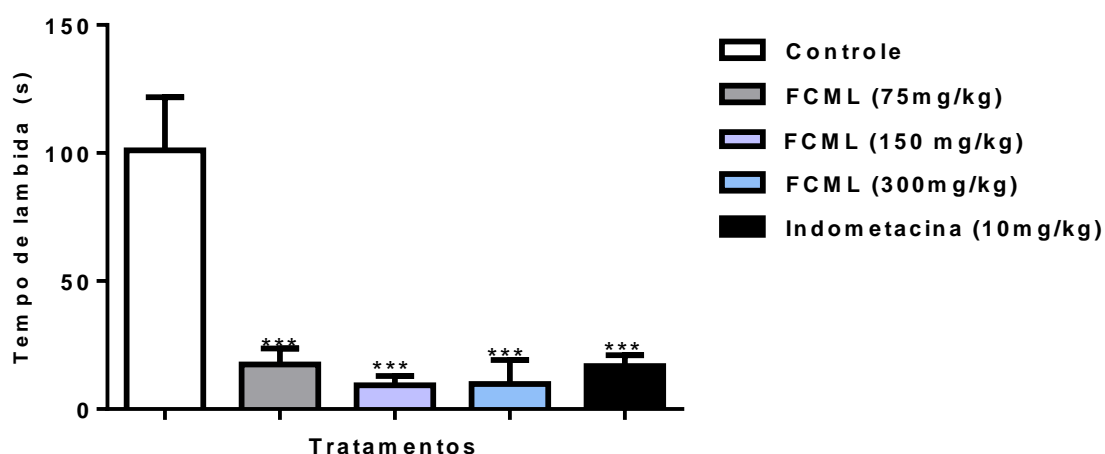


Figura 07. Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média ± e.p.m.(n=8). ***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Nas duas fases do teste da formalina, a FHMML diminuiu o tempo de lambidas e mordidas na pata em todas as doses avaliadas em relação ao grupo controle (Fase 1: 68,38 ± 3,48s; Fase 2: 107,31 ± 21,56s) com valores de 25,25 ± 3,65s; 23,25 ± 4,73s; 32,88 ± 5,85s para a fase 1 nas dosagens de 75, 150 e 300mg/kg, respectivamente (Figura 08), e 37,38 ± 10,63s; 28,25 ± 8,70s; 34,50 ± 12,21s para a fase 2 nas doses de 75, 150 e 300mg/kg, respectivamente (Figura 09). O tempo de mordidas e lambidas na pata no grupo tratado com indometacina

(10mg/kg) foi de $16,50 \pm 2,07s$ e $16,75 \pm 4,37s$ para primeira e segunda fase respectivamente.

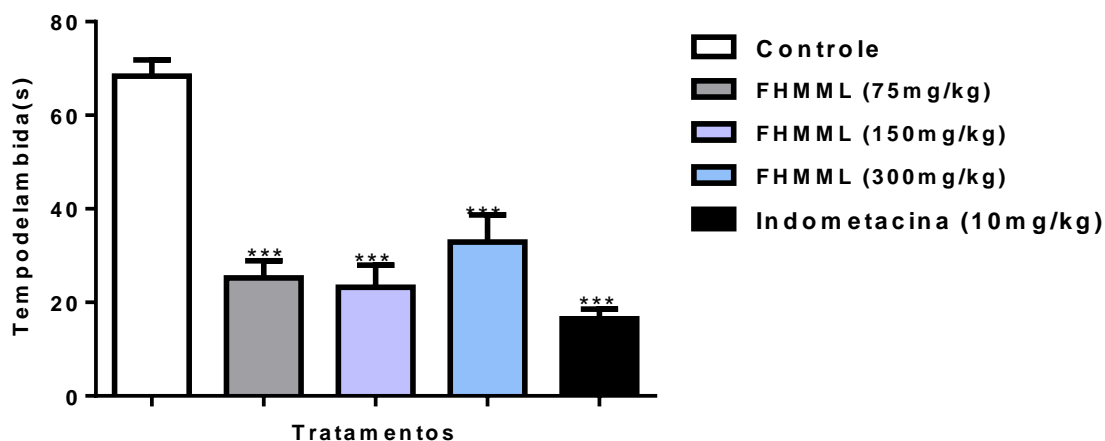


Figura 08: Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m.(n=8). ***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

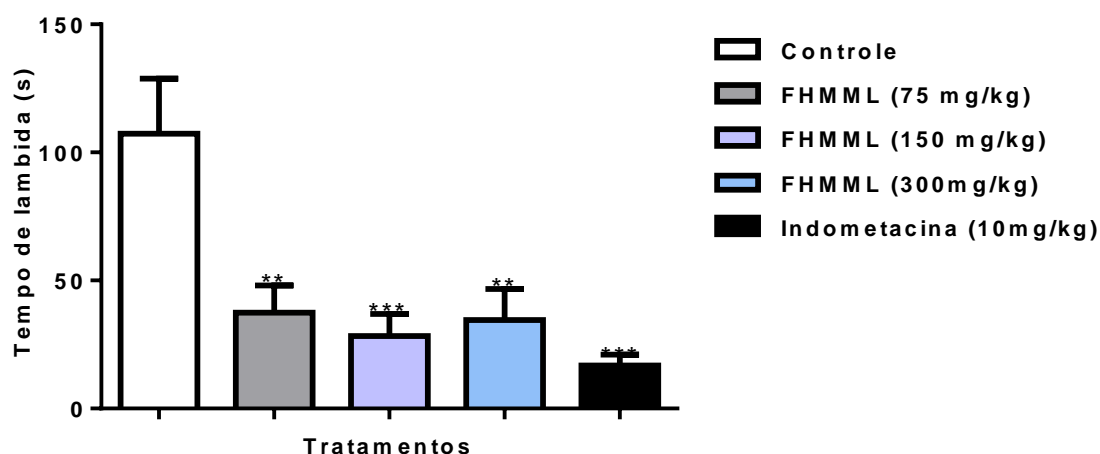


Figura 09: Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m.(n=8). **p<0,01; ***p<0,001 vs controle (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

3.4. Teste da placa quente

Os resultados obtidos no teste da placa quente demonstraram que o EMMML, após 30 minutos da sua administração, promoveu um aumento significativo da latência nas três doses utilizadas (T_{30} : 75mg/kg, $25 \pm 2,3s$; 150mg/kg, $23 \pm 2,3s$ e 300mg/kg, $26 \pm 1,6s$), em resposta ao estímulo térmico quando comparado com o grupo controle (T_{30} : $11 \pm 1,9s$) (Figura 10). Após 60 minutos da sua administração

observou-se que o mesmo efeito continuou em relação ao controle (T_{60} : $14\pm 1,5s$), nas três doses testadas, com tempo de latência de (T_{60} : $75mg/kg$, $26\pm 1,3s$; $150 mg/kg$, $19\pm 3,0s$ e $300mg/kg$, $25\pm 2,1s$). Após 120 minutos da administração do EMMML o aumento da latência em relação ao estímulo térmico continuou em relação ao controle (T_{120} : $12\pm 2,0s$) nas três doses avaliadas (T_{120} : $75mg/kg$, $27\pm 1,5s$; $150mg/kg$, $22\pm 2,5s$ e $300 mg/kg$, $24\pm 3,0s$). Os resultados obtidos com o grupo administrado com morfina ($10mg/kg$) foram significativamente diferentes dos obtidos no grupo controle, em todos os tempos de observação (T_{30} : $24\pm 1,9s$; T_{60} : $25\pm 2,5s$; T_{120} : $26\pm 2,1s$).

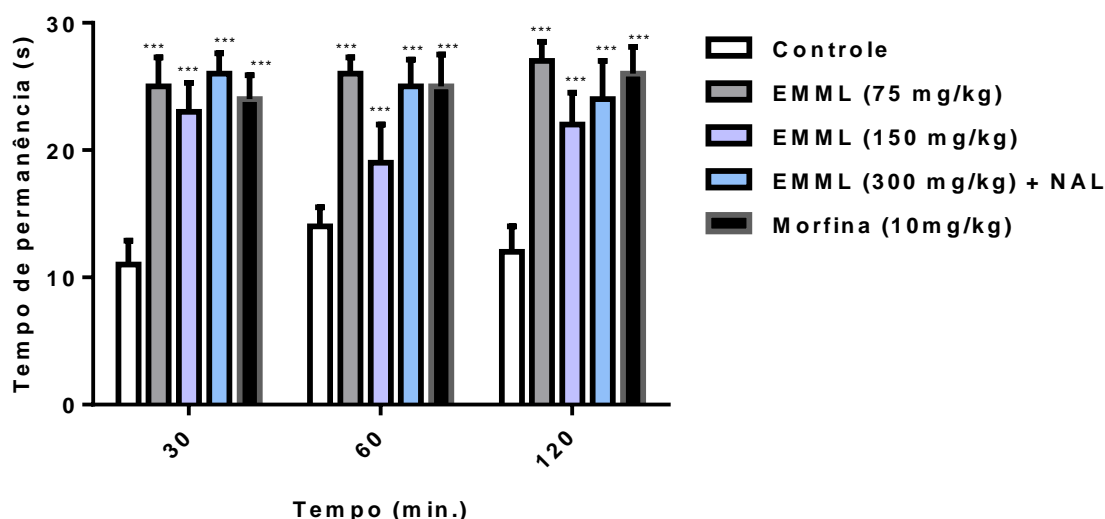


Figura 10: Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. ($n=8$). *** $p<0,001$ vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Do mesmo modo, as doses de 75, 150 e 300 mg/kg da FCML induziram um aumento significativo da latência ao estímulo térmico no teste da placa quente nos tempos de observação de 30, 60 e 120 minutos com valores de ($75mg/kg$, T_{30} : $21\pm 2,4s$; T_{60} : $28\pm 2,1s$; T_{120} : $20\pm 1,3s$); ($150mg/kg$, T_{30} : $14\pm 1,4s$; T_{60} : $19\pm 3,0s$; T_{120} : $19\pm 2,3s$); ($300 mg/kg$, T_{30} : $20\pm 3,1s$; T_{60} : $25\pm 2,1s$; T_{120} : $21\pm 2,9s$) em relação ao controle (T_{30} : $11\pm 1,9s$; T_{60} : $14\pm 1,5s$; T_{120} : $12\pm 2,0s$) (Figura 11). Os resultados obtidos com o grupo administrado com morfina ($10mg/kg$) foram significativamente diferentes dos obtidos no controle, em todos os tempos de observação (T_{30} : $24\pm 1,9s$; T_{60} : $25\pm 2,5 s$; T_{120} : $26\pm 2,1s$).

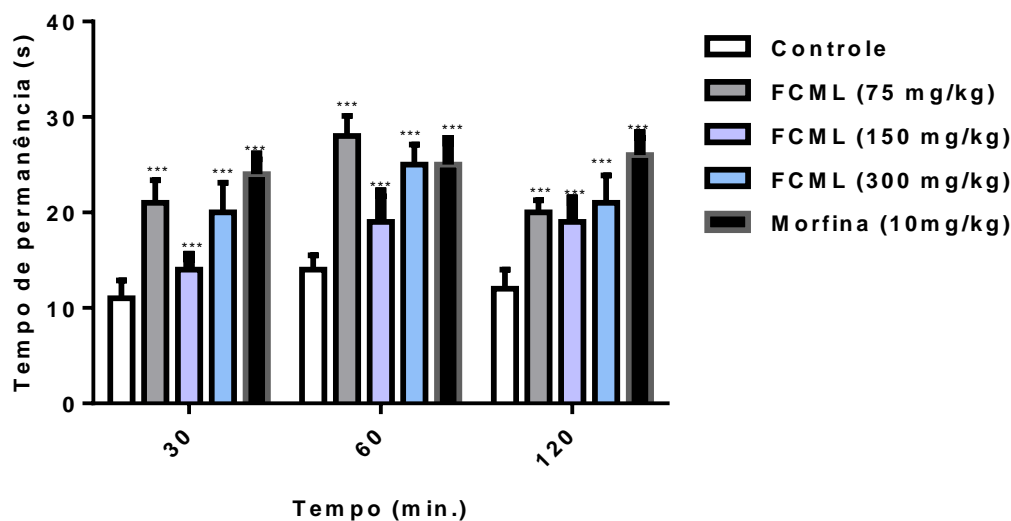


Figura 11: Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J. F. B. Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). ***p<0,001 vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Nos resultados obtidos para a atividade da FHMML sobre os camundongos, no teste da placa quente, verifica-se que todas as doses testadas (75mg/kg, T₃₀: 14 \pm 1,3s; T₆₀: 17 \pm 3,1s; T₁₂₀: 18 \pm 2,2s; 150mg/kg, T₃₀: 17 \pm 2,5s; T₆₀: 18 \pm 2,2s; T₁₂₀: 17 \pm 3,0s; 300mg/kg, T₃₀: 13 \pm 1,4s; T₆₀: 12 \pm 2,2s; T₁₂₀: 17 \pm 2,5s) foram capazes de aumentar a latência ao estímulo térmico em todos os tempos avaliados em relação ao grupo controle (T₃₀: 11 \pm 1,9s; T₆₀: 14 \pm 1,5s; T₁₂₀: 12 \pm 2,0s) (Figura 12). No grupo administrado com morfina (10mg/kg) verificou-se efeito significativamente diferente do obtido no controle, em todos os tempos de observação (T₃₀: 24 \pm 1,9 s; T₆₀: 25 \pm 2,5 s; T₁₂₀: 26 \pm 2,1s).

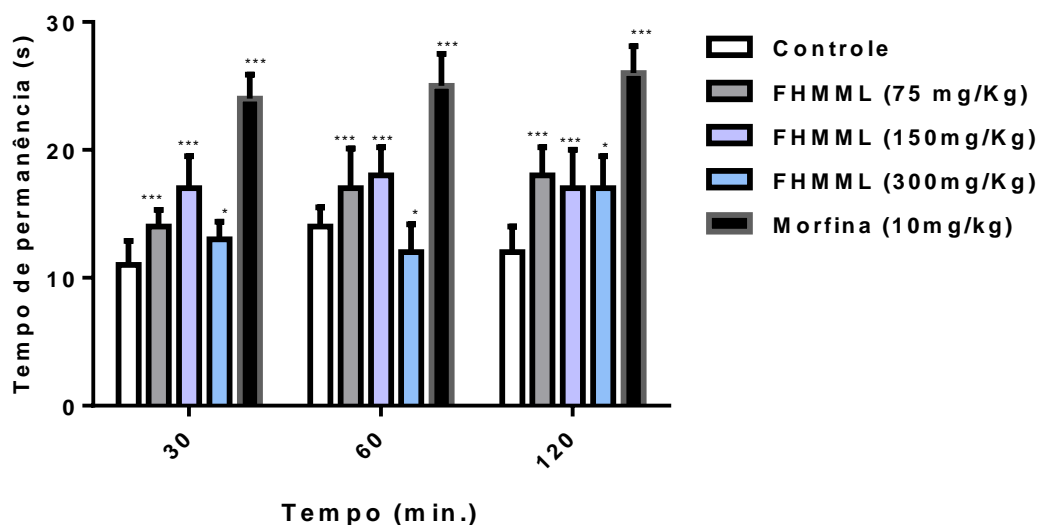


Figura 12: Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore na latência da dor avaliada pelo teste da placa quente em camundongos. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=8). ***p<0,001; *p<0.01 vs controle. (ANOVA – seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Os resultados obtidos demonstram que o efeito antinociceptivo do EMML e da FCML na dose de 300mg/kg (EMML, T_{30} : $11 \pm 1,7$ s; T_{60} : $10 \pm 0,98$ s; T_{120} : $10 \pm 2,0$ s; FCML, T_{30} : $12 \pm 1,1$ s; T_{60} : $10 \pm 1,8$ s; T_{120} : $14 \pm 2,4$ s) foi revertido pela naloxona (5mg/kg), indicando portanto, uma possível participação do sistema opioide. O comportamento da morfina (T_{30} : $12 \pm 0,91$; T_{60} : $9,0 \pm 1,9$; T_{120} : $6,5 \pm 1,2$), conforme esperado, também foi revertido pela naloxona (Figura 13).

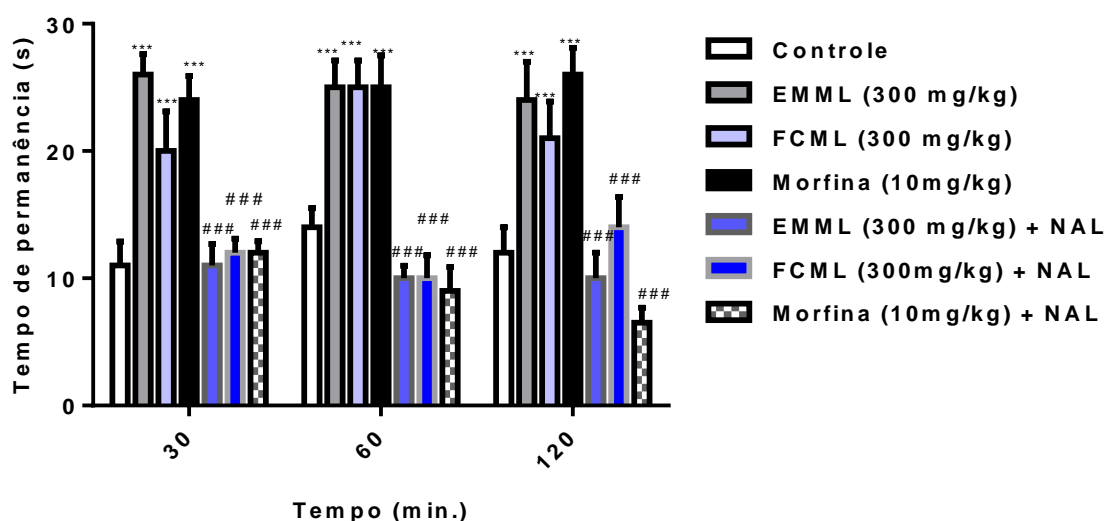


Figura 13: Efeito do extrato metanólico, fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore e da morfina (10mg/kg) no teste da placa quente. As valores estão expressos como média \pm e.p.m.(n=8). Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação com o grupo controle (***) $p < 0,001$). Os sustentados representam o nível de significância entre grupos tratados com naloxona e aqueles tratados com EMLL, FCML e Morfina (###) $P < 0,001$). (ANOVA-seguido de TuKey). Feira de Santana, 2015.

4. DISCUSSÃO

Três modelos agudos de testes nociceptivos foram utilizados. Dentre eles, dois modelos de nocicepção química – teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER et al., 1959) e teste da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987) e um modelo de nocicepção térmica – teste da placa quente (WOOLFE E MACDONALD, 1944; PIETROVISKI et al., 2006). O mecanismo de ação de *M. leucocephalus* sobre os receptores opioides foi apurado por meio da administração de morfina, agonista opioide e de seu antagonista, naloxona.

O EMLL e as FCML e FHMLL da espécie avaliada no presente estudo demonstraram ação antinociceptiva quando testados no modelo de nocicepção química das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O teste do ácido acético baseia-se no fato de que uma injeção via i.p. de ácido acético (0,85%) provocará uma reação nociceptiva, caracterizada por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER et al., 1959). Este modelo tem sido usado como ferramenta de rastreamento para avaliação de agentes analgésicos ou anti-inflamatórios (COLLIER et al., 1968). Postula-se que o ácido

acético atua indiretamente por induzir a liberação de mediadores endógenos, os quais estimulam os neurônios nociceptivos que são sensíveis às drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES). Diferentes mediadores são liberados para o fluido peritoneal e são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, reduzir o limiar da nocicepção e estimular os terminais nervosos das fibras nociceptivas (DERAETD et al., 1980; IKEDA et al., 2001).

A redução das contorções abdominais apresentadas pelos animais revelou que o EMMML, FCML e FHMML (Figuras 01; 02 e 03) induziram inibições bastante significativas na administração por v.o. aos animais em todas as doses testadas. Esses resultados apontam o efeito antinociceptivo da espécie, sugerindo uma ação sobre o sistema nervoso central e sobre processos anti-inflamatórios, quando comparados ao grupo controle tratados com veículo. Estes resultados são similares aos observados na presença da indometacina, fármaco padrão utilizado.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético tem baixa especificidade para respostas antinociceptivas, portanto, testes adicionais são necessários para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, uma vez que, uma variedade de compostos, principalmente não-analgésicos, tais como anti-histamínicos, relaxantes musculares, antagonistas de serotonina, entre outros, também inibem as contorções (HENDERSHOT; FORSAITH, 1959). Em função da necessidade de testes adicionais para superar a baixa especificidade do teste do ácido acético foi utilizado o teste da formalina sub plantar. Trata-se de um método comportamental para estudo de nocicepção em animais que mede a resposta a um estímulo nociceptivo de longa duração, portanto, se aproxima mais da dor clínica (DENNIS; MELZACK, 1980a; DENNIS, MELZACK, 1980b) que outros métodos que medem a resposta apenas à um breve estímulo nocivo (DENNIS; MELZACK, 1980a). A primeira fase (0 a 5 min) é resultante da estimulação direta de nociceptores. Essa fase se caracteriza por uma dor não-inflamatória e tem a presença de mediadores tais como substância P, glutamato e bradicinina (HUNSKAAR; HOLE, 1987) . Já a segunda fase (15 a 30 min) caracteriza-se por uma resposta inflamatória, onde diversos mediadores da inflamação, incluindo histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina, participam do processo (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; CORRÊA; CALIXTO, 1993). Sendo assim, acredita-se que o comportamento nociceptivo na fase inicial é resultado da ativação imediata dos nociceptores periféricos, enquanto que na fase

posterior uma combinação da queda da atividade dos aferentes primários e aumento da sensibilidade dos neurônios da medula espinhal é responsável pelo comportamento nociceptivo (BITTENCOURT; TAKAHASHI, 1997; MALMBERG; YAKSH, 1992).

O extrato e as frações da parte aérea de *M. leucocephalus* avaliados apresentaram efeito na nocicepção em camundongos em ambas as fases do teste da formalina (Figuras 04 a 09). Este padrão de efeito é semelhante ao observado para o óleo essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth., o qual apresentou eficácia em ambas as fases (BRAVIM, 2008) e diferiu do observado para o extrato aquoso de *Hyptis fruticosa* Salmz. Ex Benth., que apresentou eficácia apenas na primeira fase. Divergiu também do resultado encontrado com o extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (L.) Poit., cujo efeito antinociceptivo se deu somente na segunda fase (BISPO, 2001). Drogas de ação central inibem as duas fases do teste da formalina, enquanto que drogas de ação periférica inibem apenas a segunda fase (TJOLSEN, et al, 1992; HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA, et al., 1989), que é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores tais como prostaglandinas, que são inibidas por fármacos anti-inflamatórios. A indometacina, fármaco padrão utilizado nesse teste, é um inibidor de ciclo-oxigenase e age diminuindo os níveis de PGE₂ (BURKA, 1979).

Assim, pode-se inferir que o EMMML e as FCML e FHMML possuem atividade do tipo opióide causando a dessensibilização das fibras periféricas responsáveis pela aferência dos sinais algícos, como também um presente efeito anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2014).

O teste da placa quente, por sua vez, é amplamente utilizado para avaliação de analgésicos que atuam a nível central, que elevam o limiar da dor ao estímulo térmico em camundongos (HIRUMA-LIMA et al., 2000), e provoca uma resposta aguda nociceptiva não-inflamatória (ZAKARIA et al., 2008). O aumento no tempo de reação dos animais na placa quente após a administração do EMMML (Figura 10), FCML (Figura 11) e FHMML (Figura 12) sugere uma atividade analgésica central. O mecanismo de ação do EMMML e da FCML (Figura 13) foi investigado por meio do antagonista opióide seletivo naloxona e sugere que a ação apresentada é de natureza opióide.

Ao final deste estudo pode-se concluir que os três testes nociceptivos utilizados indicaram a ação do extrato e das frações da parte aérea de *M.*

leucocephalus. Assim, os resultados obtidos apontam o potencial da espécie *M. leucocephalus* para produção de fitoterápicos, havendo, contudo, a necessidade de novos fracionamentos e isolamento das substâncias responsáveis por tais efeitos.

5. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F., et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 111, p.383-395, 2007.

AZEVEDO, B.O. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex. Benth.) J.F.B. Pastore em condições de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Feira de Santana-Ba.2014.77f.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

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

BITTENCOURT, A.L., TAKAHASHI, R.N. Mazindol and licodaine are antinociceptives in the mouse formalin model: involvement of dopamine receptor. **European Journal of Pharmacology**, v.330, p.109-113, 1997.

BORDIGON, S.A. **O gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul.** 1990. 1v. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, UFRGS, Rio Grande do Sul.

BRAVIM, L. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth.** 2008. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

BURKA, J.F; Flower, R.J. Effects of modulation of arachidonic acid metabolism on the synthesis and release of slow reacting substance of anaphylaxis. **British Journal of Pharmacology**, v.65, p.35-41, 1979.

CERQUEIRA, M.M.L; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Efeito de retardantes de crescimento na conservação *in vitro* de *Hyptis leucocephala*. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 2010.

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

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

DENNIS, S.G.; MELZACK, R., Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by 3 pain tests, **Experimental Neurology**,v.69, p.260-270, 1980a.

DENNIS, S.G., MELZACK, R., Gutman, S. and Boucher, F., Pain modulation by adrenergic agents and morphine as measured by three pain tests, **Life Science**,v. 26, p.1247-1259, 1980b.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandin E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**. V. 51, p.17-24,1980.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero Hyptis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.84, n.3, p.69-74, 2003.

HARLEY, R.M. Labiatae. In: KADEREIT, J.W. (ed.) **The families and genera of vascular plants** . Springer, Berlin & Heidelberg, 2004, pp. 167–275.

HENDERSHOT, L.C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.125, n.3. p237-240, 1959.

HIRUMA-LIMA et al. The juice of fresh leaves of Boerhavia diffusa L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.267-274, 2000.

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

IKEDA, Y., UENO, A., OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acetic acid-induced writhing response of mice. **Life Science**. v. 69, p.2911-2919, 2001.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632p.

KOSTER, R; ANDERSON, M; DEBBER, EJ. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**.v.18. p.412-4, 1959.

LUCCHESI, A.M., et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindoia, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V. ; **Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares**; Química Nova, v.25, nº3,p. 429-438,2002

MALMBERG, A.B.,YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 263, p.136-146, 1992.

NEPOMUCENO, C.F. Germinação *in vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n.4, p.886-895, 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.

OLIVEIRA, L.M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Palntas Mediciniais**, Botucatu,v.13,n.1,p73-78, 2011.

OLIVEIRA, et al. Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das flohas de trevo-roxo (*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. Ex Benth. – Lamiaceae) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n..2, p. 174-181, 2014.

PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

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

SAMPAIO, E.S.B. et al. **Vegetação & Flora da Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste – APNE; Centro Nordestino de Informações sobre Plantas – CNIP, 2002. 176p.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**,v. 38, p. 347-352, 1989.

SILVA, M. G.; OLIVEIRA, F. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, T. M. L.; DINIZ, M. F. F. M. Investigação do efeito analgésico central e anti-inflamatório de *Canocliniopsis prasifolia* (DC.) R. M. King & H. Robinson em roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 533-537, 2005.

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

WOOLF, G; MACDONALD, AD. The evaluation of the analgesic action of pettidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

ZAKARIA, Z.A. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p.179-187, 2008.

Capítulo 3

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO METANÓLICO E SUAS
FRAÇÕES OBTIDOS DE *MARTIANTHUS LEUCOCEPHALUS* (MART EX.
BENTH.) J.F.B. PASTORE (LAMIACEAE) EM MODELO ANIMAL.**

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroidais são utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios agudos, porém, esses medicamentos estão associados a diversos efeitos colaterais. Nesse sentido, a pesquisa e a produção de medicamentos a base de vegetais tem sido uma tendência no momento. Entre os vegetais utilizados nesses estudos destaca-se os pertencentes à família Lamiaceae, bem representativa na região do semiárido brasileiro, com inúmeras espécies detentoras de propriedades farmacológicas já comprovadas cientificamente. *Martianthus leucocephalus* é uma erva aromática pertencente a esta família, endêmica do semiárido nordestino e teve a sua atividade anti-inflamatória avaliada nesse estudo. Os modelos utilizados para avaliar a resposta à inflamação aguda foi o teste do edema de pata induzido por carragenina e o teste da permeabilidade capilar induzida por ácido acético. A indometacina foi utilizada como fármaco padrão. A atividade anti-inflamatória do extrato metanólico, fração clorofórmica e fração hidrometanólica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* foi evidenciada no teste do edema de pata. Por outro lado, no teste da permeabilidade capilar induzida por ácido acético, apenas o extrato metanólico promoveu resultado significativo frente ao grupo controle. Verificou-se que o extrato metanólico e as frações clorofórmica e hidrometanólica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* mostraram eficácia anti-inflamatória.

Palavras-chave: Inflamação. Edema de pata. Permeabilidade capilar.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are used in the treatment of acute inflammatory disorders, but these drugs are associated with several side effects. In this sense, the research and the production of plant-based medicines has been a trend at the moment. Among the vegetables used in these studies stands out those belonging to the Lamiaceae family, and representative in the Brazilian semiarid region, with numerous species holding pharmacological properties scientifically proven. *Martianthus leucocephalus* is an aromatic herb belonging to this family, endemic to the semi-arid northeast and had its anti-inflammatory activity evaluated in this study. The models used to assess response to acute inflammation of the paw edema test induced by carrageenan and the test capillary permeability induced by acetic acid. Indomethacin was used as a standard drug. The anti-inflammatory activity of the methanol extract, chloroform fraction and hydromethanol fraction of shoots *Martianthus leucocephalus* was evidenced in the paw edema test. On the other hand, the test of capillary permeability induced by acetic acid, only the methanol extract caused a significant result with the control group. It was found that the methanol extract and chloroform fractions and hydromethanol shoots of *Martianthus leucocephalus* showed anti-inflammatory efficacy.

Keywords: Inflammation. Paw edema. Capillary permeability.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta não específica da microcirculação do tecido lesionado provocado por estímulos biológicos, físicos, químicos ou pela combinação destes (NATHAN, 2002). Quando existe uma perda de controle homeostático deste processo, a inflamação executa uma função prejudicial e favorece o surgimento e agravamento de doenças (XU et al., 2014). A reação inflamatória se caracteriza por uma cascata de eventos vasculares e celulares onde sinais clássicos da inflamação, tais como, rubor, calor, tumor e dor, se fazem presentes (GILROY et al., 2004). Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos, necrose, apoptose e liberação de mediadores químicos são alterações fisiológicas que se associam aos sinais clássicos (VIVIER; MALISSEN, 2005).

A inflamação aguda é a principal resposta da imunidade inata. Usualmente é rápida, agindo durante horas a dias e envolve modificações vasculares com exsudação de fluidos e proteínas do plasma e também a migração de elementos vasculares, a exemplo dos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos (HOCHBERG, 2010). Já a fase crônica da inflamação acontece quando o processo dura mais de três meses. Nesta fase, as células mais ativas são as mononucleares, entre elas os linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Os eventos principais da fase crônica são a angiogênese e a fibrose com formação de granuloma (HOCHBERG, 2010).

Atualmente, as drogas anti-inflamatórias não esteroidais são usadas no tratamento de distúrbios inflamatórios agudos. No entanto, esses medicamentos estão associados a vários efeitos adversos, portanto, a tendência no momento é a produção de medicamentos a base de vegetais, uma vez que os fitoterápicos apresentam menos efeitos colaterais (KUMARI, 2014). Assim, espera-se que novos conhecimentos e novas necessidades possibilitem a descoberta e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos, com maior eficiência de ação (SCHENKEL et al., 2004).

Adicionalmente, o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicas pode se configurar como estratégia para o enfrentamento das desigualdades regionais existentes no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O semiárido brasileiro possui uma riqueza extraordinária em vegetais detentores de

atividades biológicas e de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais (ALBAGLI, 2001). Toda essa riqueza se contrapõe à existência de grandes bolsões de pobreza, tornando o semiárido um espaço promissor para o desenvolvimento agrícola e comercial de plantas medicinais e fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) A família Lamiaceae representa bem essa região com espécies com as mais diversas propriedades farmacológicas e por esse motivo, utilizadas por comunidades tradicionais na cura das mais variadas doenças (CARTAXO, 2010). A atividade anti-inflamatória dessa família já foi investigada e confirmada em espécies do gênero *Hyptis*, que é bastante representativo no semiárido (AGRA, 2008; FALCÃO E MENEZES, 2003; RAYMUNDO, 2011). No entanto, ainda não existem relatos na literatura sobre a atividade anti-inflamatória de *Martianthus leucocephalus* (Marth. ex Benth) J.F.B. Pastore, erva aromática decumbente de cerca de 20 cm de altura, folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadas, endêmica do semi-árido nordestino (OLIVEIRA, 2011), e utilizada por comunidades locais para tratar doenças respiratórias (AZEVEDO, 2014).

A espécie *Martianthus leucocephalus* já teve a atividade antimicrobiana do seu óleo essencial confirmada frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LUCCHESI, 2006; SANTOS, 2011). Contudo, faz-se necessário novas investigações sobre as atividades biológicas dessa espécie, com o foco no desenvolvimento de novos fármacos a base de vegetais, com a mesma eficácia dos medicamentos atuais e com menos efeitos adversos. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico (EMML) e das frações clorofórmica (FCML) e hidrometanólica (FHMML) da parte aérea dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Indivíduos de *M. leucocephalus* foram cultivados em solo corrigido com adubado antes do cultivo, de acordo com a análise química do solo. Para tal, foram aplicados 6.160 g de calcário dolomítico e 732,6 g de fósforo (superfosfato simples) na área total e 10 litros de composto orgânico por canteiro. As plantas foram coletadas no período da manhã, entre nove e dez horas, durante o mês de agosto do ano de 2013, na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, (UEFS), localizada a 12° 16' 00" de latitude sul e 38° 58' 00" de longitude oeste, apresentando altitude de 234 metros e temperatura média anual de 24°. A identificação botânica foi realizada no herbário da UEFS (HUEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 25.322). Após a coleta, foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPRON). O material recém coletado foi colocado para secar à temperatura ambiente e posteriormente a parte aérea das plantas (caule, folhas e flores) foi triturada com auxílio de um moinho de facas.

2.2. Preparo do extrato e frações

Após secagem e moagem, o pó foi então pesado e submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com metanol em recipientes de vidro. Os extratos brutos foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom 802), sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão para obtenção do EMMML seco. 20g do EMMML foi dissolvida em metanol à temperatura ambiente e filtrada, adicionando-se água destilada a esta solução a uma proporção de 7:3 (água; metanol, v/v) e particionou-se por três vezes com clorofórmio (1:1), resultando nas FCML e FHMMML. A FCML foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-45°C. Enquanto a FHMMML teve o metanol evaporado em capela de exaustão e a solução final foi liofilizada (Liofilizador Terrone Enterprise I). Esses experimentos foram realizados no LAPRON, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS),

Feira de Santana – Ba. As etapas do processo encontram-se ilustradas na figura 01 do capítulo 1.

2.3 Animais

Todos os experimentos foram realizados com camundongos suíços (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) machos, adultos, com peso corporal variando entre 25-35g, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a comida e água. Duas horas antes de cada procedimento, os animais receberam apenas água para evitar que os alimentos pudessem interferir com a absorção da substância. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS, protocolo número 006/2012) – Anexo 1.

2.4 Administração das drogas e extratos

A indometacina foi diluída em solução de bicarbonato de sódio imediatamente antes da utilização e o EMMML e as FCML e FHMML foram dissolvidos em Tween 80 e em água destilada e administrado via oral (v.o) nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg. A indometacina intraperitoneal (i.p.) (10mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão de referência. Aos animais do grupo do controle foi administrado um veículo (água destilada e Tween 80, 0,1ml/10g, v.o.). A carragenina e o azul de Evans (10mg/kg) foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%).

2.5. Teste do edema de pata em camundongos induzido por carragenina

A atividade anti-inflamatória de EMMML e das FCML e FHMML foi determinada usando a carragenina para indução da formação de edema de pata em camundongos seguindo o método de YESILADA & KUPELI (2007), com algumas modificações. Para este experimento, três grupos de 10 animais cada, foram divididos e receberam tratamento com as dosagens do EMMML, FCML ou FHMML, mais dois grupos controle (tratados com o veículo, e indometacina, respectivamente). Após 30 minutos os animais receberam 50 µL de carragenina

(2,5% diluída em solução salina) (NSONDE NTANDOU et al., 2010) a qual foi injetada na região subplantar da pata posterior esquerda, e igual volume de solução salina (NaCl a 0,9%) na pata posterior direita. Em seguida o volume das patas foi medido 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de carragenina e solução salina na região subplantar usando um pletismômetro. O edema foi quantificado pela diferença do volume entre a pata tratada com carragenina e a que recebeu a solução salina. A média dos valores da atividade anti-inflamatória dos animais tratados com EMMML, FCML e FHMML foi comparada com o grupo controle e o tratado com indometacina, droga referencia padrão.

2.6 Teste da permeabilidade capilar peritoneal induzida pelo ácido acético

O teste da permeabilidade capilar peritoneal induzida pelo ácido acético foi realizado segundo a metodologia de ZHANG e colaboradores (2009), com algumas modificações. Para realização deste experimento, cinco grupos com 8 animais foram divididos e receberam o EMMML (300 mg/kg), FCML (300 mg/kg), FHMML (300 mg/kg), indometacina ou veículo. Após trinta minutos da aplicação dos tratamentos, os animais receberam azul de Evans por via intravenosa (veia caudal) diluído em solução salina, seguido imediatamente pela administração de ácido acético (1%) pela via i.p. Passados vinte minutos da injeção do ácido acético, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A coleta do fluido peritoneal foi realizada após a injeção de 5mL de solução salina (0,9%) no peritônio e depois centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Por meio de um espectrofotômetro (TU-1880 Double Beam), foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante (595 nm). Os valores lidos do grupo controle foram aceitos como efeito máximo. Os testes acima descritos foram realizados no LAFAR, UEFS, Feira de Santana – Ba.

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados do teste do edema de pata induzido por carragenina foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguido por Tukey, utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 6.0.

No teste da permeabilidade capilar induzida por ácido acético, os dados estatísticos foram analisados utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet, utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 6.0.

Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Teste do edema de pata em camundongos induzido por carragenina

Os resultados obtidos para a ação anti-inflamatória do EMMML e das FCML e FHMMML (75, 150 e 300 mg/kg) mostraram efeitos significativos na redução do edema de pata dos camundongos, em todos os tempos de observação após a administração da carragenina quando comparados ao grupo controle (Tabelas 01, 02 e 03). Como esperado, o efeito de diminuição do edema em relação ao grupo controle foi observado também no grupo tratado com indometacina.

Tabela 01: Efeito do extrato metanólico da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/kg), sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. UEFS, Feira de Santana, 2015.

| Tratamento | Medida do edema da pata (mL) | | | | |
|--------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 30 min | 60min | 120min | 180min | 240min |
| Controle | 0,18±0,01 | 0,23±0,01 | 0,22±0,02 | 0,27±0,02 | 0,28±0,04 |
| 75mg/kg | 0,04±0,01*** | 0,05±0,01*** | 0,06±0,01*** | 0,06±0,01*** | 0,08±0,02*** |
| 150mg/kg | 0,03±0,00*** | 0,04±0,01*** | 0,05±0,01*** | 0,04±0,01*** | 0,08±0,01*** |
| 300mg/kg | 0,06±0,01*** | 0,05±0,01*** | 0,03±0,00*** | 0,06±0,01*** | 0,08±0,01*** |
| Indometacina | 0,02±0,00*** | 0,03±0,01*** | 0,04±0,01*** | 0,04±0,00*** | 0,05±0,01*** |

Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle. (ANOVA two-way-Tukey).

Tabela 02: Efeito da fração clorofórmica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/kg), sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. UEFS, Feira de Santana, 2015.

| Tratamento | Medida do edema da pata (mL) | | | | |
|--------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 30 min | 60min | 120min | 180min | 240min |
| Veículo | 0,18±0,01 | 0,23±0,01 | 0,22±0,02 | 0,27±0,02 | 0,28±0,04 |
| 75mg/kg | 0,05±0,01*** | 0,08±0,01*** | 0,04±0,01*** | 0,09±0,01*** | 0,13±0,02*** |
| 150mg/kg | 0,07±0,00*** | 0,08±0,01*** | 0,06±0,01*** | 0,10±0,01*** | 0,14±0,01*** |
| 300mg/kg | 0,07±0,01*** | 0,08±0,01*** | 0,06±0,00*** | 0,12±0,01*** | 0,17±0,01*** |
| Indometacina | 0,02±0,00*** | 0,03±0,01*** | 0,04±0,01*** | 0,04±0,00*** | 0,05±0,01*** |

Os valores foram expressos em média ± e.p.m. (n=8). ***p<0,001 foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle. (ANOVA two-way-Tukey).

Tabela 03: Efeito da fração hidrometanólica da parte aérea de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore e indometacina (10 mg/kg), sobre o volume do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.UEFS, Feira de Santana,2015.

| Tratamento | Medida do edema da pata (mL) | | | | |
|--------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 30 min | 60min | 120min | 180min | 240min |
| Veículo | 0,18±0,01 | 0,23±0,01 | 0,22±0,02 | 0,27±0,02 | 0,28±0,04 |
| 75mg/kg | 0,10±0,01*** | 0,07±0,02*** | 0,07±0,01*** | 0,13±0,02*** | 0,12±0,02*** |
| 150mg/kg | 0,07±0,01*** | 0,10±0,01*** | 0,08±0,01*** | 0,13±0,01*** | 0,15±0,02*** |
| 300mg/kg | 0,06±0,01*** | 0,07±0,01*** | 0,07±0,01*** | 0,12±0,01*** | 0,14±0,02*** |
| Indometacina | 0,02±0,00*** | 0,03±0,01*** | 0,04±0,01*** | 0,04±0,00*** | 0,05±0,01*** |

Os valores foram expressos em média ± e.p.m. (n=8). ***p<0,001 foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle. (ANOVA two-way-Tukey).

3.2 Teste da permeabilidade capilar peritoneal induzida pelo ácido acético

O EMMML (300 mg/kg) promoveu efeito significativo na diminuição da permeabilidade capilar peritoneal vascular induzida pelo ácido acético em camundongos em comparação ao grupo controle (0,35±0,07 nm), com média de 0,20±0,03 nm. (Figura 01).

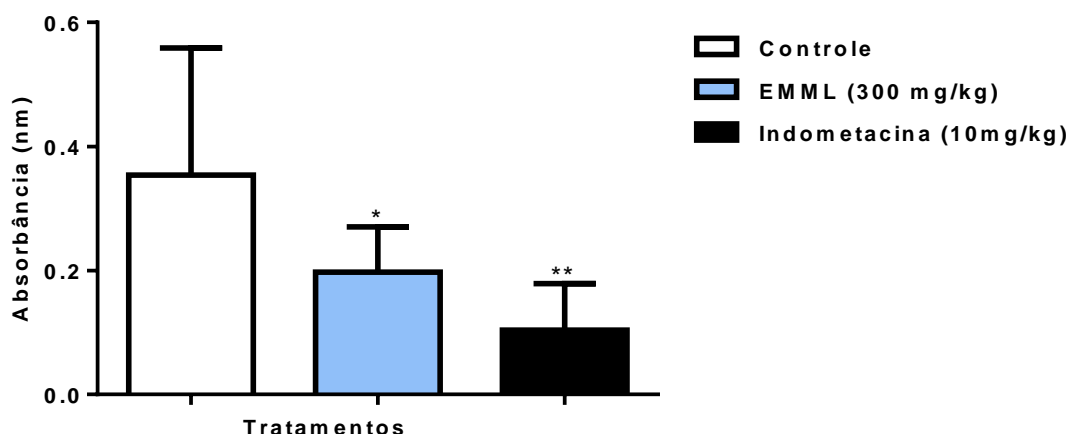


Figura 01: Efeito do extrato metanólico de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth) J.F.B. Pastore (300 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01. (ANOVA-seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

A absorbância apresentada pelo fluido intraperitoneal dos animais tratados com a FCML, 300mg/kg, foi similar (0,35 \pm 0,02 nm) àquela apresentada pelos animais do grupo controle (0,35 \pm 0,07), indicando que esta fração não promoveu efeito anti-inflamatório, segundo este método de avaliação. (Figura 02).

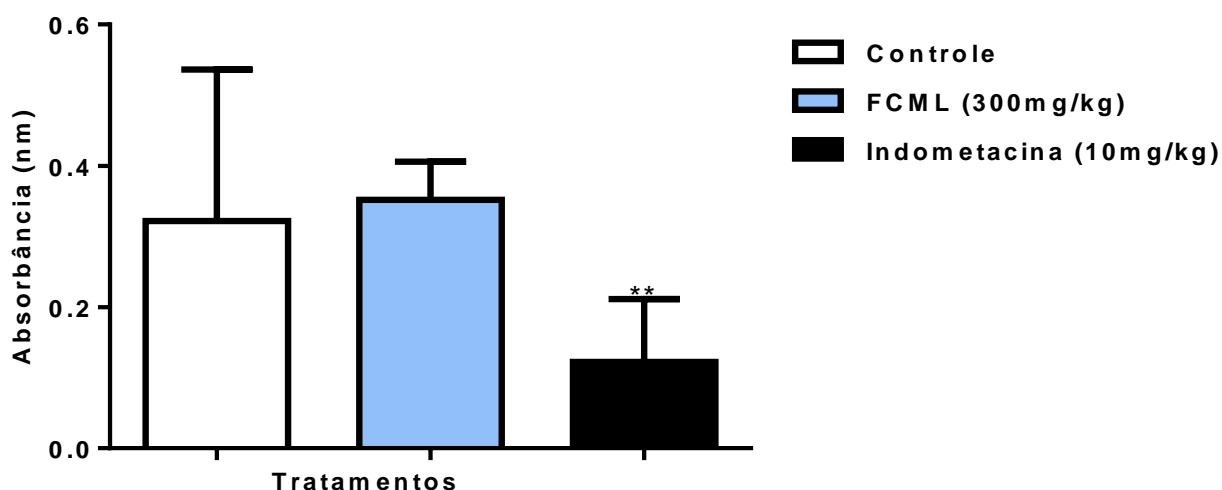


Figura 02: Efeito da fração clorofórmica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (300mg/kg) e indometacina (10mg/kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01. (ANOVA-seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

Do mesmo modo, a FHML na dose de 300 mg/kg não reduziu a absorbância do fluido intraperitoneal dos animais ($0,36\pm 0,03\text{nm}$) quando comparado ao grupo controle ($0,35\pm 0,07\text{nm}$), também indicando que esta fração não promoveu efeito anti-inflamatório, segundo este método de avaliação. (Figura 03).

A indometacina, droga com ação anti-inflamatória conhecida, apresentou efeito inibitório sobre a permeabilidade vascular peritoneal, como esperado. ($0,10\pm 0,03\text{nm}$).

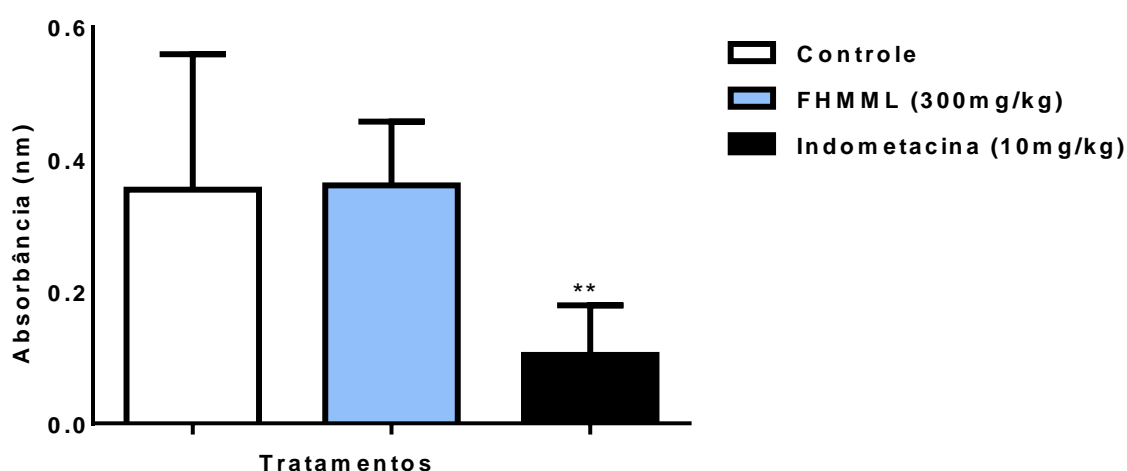


Figura 03: Efeito da fração hidrometanólica de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (300 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre a permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=8). **p<0,01. (ANOVA-seguido de Dunnet). Feira de Santana, 2015.

4. DISCUSSÃO

O efeito anti-inflamatório apontado pelo teste da formalina (capítulo 2) foi confirmado, avaliando as propriedades antiedematogênica do EML e das FCML e FHML, no modelo do edema de pata induzido por carragenina (Tabelas 01, 02 e 03). Este modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de agentes anti-inflamatórios não esteroidais (ARA et al., 2010). O desenvolvimento do edema provocado pela carragenina é um processo que envolve três fases. À fase inicial (os primeiros 90 min) é atribuída à liberação de histamina e serotonina; a segunda fase (90-150 min) é mediada por cinina e a última fase (após 180 min) é mediada por prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971; OKPO et al., 2001).

Houve uma redução bastante significativa do edema aos 30, 60, 120, 180 e 240 min de avaliação, demonstrando que, possivelmente os constituintes químicos do EMMML e das FCML e FHMML inibiram o processo inflamatório. Os resultados aqui encontrados indicam que o extrato e as frações da parte aérea de *M. leucocephalus* provavelmente atuaram por inibição de histamina, serotonina, cinina e prostaglandina, uma vez que houve atividade inibitória em todas as fases. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Al-Yousuf et al. (2002) quando avaliaram os extratos de *Salvia aegyptiaca* (Lamiaceae) e diferem dos encontrados por Oliveira et al. (2014), onde o extrato aquoso das folhas de *Scutellaria agrestis* (Lamiaceae) não demonstrou atividade antiedematogênica no teste do edema de pata induzido por carragenina.

Além do teste do edema de pata induzido por carragenina, a atividade anti-inflamatória do EMMML e das FCML e FHMML também foi quantificada no teste da permeabilidade capilar induzida por ácido acético. Trata-se de um método geralmente utilizado para estudos anti-inflamatórios agudos. O teste quantifica o aumento na permeabilidade capilar, induzido pelo ácido acético, medindo-se o extravasamento do corante azul de Evans a partir dos capilares para dentro da cavidade peritoneal. A função do ácido acético neste teste é provocar o aumento dos mediadores químicos relacionados à inflamação nos fluidos peritoneais, tais como prostaglandina E₂ (PGE₂), serotonina e histamina, isto por sua vez conduz a uma dilatação dos capilares sanguíneos e promove um aumento da permeabilidade capilar (CHOI et al., 2006; KANG et al., 2008; ZHAO, et al, 2012). Esses mediadores são responsáveis por mediar as respostas vasculares da inflamação. A PGE₂, por exemplo, além de causar vasodilatação aumenta a permeabilidade capilar, otimizando a formação do edema (KUMAR et al., 2010).

Como demonstrado na figura 01, a administração oral do EMMML inibiu significativamente a permeabilidade capilar induzida pelo ácido acético em camundongos. Esse resultado sugere que este extrato pode exercer um efeito anti-inflamatório presente na fase aguda da inflamação por meio deste modelo de avaliação, provavelmente pelo mecanismo de inibição da ciclooxigenase (COX) nos tecidos periféricos, situação que diminui a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios, interferindo, desta forma, no mecanismo de transdução dos nociceptores aferentes primários (TRONGSAKUL et al., 2003).

Os resultados obtidos com a aplicação da FCML (figura 02) e da FHML (Figura 03) não diferiram estatisticamente em relação aos resultados obtidos no tratamento controle, em relação à inibição da permeabilidade vascular em camundongos. A indometacina, droga referência padrão, diminuiu a permeabilidade vascular, pela inibição da COX, e o consequente bloqueio na síntese de prostaglandinas (KUMAR et al, 2010).

A atividade anti-inflamatória *in vivo* exibida pelo extrato metanólico e pelas frações clorofórmica e hidrometanólica da parte aérea de *M. leucocephalus*, fornece uma base científica que apoia o uso etnobotânico de espécies da família Lamiaceae no tratamento de doenças inflamatórias e confirma o potencial da espécie *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore para produção de drogas anti-inflamatórias.

5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.472-508, 2008.
- ALBAGLI, S. **Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. Parcerias Estratégicas** (Brasília), Brasília 4,2001, 5-19.
- AL-YOUSUF, M. H. et al. Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.121-127, 2002.
- ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20(6), p.929-932, 2010.
- AZEVEDO, B.O. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Feira de Santana-Ba. 2014.77f.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.S.; ALBUQUERQUE, U.P.de. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**,v.131, p.326-342, 2010.
- CHOI, J. H. et al. The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *Cynanchi paniculati radix*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 971-975, 2006.

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

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

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-16, 2004.

HOCHEBERG, M. C. et al. **Rheumatology**. 5ª edição- Philadelphia: Elsevier, 2010, 183-198.

KANG, H.S., LEE, J.Y., KIM, C.J. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Frusts*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116.p.305-312, 2008.

KUMAR, V. et al. **Patologia**: bases patológicas das doenças . 6ª edição – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; 44-77.

KUMARI, K.D.K.P. et al. Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p.1202-1208, 2014.

LUCHESE, A.M. et al. Comparação da atividade antimicrobiana do óleos essenciais extraídos do semiárido baiano. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, p.846-852, 2002.

NSONDE NTANDOU, G. F. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. Stem bark extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p.108–111, 2010.

OKPO, S.; FATOKUN, F.; ADEYEMI, O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. **Journal Ethnopharmacology**, v.137, p. 207-2011, 2001.

OLIVEIRA, L.M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu,v.13,n.1,p73-78, 2011

OLIVEIRA, A.B. et al. Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de trevo-roxo (*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. Ex Benth. – Lamiaceae) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n..2, p. 174-181, 2014

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

SANTOS, S.N. et al. Atividade antimicrobiana de *Hyptis leucocephala* . In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2011, Campinas. Instituto Agrônomo de

Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitoquímica, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 371- 400.

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

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.

XU, Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152. P.540-545, 2014.

YESLIDA, E; KUPELI, E. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.504-515, 2007.

ZHANG, L. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of *Pterocephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoek. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 510-514, 2009.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes inferências:

1. O EMMML, bem como as FCML e FHMML se mostraram atóxicas no ensaio de toxicidade aguda;
2. O EMMML e as FCML e FHMML mostraram ação depressora no SNC e não sensibilizaram a coordenação motora dos animais frente aos critérios observados na triagem farmacológica e pelo teste do Rota Rod;
3. A presente pesquisa proporciona indícios que o extrato e as frações da parte aérea de *M. leucocephalus* apresentam propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias;
4. Investigações mais detalhadas para caracterizar os agentes ativos responsáveis pelos efeitos observados são necessárias;

ANEXOS

ANEXO – 1 :
Protocolo Comitê de Ética em Uso Animal



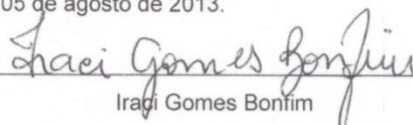
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
DECLARAÇÃO

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

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

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

Feira de Santana, 05 de agosto de 2013.


 Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora em exercício da CEUA-UEFS

Portaria nº 878/2012

PARECER FINAL

Protocolo nº 006/2012

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

ANEXO 2

Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

| ATIVIDADE FARMACOLÓGICA | Quantificação dos efeitos | | | | |
|-------------------------------------|--|----|----|----|----|
| | (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso | | | | |
| | até 30' | 1h | 2h | 3h | 4h |
| 1 – SNC | | | | | |
| a – Estimulante | | | | | |
| Hiperatividade | | | | | |
| Irritabilidade | | | | | |
| Agressividade | | | | | |
| Tremores | | | | | |
| Convulsões | | | | | |
| Piloereção | | | | | |
| Movimento intenso das vibrissas | | | | | |
| Outras _____ | | | | | |
| b – Depressora | | | | | |
| Hipnose | | | | | |
| Ptose | | | | | |
| Sedação | | | | | |
| Anestesia | | | | | |
| Ataxia | | | | | |
| Reflexo do endireitamento | | | | | |
| Catonia | | | | | |
| Analgesia | | | | | |
| Resposta ao toque diminuído | | | | | |
| Perda do reflexo corneal | | | | | |
| Perda do reflexo auricular | | | | | |
| c – Outros comportamentos | | | | | |
| Ambulação | | | | | |
| Bocejo excessivo | | | | | |
| Limpeza | | | | | |
| Levantar | | | | | |
| Escalar | | | | | |
| Vocalizar | | | | | |
| Sacudir a cabeça | | | | | |
| Contorções abdominais | | | | | |
| Abdução das patas do trem posterior | | | | | |
| Pedalar | | | | | |
| Estereotipia | | | | | |
| 2 - SN AUTÔNOMO | | | | | |
| Diarréia | | | | | |
| Constipação | | | | | |
| Defecação aumentada | | | | | |
| Respiração forçada | | | | | |
| Lacrimejamento | | | | | |
| Micção | | | | | |
| Salivação | | | | | |
| Cianose | | | | | |
| Tono muscular | | | | | |
| Força para agarrar | | | | | |
| 3 – MORTES | | | | | |
| Observações complementares: | | | | | |

ANEXO 3

Resultados dos sinais clínicos de caráter geral e tóxico dos diferentes grupos de tratamento, na dose de 2000mg/kg.

| Grupos nº dos animais | Controle | | | | | Fração Aquosa | | | | | Fração metanólica | | | | | Fração clorofórmica | | | | |
|-----------------------------|----------|---|---|---|---|---------------|---|---|---|---|-------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| PARÂMETROS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Atividade Geral** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 6 | 4 |
| Frêmito vocal* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Irritabilidade* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| Resposta ao Toque** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Aperto de cauda* | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Contorção* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trem posterior* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Endireitamento** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Tônus Corporal** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Força de agarrar** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Ataxia* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Reflexo auricular** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Reflexo corneal** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Tremores* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Convulsões* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Estimulações** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Straub* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hipnose* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anestesia* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lacrimação* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ptoses* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Micção** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Defecação** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Piloereção* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hipotermia* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Respiração** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 6 | 4 |
| Cianose* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| nº de mortos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Escala unipolar

** Escala bipolar