



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



**ALINE DO NASCIMENTO SILVA**

**PROSPECÇÃO DE ATIVOS COM AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM  
ESPÉCIES DE *Myrcia* DC. (MYRTACEAE)**

Feira de Santana – BA

2019

**ALINE DO NASCIMENTO SILVA**

**PROSPECÇÃO DE ATIVOS COM AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM  
ESPÉCIES DE *Myrcia* DC. (MYRTACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito avaliativo para a obtenção do título de doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angélica Maria Lucchese (UEFS)  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilene Lopes da Rocha (UEFS)

Feira de Santana – BA

2019

### Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S579p Silva, Aline do Nascimento  
Prospecção de ativos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória em espécies de Myrcia DC. (Myrtaceae)./ Aline do Nascimento Silva. – 2019.  
159f.: il.

Orientador: Angélica Maria Lucchese  
Coorientadora: Marilene Lopes da Rocha

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2019.

1.Óleos essenciais. 2.Inflamação. 3.Dor. 4.Terpenos. I.Lucchese, Angélica Maria, orient. II.Rocha, Marilene Lopes da, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 582.883

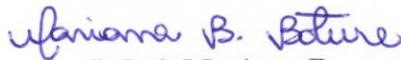
**BANCA EXAMINADORA**

  
**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosane Moura Aguiar**

**(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)**



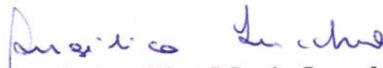
**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristiane Flora Villarreal**  
**(Universidade Federal da Bahia)**



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Mariana Borges Botura**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana)**



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ingrid Estefanía Mancía de Gutiérrez**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana)**



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Angélica Maria Lucchese**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana)**  
**Orientadora e Presidente da Banca**

*Aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, seus professores e funcionários.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angélica Lucchese, minha constante inspiração como mulher e pesquisadora.

À minha coorientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilene Lopes pela forma leve como conduz cada orientando (a).

Ao Professor Nilson Gonçalves de Jesus (*in memoriam*) por me escolher durante a iniciação científica para estudar as Myrtaceae.

Aos funcionários do Biotério Central da UEFS, extremamente dedicados, competentes e zelosos, em especial à Júnior, Bete e Oréstes.

À Edna Peralta, pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Dona Nilda.

À família LAPRON, em especial à Alexandre, Jade e Iza.

Aos amigos que a UEFS me deu e que levarei por toda a vida: Gilmara, Fabrício, Sammya, Fabi, Cris, Ilana, Eliza, Bárbara, Paty, Pacheco e Lucas.

À Acsa e Horácio, por me proporcionarem apoio, luz, alegria e as providenciais pausas para o cafezinho e gargalhadas, amo muito vocês.

À cada um dos meus alunos, por compreenderem e respeitarem as minhas ausências, e por terem orgulho do meu trabalho.

À Carol que de ex-aluna passou a ser uma grande amiga. Tenho certeza de que aprendi mais com você do que fui capaz de ensinar. Obrigada por sua companhia e seu cuidado comigo.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e por abdicarem dos seus próprios sonhos e necessidades para me proporcionar sempre uma excelente educação.

Ao meu irmão Anderson, por tudo.

Ao meu marido Márcio, por me acompanhar em cada uma das coletas, por compreender minha ausência mesmo quando eu estava presente e, principalmente, por saber esperar por mim e por nós.

Às minhas afilhadas Alana, Alícia e Taine por alegrar a minha vida e encher meu coração de esperança e com a certeza de que dias melhores virão.

À todos os meus familiares, por sempre acreditarem em mim.

À minha amiga Valéria, parceira de todos os momentos.

À Dr<sup>a</sup>. Denise Carvalho, coautora do meu renascimento!

Ao Universo, ao grande Mestre Jesus e aos espíritos de luz pela minha vida e pelo merecimento de ter pessoas tão iluminadas ao meu redor.

## RESUMO

O gênero *Myrcia* apresenta cerca de 700 espécies distribuídas desde o México até o sul do Brasil. As ações antimicrobiana *in vitro*, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva já foram descritas, entretanto os estudos envolvendo o potencial farmacológico dos seus componentes voláteis são incipientes. O presente trabalho objetivou analisar a composição química e avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, em modelo animal, dos óleos essenciais provenientes das folhas frescas de *Myrcia rostrata* e *Myrcia splendens*. Os óleos foram obtidos, em triplicata, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG/EM). Para a avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, da nocicepção espontânea induzida pela formalina e da placa quente. A atividade anti-inflamatória foi avaliada mediante o teste do edema de pata induzido pela formalina e pelo glutamato. Foram feitos testes para avaliar a toxicidade oral aguda e a interferência dos óleos sobre o SNC dos animais, além da investigação do envolvimento dos receptores TRPA1,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, muscarínicos e opioides na analgesia. Os resultados indicaram que ambos os óleos apresentaram expressiva ação nos modelos de nocicepção e inflamação executados sem provocar sinais de toxicidade nem interferir na coordenação motora dos animais apresentando-se como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades anti-inflamatória e analgésica.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais. Folhas. Terpenos. Dor. Inflamação.

## ABSTRACT

(PROSPECTION OF ACTIVE INGREDIENTS WITH ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTION IN *Myrcia* DC MYRTACEAE SPECIES). The genus *Myrcia* contains around 700 species distributed from Mexico to Southern Brazil. Although in vitro antimicrobial, antioxidant and antinociceptive action has been described, studies involving the pharmacological potential of their volatile components are incipient. The present study aimed to analyze the chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oils from fresh *Myrcia rostrata* and *Myrcia splendens* leaves in an animal model. The oils were obtained in triplicate by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and analyzed by Gas Chromatography/Flame Ionization Detection (GC/FID) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Acetic acid-induced abdominal writhing, formalin-induced nociception and hot plate tests were conducted to evaluate antinociceptive activity. Anti-inflammatory activity was assessed using the formalin and glutamate-induced paw tests. Tests were conducted to evaluate acute oral toxicity and the interference of oils in the central nervous system (CNS) of animals, in addition to investigating the involvement of TRPA1,  $\alpha_2$ -adrenergic, muscarinic and opioid receptors in analgesia. The results indicated that both oils exhibited significant nociceptive and inflammation action with no signs of toxicity or interference in the motor coordination of animals, representing a promising source for the development of new drugs with anti-inflammatory and analgesic properties.

**Keywords:** Essential oils. Leaves. Terpenes. Pain. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1:** Via nociceptiva conectando a periferia ao córtex cerebral de um animal..... 22
- Figura 2:** Processo de conversão de estímulos periféricos em dor..... 23
- Figura 3:** Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas..... 28
- Figura 4:** Esquema com enzimas e respectivos substratos do processo inflamatório..... 29

### CAPÍTULO 2

- Figura 1:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* na coordenação motora dos camundongos aos 30, 60 e 120 min após a administração das substâncias..... 65
- Figura 2:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. .... 66
- Figura 3:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* no teste da formalina..... 67
- Figura 4:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* no teste da placa quente avaliado aos 30, 60, 90, 120 e 240 min após a administração das substâncias. .... 69

### CAPÍTULO 3

- Figura 1:** *Myrcia splendens* A – Folhas e botões florais, B – Inflorescência e C – Frutos imaturos..... 76
- Figura 2:** Área de coleta..... 77
- Figura 3:** Disposição das caixas em sala climatizada com os animais de experimentação. .... 79
- Figura 4:** (A) Aparelho *Rota rod* (Insight®), (B) Modelo de caixa espelhada para a observação dos animais, (C) Aparelho *Hot plate* (Insight®)..... 82
- Figura 5:** Efeito do OEMs na coordenação motora dos camundongos aos 30, 60 e 120 min após a administração das substâncias..... 86
- Figura 6:** Dados do teste de toxicidade oral aguda para o OEMs..... 88
- Figura 7:** Efeito do OEMs no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético..... 89
- Figura 8:** Efeito do OEMs na fase 1 do teste da formalina..... 91

**Figura 9:** Efeito do OEMs na fase 2 do teste da formalina..... 92

**Figura 10:** Efeito do OEMs no teste da placa quente avaliado aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração das substâncias..... 94

#### **CAPÍTULO 4**

**Figura 1:** Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *M. rostrata*..... 112

**Figura 2:** Análise dos componentes principais para o óleo essencial de *M. rostrata* ..... 113

**Figura 3:** Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *M. splendens*..... 114

**Figura 4:** Análise dos componentes principais para o óleo essencial de *M. splendens* ..... 115

**Figura 5:** Análise dos componentes principais para os óleos essenciais de *Myrcia rostrata* e *Myrcia splendens* analisados conjuntamente..... 116

**Figura 6:** Dendrograma vertical da matriz de distâncias pelo método da ligação média entre os grupos para os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *M. rostrata* (em vermelho) e *M. splendens* (em verde) e agrupados por grau de similaridade, gerado pelo programa *Past*..... 117

**Figura 7:** Efeito do OEMr no teste do edema de pata induzido pela formalina aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração do agente flogístico..... 118

**Figura 8:** Efeito do OEMs no teste do edema de pata induzido pela formalina aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração do agente flogístico..... 119

**Figura 9:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pelo glutamato aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do agente flogístico..... 121

**Figura 10:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste da nocicepção induzida pelo glutamato..... 124

**Figura 11:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste da nocicepção induzida pelo cinamaldeído..... 125

**Figura 12:** Envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 1 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de ioimbina..... 127

**Figura 13:** Envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 2 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de ioimbina..... 127

**Figura 14:** Envolvimento dos receptores colinérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 1 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia

administração de atropina..... 128

**Figura 15:** Envolvimento dos receptores colinérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 2 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de atropina..... 129

**Figura 16:** Envolvimento do mecanismo opioide no teste da placa quente. Tempo de latência avaliado aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração das substâncias..... 131

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1:** Levantamento dos artigos relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de espécies de Myrtaceae, em geral, e de *Myrcia* publicados nas principais bases de dados antes e após a remoção de replicatas..... 43

**Tabela 2:** Levantamento dos artigos relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos óleos essenciais obtidos de espécies de Myrtaceae, em geral, e de *Myrcia* publicados nas principais bases de dados após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão..... 44

**Tabela 3:** Levantamento dos dados referentes à composição química e às atividades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória dos óleos essenciais ou de seus isolados obtidos de espécies da família Myrtaceae..... 45

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1:** Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *Myrcia rostrata* ..... 63

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1:** Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *Myrcia splendens* ..... 85

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pela formalina. Os resultados indicam o volume em mL do edema, medido em cada um dos tempos, subtraído da medida basal..... 119

**Tabela 2:** Percentual de inibição do edema de pata induzido pela formalina para o OEMr e o OEMs..... 120

**Tabela 3:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pelo glutamato. Os resultados indicam o volume em mL do edema, medido em cada um dos tempos, subtraído da medida basal..... 122

**Tabela 4:** Percentual de inibição do edema de pata induzido pelo glutamato para o OEMr e o OEMs..... 122

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA** – Ácido araquidônico
- AAS** – Ácido acetilsalicílico
- AChE** – Acetilcolinesterase
- AIEs** – Anti-inflamatórios esteroidais
- AINEs** – Anti-inflamatórios não esteroidais
- ASICs** – Canais iônicos sensíveis a ácido
- AVC** – Acidente Vascular Cerebral
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- COX1** – Ciclo-oxigenase 1
- COX2** – Ciclo-oxigenase 2
- GABA** – Ácido gama amino butírico
- HCA** – *Hierarchical Cluster Analysis*
- IASP** – International Association for the Study of Pain
- IL** – Interleucina
- i.p** – intraperitoneal
- i.pl** – intraplantar
- LOX** – Lipoxigenase
- NO** – Óxido nítrico
- NOS** – Óxido nítrico sintase
- NMDA** – N-metil-D-aspartato
- OECD** – *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
- OEMa** – Óleo Essencial de *Myrcia alagoensis*
- OEMr** – Óleo Essencial de *Myrcia rostrata*
- OEMs** – Óleo Essencial de *Myrcia splendens*
- PCA** – *Principal Component Analysis*
- PGi** – Proteína G inibitória
- PLA2** – Fosfolipase A2
- r.p.m.** – rotações por minuto
- TGI** – Trato gastrointestinal
- TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TRP** – Receptores catiônicos não seletivos de potencial transitório

**TRPA** – Receptor de potencial transitório anquirina

**TRPV1** – Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1

**Tween 80** – Monooleato de polioxietileno sorbitano

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNP** – Sistema Nervoso Periférico

**SBED** – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

**UEFS** – Universidade Estadual de Feira de Santana

**UESB** – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

**UFBA** – Universidade Federal da Bahia

**UNEB** – Universidade do Estado da Bahia

**UPGMA** – *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*

**v.o.** – via oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>20</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Dor e nocicepção .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Tipos de dor .....	24
2.1.2 Bases farmacológicas da analgesia .....	25
<b>2.2 Inflamação e agentes anti-inflamatórios.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Importância dos estudos fitoquímicos para o desenvolvimento de novos fármacos ..</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Estudos químicos e biológicos em <i>Myrcia</i> spp. (MYRTACEAE) .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 1 – POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE MYRTACEAE: UMA REVISÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>1.1 Introdução .....</b>	<b>41</b>
<b>1.2 Material e métodos .....</b>	<b>42</b>
<b>1.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>43</b>
<b>1.4 Conclusão .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia rostrata</i> DC. (MYRTACEAE) .....</b>	<b>56</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 Material e métodos .....</b>	<b>57</b>
2.2.1 Coleta.....	57
2.2.2 Obtenção do óleo essencial.....	58
2.2.3 Análise química .....	58
2.2.4 Testes farmacológicos .....	59
2.2.4.1 Animais.....	59
2.2.4.2 Avaliação da atividade motora na barra giratória ( <i>rota rod</i> ).....	59
2.2.4.3 Teste de toxicidade oral aguda .....	60
2.2.4.4 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	60
2.2.4.5 Teste da formalina .....	61
2.2.4.6 Teste da placa quente ( <i>hot plate</i> ).....	61
2.2.5 Análise estatística .....	62
<b>2.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>62</b>

2.3.1	Análise do óleo essencial.....	62
2.3.2	Avaliação da coordenação motora na barra giratória ( <i>rota rod</i> ) .....	64
2.3.3	Toxicidade oral aguda .....	64
2.3.4	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	65
2.3.5	Teste da formalina .....	67
2.3.6	Teste da placa quente ( <i>Hot plate</i> ) .....	68
<b>2.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>70</b>
	REFERÊNCIAS .....	71
	<b>CAPÍTULO 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC. (MYRTACEAE)</b> .....	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>75</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e métodos</b> .....	<b>76</b>
3.2.1	Coleta.....	76
3.2.2	Obtenção do óleo essencial.....	77
3.2.3	Análise química .....	78
3.2.4	Testes farmacológicos .....	79
3.2.4.1	Animais.....	79
3.2.4.2	Drogas.....	80
3.2.4.3	Avaliação da atividade motora na barra giratória ( <i>Rota rod</i> ).....	80
3.2.4.4	Teste da toxicidade oral aguda .....	81
3.2.4.5	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	81
3.2.4.6	Teste de nocicepção espontânea induzida pela formalina .....	82
3.2.4.7	Teste da placa quente ( <i>Hot plate</i> ).....	83
<b>3.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>84</b>
3.3.1	Análise do óleo essencial.....	84
3.3.2	Avaliação da atividade motora na barra giratória ( <i>Rota rod</i> ).....	85
3.3.3	Toxicidade oral aguda .....	87
3.3.4	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	89
3.3.5	Teste de nocicepção espontânea induzida pela formalina .....	91
3.3.6	Teste da placa quente ( <i>Hot plate</i> ).....	93
<b>3.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>95</b>
	REFERÊNCIAS .....	96

<b>CAPÍTULO 4 – POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E INVESTIGAÇÃO FARMACODINÂMICA NA ANALGESIA PROMOVIDA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE <i>Myrcia</i> s.l.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>102</b>
<b>4.2 Material e métodos .....</b>	<b>103</b>
4.2.1 Coleta.....	103
4.2.2 Obtenção do óleo essencial.....	103
4.2.3 Análise química .....	104
4.2.3.1 Análise multivariada dos óleos essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> e <i>Myrcia splendens</i> ..	104
4.2.4 Testes farmacológicos .....	105
4.2.4.1 Animais.....	105
4.2.4.2 Drogas.....	106
4.2.4.3 Testes de atividade anti-inflamatória.....	106
4.2.4.3.1 Edema de pata induzido por formalina.....	106
4.2.4.3.2 Edema de pata induzido por glutamato .....	107
4.2.4.4 Testes de mecanismo de ação.....	108
4.2.4.4.1 Nocicepção induzida por glutamato .....	108
4.2.4.4.2 Nocicepção induzida por cinamaldeído.....	108
4.2.4.4.3. Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos .....	109
4.2.4.4.4 Envolvimento do sistema muscarínico .....	110
4.2.4.4.5 Envolvimento do sistema opioide.....	110
<b>4.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>111</b>
4.3.1. Análise multivariada dos óleos essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> e <i>Myrcia splendens</i> ....	111
4.3.2. Testes de atividade anti-inflamatória.....	118
4.3.2.1 Edema de pata induzido por formalina.....	118
4.3.2.2 Edema de pata induzido por glutamato .....	121
4.3.3 Testes de mecanismo de ação.....	123
4.3.3.1 Nocicepção induzida por glutamato .....	123
4.3.3.2 Nocicepção induzida por cinamaldeído.....	124
4.3.3.3 Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos .....	126
4.3.3.4 Envolvimento dos receptores muscarínicos .....	127
4.3.3.5 Envolvimento do sistema opioide.....	129
<b>4.4 Conclusão .....</b>	<b>132</b>

REFERÊNCIAS .....	133
CONCLUSÃO GERAL .....	139
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>156</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os registros históricos apontam que os processos dolorosos sempre acometeram a humanidade. A princípio, as doenças eram atribuídas a entidades sobrenaturais e seu alívio consistia, por exemplo, no uso de amuletos ou na prática de exorcismos. Mais tarde, na Idade Média, acreditava-se que a sensação dolorosa era um “castigo” enviado por Deus, pelos pecados cometidos, como uma forma de purificação da alma. Ainda que a correlação entre a dor e o sistema nervoso tenha sido sugerida remotamente, no ano 175, por Galeno, somente no século XIX começaram os avanços tanto no conhecimento dos processos relacionados à sua fisiopatologia como no seu tratamento (CALCAGNOTTO, 2011).

Ao longo dos anos, houve uma busca incessante dos laboratórios de pesquisa e da indústria farmacêutica para o desenvolvimento e a produção de analgésicos e anti-inflamatórios, que apesar de eficazes, suscitam reações adversas, principalmente nos portadores de doenças crônicas. O advento do AAS (desenvolvido a partir da salicina extraída de *Salix* sp.) e da morfina (oriunda do ópio, *Papaver somniferum*) corrobora a prospecção por novos agentes para o tratamento da inflamação e da dor a partir dos metabólitos secundários de plantas, os quais reúnem uma fonte promissora para a descoberta de substâncias com menores riscos de tolerância, toxicidade e ocorrência de efeitos adversos (TJOLSEN; HOLE, 1997; BASBAUM, et al., 2009; BERGER et al., 2011; TSUCHIYA, 2017).

As espécies de *Myrcia*, assim como outros representantes de Myrtaceae possuem óleos essenciais, com predomínio de sesquiterpenos, e extratos ricos em compostos fenólicos e flavonoides responsáveis por uma ampla gama de atividades biológicas (CASCAES et al., 2015). Mais especificamente sobre os efeitos antinociceptivo e/ou anti-inflamatório, a literatura reúne estudos com *Campomanesia adamantium* (VENDRUSCOLO et al., 2005; VISCARDI et al., 2017), *Eugenia candolleana* (GUIMARÃES et al., 2009; QUINTAS-JÚNIOR, et al., 2009), *E. caryophyllata* (DANIEL et al., 2009) e *E. dysenterica* (SILVA et al., 2019). Todavia, para o gênero *Myrcia* s.l., apenas *M. pubiflora* DC. (ANDRADE, et al., 2012) e *M. ovata* Cambess (SANTOS et al., 2014) foram investigadas até então.

Assim, o potencial farmacológico dos representantes da família Myrtaceae e a escassez de estudos envolvendo as espécies de *Myrcia* impulsionaram a consecução da presente pesquisa, a qual teve como objetivo avaliar a composição química e as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *M.*

*rostrata* e de *M. splendens*, com a finalidade de identificação de ativos com potencial para o tratamento da dor e da inflamação.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

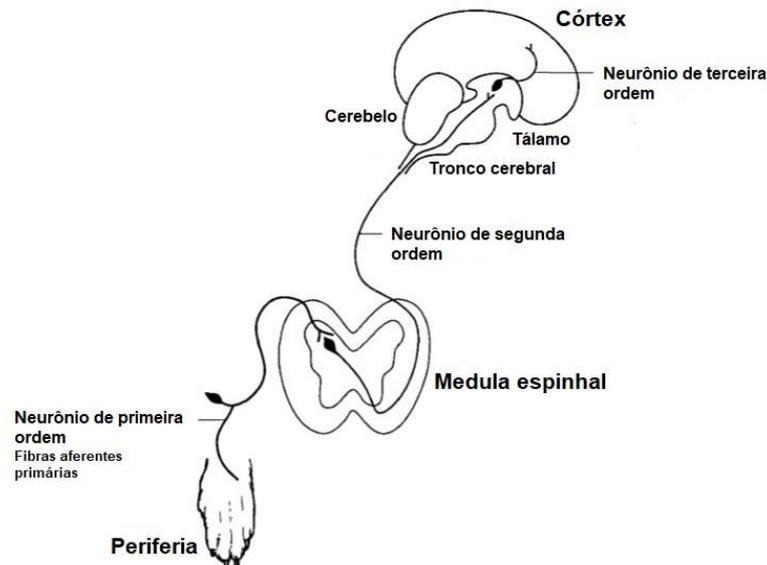
### 2.1 Dor e nocicepção

A dor é uma experiência subjetiva, difícil de ser definida com exatidão e caracterizada, por vezes, como uma resposta direta a um acontecimento indesejável associado à injúria tecidual, em geral um trauma, processo inflamatório ou câncer (RANG et al., 2011). Para a *International Association for the Study of Pain* (IASP) é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada não somente a lesões reais como também potenciais. Assim, é possível que a sensação dolorosa seja espontânea, evocada por estímulos inócuos e normalmente não dolorosos (alodinia), ou percebida como sendo mais intensa e duradoura do que o habitual quando se aplicam estímulos álgicos (hiperalgesia) (FORNASARI; COACCIOLI, 2014).

O processamento da dor consiste em cinco etapas essenciais: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção; sendo considerado, fundamentalmente, como uma cadeia de três neurônios (Figura 1, p. 22). O neurônio de primeira ordem localiza-se na periferia e projeta-se para a medula espinhal, o de segunda ascende pela medula e o de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral, local onde a sensação dolorosa é perceptível (TRANQUILLI, 2004).

Durante a transdução, estímulos mecânicos, térmicos ou químicos são convertidos em um sinal elétrico que, por sua vez, disparará o início de um potencial de ação. Isso ocorre nos terminais periféricos das fibras nociceptivas somáticas e viscerais primárias, tais neurônios sensoriais, de alto limiar e especializados em responder a estímulos fortes e potencialmente prejudiciais aos tecidos, são conhecidos como nociceptores. Na transmissão, os potenciais de ação se propagam ao longo dos axônios para alcançar a medula espinhal, através da comunicação sináptica, principalmente glutamatérgica, entre os neurônios de primeira (nociceptor) e de segunda ordens (neurônio espinotalâmico). Assim, a partir da estimulação

dos receptores na medula espinhal, a transmissão dos impulsos nociceptivos alcança o tálamo, e eventualmente o córtex onde ocorre a percepção consciente da dor (FORNASARI; COACCIOLI, 2014).



**Figura 1:** Via nociceptiva conectando a periferia ao córtex cerebral de um animal.

**Fonte:** SCHOLZ; WOOLF, 2002.

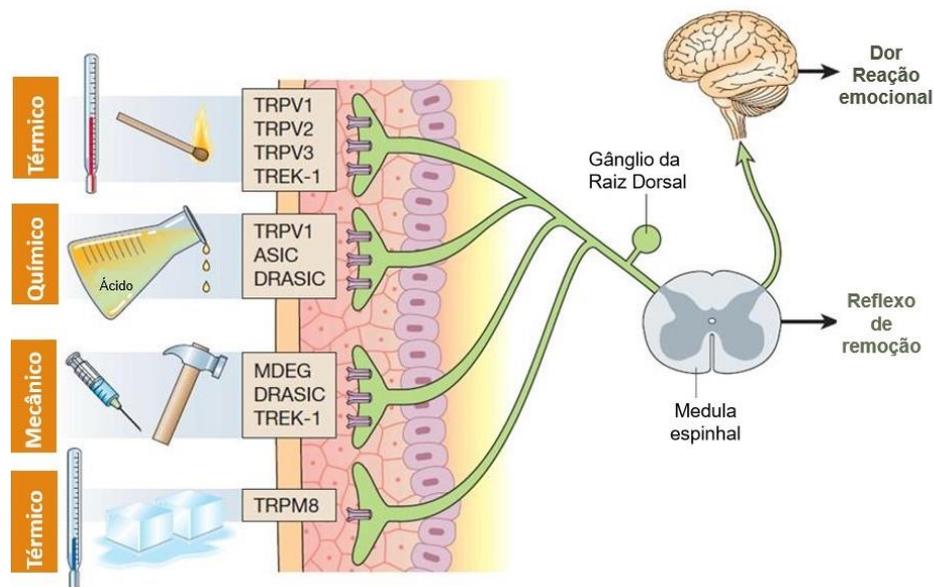
A nociceção pode ser definida como a atividade de um nociceptor, de vias nociceptivas ou de outros processos neurofisiológicos induzidos por um estímulo nocivo (Figura 2, p. 23). Ou seja, é um mecanismo pelo qual o Sistema Nervoso Central (SNC) capta um estímulo desencadeado pela ativação de receptores sensoriais especializados existentes na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (FURST, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Avanços obtidos através de estudos farmacológicos, bioquímicos, e principalmente, das técnicas de biologia molecular permitiram conhecer uma série de mediadores químicos nociceptivos e seus receptores correspondentes. Isso favoreceu um melhor entendimento da participação de neurotransmissores opioides, substância P, aminas biogênicas (histamina e serotonina), fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), além de diversas vias de sinalização intracelular nos mecanismos relacionados à nociceção (QUINTÃO; CAMPOS; CALIXTO, 2011).

Dentre os mediadores mais relevantes estão incluídos citocinas como interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6); além de quimiocinas, cininas, neuropeptídeos, glutamato (principal neurotransmissor excitatório dos nociceptores),

endocanabinoides, prostaglandinas e leucotrienos (OKUSE, 2007). Tais mediadores químicos fazem com que o nociceptor seja estimulado, transportando o impulso doloroso até a medula espinhal, o qual se desloca ao longo de fibras nervosas aferentes, fibras A $\delta$  mielinizadas ou fibras C não-mielinizadas (HEINRICHER et al., 2009).

É importante destacar também a participação da superfamília de receptores catiônicos não seletivos de potencial transitório (TRP) nas etapas do processamento nociceptivo (Figura 2), a exemplo da expressão dos receptores TRPV1 em neurônios sensoriais periféricos por estímulos álgicos como prótons (H<sup>+</sup>), calor e pela capsaicina (BASBAUM et al., 2009). Nesse sentido, as fibras nociceptivas podem ser distinguidas pela expressão diferenciada de seus receptores, os quais podem apresentar sensibilidade seletiva ao calor (TRPV1), ao frio (TRPM8), à diminuição do pH (ASICs), ou ainda, à vários irritantes químicos (TRPA1) (QUINTÃO; CAMPOS; CALIXTO, 2011).



**Figura 2:** Processo de conversão de estímulos periféricos em dor. Onde: TRPV = Receptor de potencial transitório vaniloide; TREK = Canais de potássio sensíveis a estímulos mecânicos; ASIC = Canais iônicos sensíveis a ácido; DRASIC = Canais iônicos sensíveis a ácido da raiz do gânglio dorsal; MDEG = Canais degenerina de mamíferos; TRPM = Receptor de potencial transitório melastatina

**Fonte:** SCHOLZ; WOOLF, 2002.

Em síntese, como a dor é uma experiência fisiológica subjetiva e pessoal, os eventos dolorosos podem ser melhor mensurados em animais, apenas indiretamente, através da observação das suas respostas comportamentais frente a estímulos nociceptivos. Assim, testes de analgesia na pesquisa pré-clínica devem ser mais adequadamente denominados como

sendo modelos de nocicepção ou de antinocicepção, levando em conta que durante a experimentação, não existem meios para avaliar os aspectos emocional e cognitivo dos animais (TJOLSEN; HOLE, 1997; LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001; CARLINI; MENDES, 2011).

### 2.1.1 Tipos de dor

A dor transcende às tentativas de conceituação por ser uma experiência que envolve tanto uma sensação fisiológica quanto emocional. Em função dos neurotransmissores e/ou tipo de dano, pode-se classificá-la em: nociceptiva (pela ativação aumentada dos nociceptores), neuropática (provocada por disfunção neural como consequência direta de doenças que afetem o sistema somatossensorial), neurogênica (vinculada à lesão neural) ou psicogênica (relacionada a fatores psicológicos, como a dor do membro fantasma) (FURST, 1999; MILLAN, 1999; IASP, 2014).

A dor fisiológica desempenha um papel protetor e adaptativo integral como parte dos mecanismos normais de defesa do corpo. Surge como um sistema de alerta do contato de um tecido (cutâneo ou visceral) com estímulos nocivos do ambiente, potencialmente prejudiciais, sendo também, frequentemente, referida como dor nociceptiva ou dor inflamatória (KAZANOWSKI; LACCETTI, 2005).

Danos ou disfunções do SNP (como na síndrome do túnel do carpo) ou do SNC (após um AVC, por exemplo), assim como lesões traumáticas na medula espinhal estão relacionados com a dor neuropática. Semelhante aos estados de dor inflamatória, nas manifestações dolorosas neuropáticas ocorre um processamento sensorial alterado de estímulos que resulta em hipersensibilidade. Os indivíduos acometidos geralmente experimentam sensações de queimação persistente, formigamento, perda parcial ou focal de sensibilidade e alodinia (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A dor também pode ser classificada como aguda ou crônica, a primeira é biologicamente benéfica e protetora, visto que funciona como um alerta, pois além de ser um sintoma que auxilia no diagnóstico de uma doença, é geralmente o que impulsiona o indivíduo a buscar um tratamento (SBED, 2017). Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dor crônica (seja nociceptiva, neuropática ou funcional) é definida como aquela que

se prolonga por mais de três meses fazendo com que os portadores tenham até quatro vezes mais propensão em desenvolver quadros de depressão e ansiedade, além de alterações do sono, problemas nutricionais, dependência de medicamentos e incapacidade para o trabalho (QUINTÃO; CAMPOS; CALIXTO, 2011).

De acordo com a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (2017), ainda não foi realizado um estudo epidemiológico que englobe todas as regiões do país, mas no geral, a média da população que sofre com algum tipo de dor crônica é de cerca de 30%. Apesar de ser um percentual bastante semelhante ao de países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) mais elevado, existe um agravante, que é o fato de até então, não haver no Brasil, uma política de saúde pública que leve em consideração a questão da dor, tampouco das doenças em que a sensação dolorosa é a dimensão agravante. Destarte, é premente e prioritário tanto conhecer os mecanismos fisiopatológicos da dor, como buscar novas alternativas farmacológicas para o seu tratamento.

### 2.1.2 Bases farmacológicas da analgesia

O alívio da sensação dolorosa é um dos grandes alvos da farmacologia moderna, a qual busca o desenvolvimento de drogas com eficácia semelhante ou superior às já disponíveis, porém com uma incidência menor de efeitos adversos (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Apesar de os estudos realizados nas últimas décadas terem proporcionado avanços notáveis na compreensão de algumas das bases farmacológicas da analgesia (BASBAUM, et al.; 2009; BERGER et al., 2011), as duas principais classes de medicamentos utilizadas no tratamento da dor, tradicionalmente (TJOLSEN; HOLE, 1997) e ainda nos dias em curso são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's).

No caso da dor inflamatória aguda e, especialmente, crônica, a sensibilização periférica é um alvo importante para a farmacologia da dor porque os AINE's, como também os esteroides podem ser usados principalmente para reduzir a presença periférica de prostaglandinas. Há evidências de que os efeitos analgésicos dessas classes de fármacos estejam relacionados à capacidade de inibir a atividade da enzima ciclooxigenase (COX), reduzindo a síntese de prostaglandinas e, por consequência, a percepção do nociceptor periférico (FORNASARI; COACCIOLI, 2014).

Os opioides são um grupo diversificado de drogas naturais e sintéticas utilizadas extensivamente no controle das dores pós-operatória e relacionadas ao câncer, tanto em seres humanos como em animais. O sistema de opioides endógenos ( $\beta$ -endorfina, encefalinas e dinorfinas), localizado na periferia, medula espinhal e nas estruturas supraespinhais, fornece o local de ação (receptores  $\mu$  e kappa) para opioides administrados exogenamente. Essa classe de medicamentos minimiza a transmissão nociceptiva periférica e central aferente e, portanto, é extremamente eficaz no tratamento da dor aguda. No entanto, eles não são igualmente eficientes na gestão de todos os tipos de dor, como as neuropáticas que são caracterizadas por uma resposta fraca ou de curta duração a opioides (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

Embora altamente eficazes, os analgésicos de ação central não podem ser dissociados de efeitos indesejáveis importantes como sedação e dependência, já aqueles de ação periférica têm seus usos limitados devido às lesões do trato gastrointestinal e complicações renais (FERREIRA, 1993; CHAHADE et al., 2008; DINARELLO, 2010).

Os anestésicos locais agem de duas formas: bloqueando os canais de sódio, o que evita a transmissão de impulsos nervosos e a excitação do nociceptor, ou inibindo o processamento nociceptivo de modulação quando administrado centralmente. Além dos seus conhecidos efeitos tópicos, locais e regionais, já foi documentada a eficácia das infusões de lidocaína por via intravenosa de baixa dose no manejo da hiperalgesia e da dor neuropática. Já os anestésicos gerais não atuam como analgésicos, eles agem impedindo a percepção da dor (por intermédio da incoscência) ao impossibilitar que a informação nociceptiva alcance o córtex cerebral (ARAÚJO; PAULA; FRACETO, 2008).

Nesse sentido, é de extrema importância a realização de estudos que possibilitem o entendimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares da nocicepção, a fim de encontrar ativadores ou inibidores específicos das vias e/ou receptores envolvidos. Assim como, é amplamente aceito que existe a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas com farmacodinâmica e farmacocinética inovadoras para combater a dor (FORNASARI; COACCIOLI, 2014).

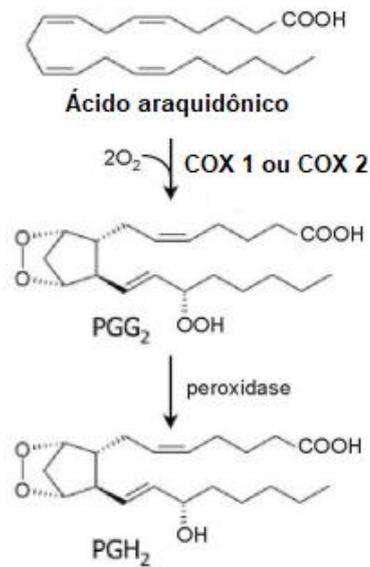
## 2.2 Inflamação e agentes anti-inflamatórios

A inflamação, do latim *inflammatio* (atear fogo), é uma resposta não específica da microcirculação de um tecido lesionado promovido por estímulos de natureza física, química ou infecciosa, ou ainda pela combinação destes (NATHAN, 2002). Para Moldoveanu et al. (2009), é um mecanismo complexo, benéfico e fisiológico pelo qual o organismo se defende de patógenos e tenta reparar danos teciduais. É uma resposta fundamentalmente protetora, destinada a livrar os organismos tanto da causa inicial da injúria celular quanto das consequências desta (KUMAR et al., 2010).

O processo inflamatório, de grande importância para a homeostasia, é dependente de diversos mecanismos celulares complexos que envolvem uma cascata de sinalização de citocinas e ativação das mesmas. A importância do estímulo dessas moléculas sinalizadoras se deve ao fato de que, através das mesmas, ocorre a liberação de outros fatores pró-inflamatórios, resultando em uma resposta imune e consequente reparo tecidual (BEAULIEU et al., 2010).

De maneira geral, a inflamação caracteriza-se pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, seguido da dilatação venular e do acúmulo de células específicas. Tais eventos determinam o aparecimento de quatro sinais típicos: rubor (hiperemia), calor (aumento da temperatura local), tumor (edema) e dor devido à compressão das terminações nervosas pelo exsudato (GILROY et al., 2004; FARIA, 2010). Recrutamento de leucócitos, necrose, piroptose, apoptose e liberação de mediadores químicos (histamina, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico) também são alterações fisiológicas que se associam aos sinais clássicos (VIVIER; MALISSEN, 2005).

Bioquimicamente, os mecanismos da inflamação são iniciados a partir da hidrólise de fosfolípidios de membrana (em especial, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e sua conversão em ácido araquidônico por ação da fosfolipase A2 (PLA2) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). O ácido araquidônico (Figura 3, p. 28), por sua vez é substrato para a ação da ciclo-oxigenase 1 (também conhecida como COX constitutiva, por ser responsável por funções fisiológicas e de homeostase), da ciclooxigenase 2 (a isoforma induzida em condições inflamatórias), e da lipoxigenase. As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos e a LOX, o converte em leucotrienos (Figura 4, p. 29) (FITZPATRICK, 2004).



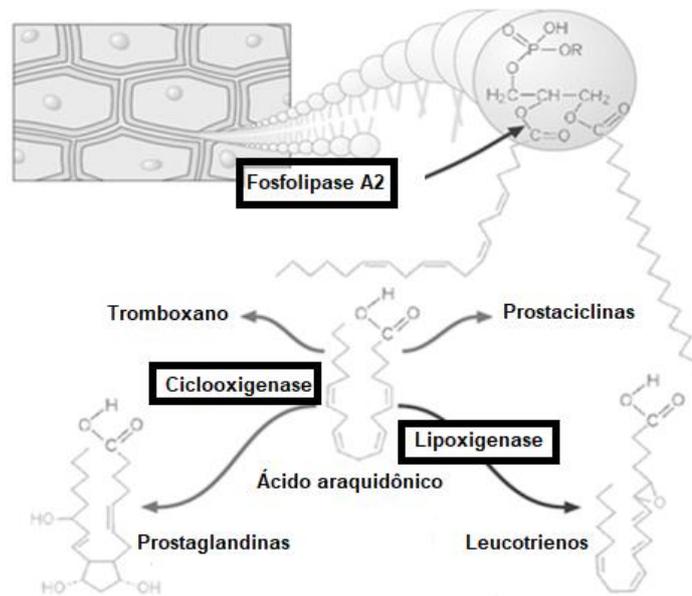
**Figura 3:** Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas.  
**Fonte:** BEAULIEU et al., 2010.

De modo geral, as prostaglandinas são responsáveis pela manutenção da homeostase de diversos órgãos e sistemas do organismo, incluindo a proteção e o bom funcionamento do trato gastrointestinal (TGI), assim como a regulação das funções renais e vasculares. Além disso, medeiam mecanismos patogênicos, incluindo a resposta inflamatória. As prostaciclina são potentes agentes vasodiladores e atuam também como inibidoras da agregação plaquetária, os tromboxanos participam dos mecanismos da coagulação sanguínea e os leucotrienos, das respostas alérgicas (RAINSFORD, 2007).

Mesmo sendo um mecanismo de defesa natural do organismo contra agentes perniciosos, com envolvimento do sistema imune inato e adaptativo, no momento em que ocorre um descontrole dos fatores inerentes à resposta inflamatória, surgem disfunções como artrite, asma, câncer, doenças auto-imunes e neurodegenerativas (DINARELLO, 2010).

É justamente o processo inflamatório crônico que requer uma intervenção farmacológica, e nesse caso, o tratamento consiste, fundamentalmente, na utilização de uma variedade de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), incluindo o ácido acetilsalicílico (desenvolvido, no final do século XIX, a partir do ácido salicílico isolado da casca do salgueiro, *Salix alba*), a indometacina e a fenilbutazona. Via de regra, os AINE's atuam inibindo as COX-1 e COX-2, bloqueando, por consequência, a produção de prostaglandinas, em particular, a PGE<sub>2</sub> (RAO; KNAUS, 2008; DINARELLO, 2010).

Como a inibição não seletiva das ciclooxigenases ocasionava a redução de prostanglandinas envolvidas na síntese de substâncias protetoras do TGI, no final do século XX, houve a introdução de inibidores seletivos de COX-2, conhecidos como coxibs (celecoxib e rofecoxib), os quais apresentavam ação anti-inflamatória com redução de efeitos adversos como gastrite e pirose. Entretanto, em 2004, alguns coxibs foram retirados do mercado devido à alta incidência de danos cardiovasculares graves (RAINSFORD, 2007).



**Figura 4:** Esquema com enzimas e respectivos substratos do processo inflamatório.  
**Fonte:** BEAULIEU et al., 2010.

Os glicocorticoides são também empregados para tratar muitas doenças inflamatórias, e apesar dos seus efeitos adversos, continuam sendo uma estratégia para reduzir a inflamação crônica. No entanto, ainda é um desafio para a indústria farmacêutica desenvolver medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para tratar os sintomas da inflamação aguda bem como, as consequências a longo prazo da inflamação crônica (RAO; KNAUS, 2008).

Diante do exposto, tanto o alívio da sensação dolorosa quanto a busca por novos agentes anti-inflamatórios são um dos objetivos da medicina moderna na incessante tentativa de desenvolver substâncias que sejam eficazes, mas com menor incidência de reações adversas (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Sendo assim, os esforços para descobrir ferramentas inovadoras para tratar a inflamação continuam a ser um importante desafio nos estudos de *design* de drogas (RAO; KNAUS, 2008).

Numerosos compostos, obtidos de fontes naturais, de grande diversidade química como: terpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, cumarinas e alcaloides têm demonstrado atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre diferentes mediadores desse processo (RECIO et al., 1995; LYSS et al., 1997; RAO et al., 2008; SALMINEN et al., 2008). Nesse sentido, a natureza figura como uma fonte de descobrimento de novas drogas, com mecanismos de ação distintos daqueles apresentados pelos fármacos já disponíveis na terapêutica, e com possibilidade de minimização dos efeitos adversos.

### **2.3 Importância dos estudos fitoquímicos para o desenvolvimento de novos fármacos**

Os recursos naturais, historicamente, são uma rica fonte de constituintes químicos para a descoberta de novos medicamentos. Apesar disso, o uso de plantas como fonte de substâncias terapêuticas foi sendo reduzido em virtude da preferência da indústria farmacêutica por protótipos moleculares sintéticos (ATANASOV et al., 2015). De certa forma, os programas de prospecção baseados no isolamento guiado por bioensaio e na elucidação da estrutura para a ulterior produção de um fármaco enfrentaram, no decorrer dos anos, uma desvantagem competitiva quando comparados com abordagens que fazem uso de bibliotecas químicas sintéticas (KOEHN; CARTER, 2005).

Por outro lado, parte da população mundial, principalmente os habitantes dos países em desenvolvimento, depende de plantas para os cuidados primários de saúde. Doravante, nas últimas décadas o interesse pelas propriedades medicinais dos recursos genéticos vegetais aumentou nos países industrializados, com o uso crescente da etnobotânica (FONGANG et al., 2017). Uma análise das drogas regulamentadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981 e 2010 revelou que 34% das substâncias aprovadas naquele período foram obtidas diretamente de elementos da natureza ou de seus derivados, incluindo agentes antimicrobianos, drogas anticâncer e imunossupressoras (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; NEWMAN, CRAGG, 2012).

Diante disso, ainda que a elaboração de medicamentos pela via sintética seja mais rápida e economicamente viável, a natureza figura como detentora da maior fonte de estruturas moleculares e sua diversidade química explica o restabelecimento do interesse das

companhias pelo potencial terapêutico dos produtos naturais ocorrido mais recentemente (HARVEY et al., 2015).

A correlação entre a estrutura química dos constituintes ativos isolados de plantas e a sua respectiva ação fisiológica favoreceu, ao longo dos anos, a descoberta de moléculas naturais de elevada atividade farmacológica. O desenvolvimento da química analítica, através dos métodos cromatográficos e espectrométricos, atrelado ao advento de equipamentos sofisticados permitiram um melhor conhecimento da composição química das drogas vegetais e da estrutura dos seus componentes ativos (CUNHA, 2007). Embora a descoberta de candidatos a fármacos baseada em bioprospecção necessite de uma abordagem interdisciplinar altamente integrada, os avanços tecnológicos mais recentes indicam que os produtos naturais estarão entre as fontes mais importantes de novos medicamentos também no futuro (NEWMAN, CRAGG, 2012).

De acordo com Harvey e colaboradores (2015), o uso da metabolômica e da metagenômica na identificação de novas classes de metabólitos secundários, os avanços na química combinatória e na bioinformática e a sensibilidade das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias contribuíram para a reemergência da bioprospecção de fármacos a partir de extratos, frações ou compostos purificados.

Assim, a pesquisa fitoquímica, tradicionalmente, favoreceu tanto o conhecimento dos constituintes químicos de espécies vegetais como a constatação da sua presença. E as terapias que envolvem o uso de produtos naturais derivados de plantas mostraram, ao longo tempo, potencial promissor, embora muitos desses ainda não tenham sido testados a respeito do seu modo de ação, contra-indicações, toxicidade, possíveis reações adversas e interações com substâncias farmacêuticas convencionais (EKOR, 2014). Portanto, é crucial obter informações detalhadas sobre a composição química das espécies vegetais, bem como uma avaliação minuciosa dos seus potenciais farmacológicos, visto que a pronunciada diversidade dos metabólitos secundários é uma fonte relevante para a busca de novos medicamentos (HARVEY et al., 2015).

## 2.4 Estudos químicos e biológicos em *Myrcia* spp. (MYRTACEAE)

A família Myrtaceae é uma das mais representativas, em riqueza e abundância, nas florestas tropicais e subtropicais do globo (JUDD et al., 1999), distribuindo-se em todos os continentes do hemisfério sul com cerca de 145 gêneros e 5970 espécies (WCSP, 2019). No Brasil, ocorre de forma mais expressiva na Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015), com todos os exemplares pertencentes à subfamília Myrtoideae, a qual reúne plantas frutíferas, algumas exploradas comercialmente a exemplo da goiabeira, *Psidium guajava* L.; da jabuticabeira, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.; e da pitangueira, *Eugenia uniflora* L. (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Os primeiros estudos fitoquímicos com representantes da família Myrtaceae revelaram a presença de triterpenos, flavanonas, acetofenonas e flavonóis (GOTTLIEB et al., 1972; YOSHIKAWA et al., 1998). Outros trabalhos demonstraram a eficácia dos seus óleos essenciais e extratos como: acaricida (CHAGAS et al., 2002); antimicrobiana frente a diversos micro-organismos (FRANCO et al., 2005); leishmanicida *in vitro* (BEZERRA et al., 2006); antinociceptiva e anti-inflamatória (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2009).

O gênero *Myrcia* é um dos maiores da família, com mais de 700 espécies distribuídas do México até a região sul do Brasil, seus representantes caracterizam-se pela presença de indivíduos subarbustivos a arbóreos, com folhas geralmente evidenciando nervura marginal e pontos translúcidos no limbo, devido à presença de glândulas oleíferas (SOBRAL, 2003).

Suas plantas são usadas na medicina popular no tratamento de diarreia, enterite, aftas, úlceras, hipertensão, e principalmente diabetes. Destacam-se no referido gênero os compostos fenólicos, responsáveis pela elevada atividade antioxidante de suas espécies (SOUZA; MÜLLER, 2006). Além do uso etnobotânico, foram descritas as propriedades: hipoglicêmica (MATSUDA et al., 2002); hepatoprotetora em modelo animal (FERREIRA et al., 2010); antimicrobiana (CÂNDIDO et al., 2010; SILVA; UETANABARO; LUCCHESI, 2013); antioxidante (PEREIRA et al., 2011; MORESCO, 2011); hipolipidêmica em modelo animal (VAREDA et al., 2012); anti-inflamatória e antinociceptiva (OLIVEIRA et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

As pesquisas com metabólitos secundários de plantas, demonstram que os terpenoides, compreendem uma variedade de compostos com ações: sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (POSER et al., 2009). Experimentos com sesquiterpenos

indicaram sua ação analgésica do tipo opioide, em modelo animal (DATTA et al., 2004) e alguns estudos realizados com espécies de *Myrcia* (ANDRADE et al., 2012; SANTOS et al., 2014) revelaram que seus óleos essenciais são, em sua maioria, ricos em sesquiterpenos, e apresentam atividade de antinocicepção além de reduzir os processos inflamatórios em animais. Diante das informações supracitadas, nota-se que as espécies de *Myrcia* são fontes promissoras para a prospecção de ativos com possibilidade de ação antinociceptiva e anti-inflamatória.

Vale ressaltar que apenas dois estudos foram publicados, até o momento, a respeito dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Myrcia*. Em Andrade e colaboradores (2012), o óleo de *M. pubiflora*, constituído majoritariamente pelo óxido cariofileno (22,16%), foi testado em três modelos de nocicepção (ácido acético, formalina e placa quente) e um de inflamação (migração de leucócitos para a cavidade peritoneal). Os resultados indicaram sua capacidade para minimizar a dor e a inflamação sem afetar a coordenação motora dos animais.

No trabalho de Santos et al. (2014), os óleos essenciais obtidos das folhas de *Myrcia ovata* ricos em citral, neral e geranial, constituintes conhecidos por seus efeitos analgésicos, foram testados em animais através de modelos de dor aguda (teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e teste da formalina) e de inflamação aguda (teste do edema de pata induzido pela carragenina). Os resultados mostraram que o óleo exibiu um efeito anti-inflamatório e antinociceptivo considerável nas doses de 200 mg/Kg e 300 mg/Kg, sem alterar a performance motora dos camundongos.

Em se tratando de *Myrcia rostrata*, os estudos restringem-se à análise química dos óleos essenciais, a qual revelou a predominância de sesquiterpenos (93,3%), principalmente dos grupos cadinanos e germacranos (LIMBERGER et al., 2004), não havendo menção de trabalhos que investiguem seu potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, tampouco para a *Myrcia splendens*. Diante do exposto, o potencial biológico e farmacológico dos representantes da família Myrtaceae e a escassez de estudos envolvendo as espécies de *Myrcia* citadas impulsionaram a realização da presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- ANDRADE, G. S. et al. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2012, 22, 81–188.
- ARAÚJO, D. R. de; PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. *Quim. Nova*, 2008, 31, 7, 1775–1783.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 2015, 33, 1582–1614.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. *Cell*, 2009, 139, 267–284.
- BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENSON, A. **Pharmacology of Pain**. Washington: IASP Press, 2010, 636 p.
- BERGER et al. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Research Views*, 2011, 67, 282–310.
- BEZERRA, J. L., et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006, 16, 631–637.
- CALCAGNOTTO, M. H. **Contextualizando a dor**. *Do corpo: Ciências e Artes*, Caxias do Sul, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2011.
- CÂNDIDO, C. S. et al. Effects of *Myrcia ovata* Cambess essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41, 621–627.
- CARLINI, E. A; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental**. São Paulo: Fap-Unifesp, p. 183–216, 2011.
- CASCAES, M.; GUILHON, G.; ANDRADE, E.; ZOGHBI, M.; SANTOS, L. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 10, 23881–23904.
- CHAHADE, W. H. et al. Os anti-inflamatórios não esteroidais. *Temas de Reumatologia Clínica*, 2008, 9, 2.

CHAGAS, A. C. de S., et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 2002, 39, 5.

CUNHA, Antônio Proença da. **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até o presente**. Coimbra: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.

DATTA, B. K.; DATTA, S. K.; CHOWDHURY, M. M.; KHAN, T.; KUNDU, J. K.; RASHID, M. A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Analgesic, anti-inflammatory and CNS depressant activities of sesquiterpenes and a flavonoid glycoside from *Polygonum viscosum*. *Pharmazie*, 2004, 59, 222–225.

DIAS, D. A., URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2012, 2, 303–333.

DINARELLO, C.A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 2010, 140, 935–950.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 14, 1–10.

FARIA, J. L. de. **Patologia Geral: Fundamentos das Doenças, com Aplicações Clínicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs Review*, 1993.

FITZPATRICK, F. A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des.*, 2004, 10, 6, 577–588.

FONGANG, A. L. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the methanolic stem bark extract of *Antrocaryon klaineianum* Pierre (Anacardiaceae) in mice and rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 203, 11–19.

FORNASARI, D.; COACCIOLI, S. Pharmacology of pain. *Reumatismo*, 2014, 66, 1, 14–17.

FRANCO, J., et al. Composição Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2005, 15, 3, 191–194.

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

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3, 401–416.

GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. *Phytochemistry*, 1972, 11, 1185.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 2006, 29, 509–530.

GUIMARÃES, A. G.; MELO, M. S.; BONFIM, R. R.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. de S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009, 19(4), 883–887.

GUIMARÃES, A. G., et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 2010, 107, 949–957.

HARVEY, A. L., et al. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14, 111–129.

HEINRICHER, M.M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*, 2009, 60, 214–222.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). 1510 H St. N.W., Suite 600, Washington, D.C. 20005-1020, USA, 2014. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews>>. Acesso em: 22 de outubro 2017.

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

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

KAZANOWSKI, M. K.; LACCETTI, M. S. **Dor: fundamentos, abordagem clínica, tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 256p.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, 4, 3, 206–220.

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

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, SW. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53, 4, 597–652.

LIMBERGER, R. P. et al., Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* DC. nativas do Rio Grande do Sul. *Quím. Nova.*, 2004, 27, 6, 916–919.

LYSS, G.; SCHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; PAHL, H. L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- $\kappa$ B. *Biol. Chem.*, 1997, 378, 951–961.

MATSUDA, H.; NORIHISA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines: Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* (Lam) DC. Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. *Chemical Pharmaceutical Bull.*, 2002, 50, 429–431.

- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress Neurobiology*, 1999, 57, 160–164.
- MOLDOVEANU, B., et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of Inflammation Research.*, 2009, 2, 1–11.
- MORESCO, H. H.; COLLA, G.; OLIVEIRA, A. S.; BRIGHENTE, I. M. C. **Atividade antioxidante de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. por três diferentes métodos.** 51º Congresso Brasileiro de Química, São Luís-MA, 09 a 13 de outubro de 2011.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, 2002, 420, 846–852.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 2012, 75, 311–335.
- OKUSE, Kenji. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39, 490–496.
- OLIVEIRA, R. B. de et al. **Avaliação da Atividade Anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *Myrcia paivae* O. Berg (Myrtaceae).** In: 61ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus, AM. 12 a 17 de julho de 2009.
- PEREIRA, M. et al. **Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de *Myrcia palustres* DC.** In: Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- POSER, G. L. von et al. Terpenoides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Brazilian Journal of Pharmacognosy.*, 2009, 19, 140–149.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2009, 19, 4, 883–887.
- QUINTÃO, N. L. M.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Modelos animais para o estudo de drogas analgésicas. In: CARLINI, E. A; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental.** São Paulo: Fap-Unifesp, p. 183-216, 2011.
- RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem.*, 2007, 42, 3–27.
- RANG, H. P., et al. Fármacos analgésicos. In: **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Elsevier. p. 503–524, 2011.
- RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Sci.*, 2008, 11, 2, 81–110.
- RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Anti-inflammatory Activities of Flavonoids and a Triterpene Caffeate Isolated from *Bauhinia variegata*. *Phyther. Res.*, 2008, 22, 957–962.

- RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural terpenoids. *Planta Med.*, 1995, 61, 182–185.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2011, 31, 5, 986–1000.
- SALMINEN, A.; OJALA, J.; HUUSKONEN, J.; KAUPPINEN, A.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K. Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci.*, 2008, 65, 7, 1049–58.
- SANTOS, G. C. M dos. et al. Essential Oil from *Myrcia ovate* Cambess: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice, *Planta Med.*, 2014, 80, 1588–1596.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci.*, 2002, 5, 1062–1067.
- SILVA, A. do N.; UETANABARO, A. P. T; LUCHESE, A. M. Chemical composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Myrcia alagoensis* O. Berg (MYRTACEAE). *Natural Product Communications*, 2013, 8, 2, 269–271.
- SILVA, S. M. da; COSTA, C. R. R.; GELFUSO, G. M.; GUERRA, E. N. S.; NÓBREGA, Y. K. de M.; GOMES, S. M.; PIC-TAYLOR, A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P de O. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) Leaves. *Molecules*, 2019, 24, 1, 2–18.
- SOBRAL, M. **A Família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul.** São Leopoldo, RS: UNISINOS, 2003, p. 15–17.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015 *Myrtaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19862>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2019.
- SBED – SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. Porque a dor é também uma questão de saúde pública. Disponível em: <[http://www.sbed.org.br/materias.php?cd\\_secao=74&codant=&friurl=-Dor-no-Brasil-](http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=74&codant=&friurl=-Dor-no-Brasil-)>. Acesso em: 22 de outubro de 2017.
- SOUZA, S. C.; MÜLLER, A. H. Estudo químico e atividade biológica de *Myrcia guianensis* (Pedra-ume-caá). *Revista Científica da Universidade Federal do Pará.* Belém-PA, 6 ed, 2006.
- TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. (Editors). **The Pharmacology of Pain.** Handbook of Experimental Pharmacology. v. 130. 1. ed. Berlin: Springer, 1997. p. 1–20.
- 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.

TSUCHIYA, H. Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules*, 2017, 22, 8, 1369–1403.

VAREDA, P. M. P. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Myrcia bella* Cambess in streptozotocin - diabetic mice. *Planta Medica*, 2012, 78, 11.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn.*, 2005, 15, 361–372.

VISCARDI, D. Z.; ARRIGO, J. da S.; CORREIA, C. de A. C.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; MALDONADE, I. R.; ARGANDOÑA, E. J. S. *Seed and peel essential oils obtained from Campomanesia adamantium fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. PLOS ONE*, 2017, 12, 2.

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

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N. LI, Y., TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines: II aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B., *Chem. Pharm. Bull.*, 1998, 46, 113.

WCSP – WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES. 2019. (MYRTACEAE). Facilitado por The Royal Botanic Gardens, Kew. < <http://wcsp.science.kew.org/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

## CAPÍTULO 1 – POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE MYRTACEAE: UMA REVISÃO

Aline do Nascimento Silva<sup>1\*</sup>, Horácio Freitas Bomfim<sup>2</sup>, Acsa Oliveira Magalhães<sup>1</sup>, Marilene Lopes da Rocha<sup>1</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>

### ABSTRACT

(ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS OF MYRTACEAE: A REVIEW). The family Myrtaceae is one of the most important in richness and abundance in Brazil. Its species stand out for producing sesquiterpene-rich volatile compounds. This study aimed to conduct a review of articles discussing the antinociceptive and anti-inflammatory properties of their essential oils. To that end, a detailed search in the main databases was carried out, and twenty articles were selected after inclusion and exclusion criteria were applied, three focusing on plants of the genus *Myrcia*. Species name, popular use, chemical constituents identified, pharmacological tests used and results obtained were briefly described for each article. Analysis of the material showed that the sesquiterpenes present in myrtaceae exhibit significant action in different pain and inflammation models and are a promising source for discovering bioactive compounds with potential to alleviate pain and inflammatory processes.

**Keywords:** Synergism. Terpenes. Nociception. Inflammation.

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

\*E-mail: enilaans@gmail.com

## 1.1 Introdução

A família Myrtaceae destaca-se como uma das maiores em número de espécies no território brasileiro e mais notadamente na Mata Atlântica (DESCHAMPS et al., 2017), suas plantas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças infecciosas, inflamação, diabetes e na diminuição do colesterol (CRUZ; KAPLAN, 2004). Além disso, é reconhecida pela produção de compostos voláteis com propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória que desperta o interesse econômico (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Os óleos essenciais são caracterizados como um produto do metabolismo secundário de plantas sendo dotados de uma composição química complexa, tal variedade de constituintes possibilita o uso tanto pela indústria de alimentos e cosméticos como a farmacêutica (MIRANDA, et al., 2016). Muitos estudos abordando as atividades antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante e citotóxica dos óleos obtidos de diferentes espécies de Myrtaceae foram descritos (STEFANELLO et al., 2011). Entretanto, as ações antinociceptiva e anti-inflamatória ainda são pouco estudadas, principalmente no que concerne às plantas do gênero *Myrcia* (ANDRADE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2018).

Os efeitos significativos dos óleos essenciais em modelos de dor e, principalmente, inflamação tem sido atribuídos aos terpenos (SIANI et al., 2013). Assim, na busca por produtos naturais bioativos, os óleos e seus isolados são cada vez mais citados como uma fonte rica e promissora, podendo ser usados sozinhos ou como adjuvantes de medicamentos já disponíveis na terapêutica (SÁ et al., 2013). No Brasil, um exemplo de sucesso é a *Cordia verbenaceae* DC. (Boraginaceae) utilizada para o desenvolvimento de um anti-inflamatório de uso tópico e que teve sua ação atrelada à presença de dois sesquiterpenos:  $\alpha$ -humuleno e (-)-*trans*-cariofileno (AMORIM et al., 2009).

Partindo da premissa que a maioria dos óleos essenciais de Myrtaceae analisada até o momento caracteriza-se pela predominância de sesquiterpenos, a possibilidade de descoberta de substâncias com potencial antinociceptivo ou anti-inflamatório em suas espécies é factível. Diante disso, esse estudo propôs realizar um levantamento de dados no tocante a ação dos referidos metabólitos secundários em modelos de dor e inflamação.

Para tanto, deu-se preferência aos trabalhos realizados exclusivamente com plantas nativas do continente americano, ou com aquelas utilizadas de modo tradicional pela população brasileira, ainda que tenham sido introduzidas, a exemplo do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L. *syn* *Eugenia caryophyllata* Thunb). Todos os artigos publicados na literatura até fevereiro do presente ano foram compilados com destaque para o nome de cada espécie, o órgão vegetal do qual o óleo foi obtido, o uso popular, os testes farmacológicos realizados, os constituintes químicos identificados bem como os resultados dos experimentos.

## 1.2 Material e métodos

A revisão da literatura a respeito das propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias dos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae foi executada mediante a busca de artigos científicos nas bases de dados Bireme, Cochrane Library, DARE, Lilacs, PubMed, ScienceDirect e SciELO. Foi pesquisado todo o período até fevereiro de 2019, utilizando-se as palavras-chaves: “Myrtaceae and pain”, “Myrtaceae and inflammation”; “Myrtaceae and nociception”; “Myrtaceae and anti-inflammatory activity”; “Myrtaceae and antinociceptive activity”; “*Myrcia* and pain”; “*Myrcia* and inflammation” e “*Myrcia* and essential oil”.

Após o levantamento inicial excluiu-se, de imediato, as replicatas com o auxílio do programa *EndNote Web* versão X8. Por intermédio da leitura do título de cada publicação foram excluídos os estudos com extratos vegetais, frações ou seus isolados; trabalhos com mirtáceas não-americanas, a exemplo dos gêneros: *Eucalyptus*, *Melaleuca* e *Taxandria*; artigos de revisão e também aqueles que envolviam outras atividades biológicas ou farmacológicas.

Portanto, foram incluídos nessa revisão apenas os trabalhos com os óleos essenciais ou os majoritários isolados de espécies americanas de Myrtaceae (subfamília Myrtoidea). Além disso, optou-se por descrever, sucintamente, o nome de cada uma das espécies, seus usos populares (se informados), os testes de atividades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória realizados, os constituintes químicos identificados que apresentaram percentuais relativos superiores a 4% (quando informados), assim como os resultados obtidos, os autores e o ano de publicação.

### 1.3 Resultados e discussão

A busca inicial resultou num total de 896 artigos e destes, 104 tratavam de experimentos com espécies de *Myrcia*. O programa *EndNote Web* removeu 294 replicatas, reduzindo para 602 o número total de trabalhos para a família Myrtaceae, e deste, 62 relacionados ao gênero *Myrcia* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Levantamento dos artigos relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de espécies de Myrtaceae, em geral, e de *Myrcia* publicados nas principais bases de dados antes e após a remoção de replicatas.

Bases de dados	Artigos publicados*			
	Myrtaceae		<i>Myrcia</i>	
	Antes	Após	Antes	Após
BIREME	215	120	2	0
Cochrane Library	2	2	0	0
DARE	0	0	0	0
Lilacs	25	18	2	2
PubMed	289	184	2	0
Science Direct	331	274	97	59
SciELO	34	4	1	1
<b>Total</b>	<b>896</b>	<b>602</b>	<b>104</b>	<b>62</b>

\*Publicações até fevereiro de 2019.

Os títulos de todos os 602 artigos remanescentes foram lidos, a fim de que apenas aqueles relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de óleos essenciais fossem mantidos. Essa tarefa foi de extrema importância uma vez que possibilitou identificar e compilar trabalhos abordando as ações anti-leishmania, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-neoplásica, hipoglicêmica, hipolipidêmica, espasmolítica, hepato e gastroprotetora, imunomoduladora, tanto de óleos essenciais como de extratos, frações e substâncias isoladas de diferentes espécies da família, o que favorecerá a publicação de trabalhos futuros.

A Tabela 2 reúne os artigos separados por plataforma de busca após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. É possível observar que de um universo de 602 trabalhos, 21 tratavam especificamente da ação antinociceptiva e anti-inflamatória dos óleos essenciais de Myrtaceae, e desses últimos, apenas três foram referentes às plantas do gênero *Myrcia*, sendo um dos artigos produto do nosso grupo de pesquisa.

**Tabela 2:** Levantamento dos artigos relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos óleos essenciais obtidos de espécies de Myrtaceae, em geral, e de *Myrcia* publicados nas principais bases de dados após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

Base de dados	Artigos publicados*	
	Myrtaceae	<i>Myrcia</i>
BIREME	11	1
Cochrane Library	0	0
DARE	0	0
Lilacs	4	1
PubMed	1	0
Science Direct	3	0
SciELO	2	1
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>3</b>

\* Publicados até fevereiro de 2019.

Realizando uma breve análise dos dados reunidos na Tabela 3 nota-se que além dos trabalhos terem sido publicados recentemente, a maioria dos pesquisadores utilizou as folhas como fonte de obtenção dos óleos essenciais e os achados referentes à sua composição química confirmam a predominância de sesquiterpenos tão amplamente descrita na literatura para as espécies de Myrtaceae (HENRIQUES et al., 1997; LIMBERGER et al., 2004; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011; SILVA et al., 2013).

Ainda a respeito da composição química, vale ressaltar que sete trabalhos tiveram o  $\beta$ -cariofileno e cinco o  $\alpha$ -humuleno como constituintes majoritários. O primeiro sesquiterpeno contribuiu para a inibição tanto da produção do NO quanto da migração leucocitária (SILVA et al., 2019) assim como apresentou efeito analgésico no teste da placa quente (AMORIM et al., 2009) minimizando também a sensação dolorosa neurogênica e inflamatória induzidas por formalina (APEL et al., 2010). Já o  $\alpha$ -humuleno, um dos constituintes do Acheflan®, primeiro anti-inflamatório desenvolvido a partir de uma planta nativa brasileira (AMORIM et al., 2009), auxiliou na diminuição da resposta hipernociceptiva induzida pela lesão ciática (QUINTÃO et al., 2010).

Foi relatado também que alguns sesquiterpenos do tipo cariofileno foram capazes de atuar de forma sinérgica potencializando o efeito de óleos essenciais ricos em monoterpenos (SIANI et al., 2013). Portanto, esses achados corroboram a notoriedade dos sesquiterpenos como responsáveis pelos importantes efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo atribuídos às espécies da família Myrtaceae e apontam que a mesma é uma fonte promissora para a descoberta de novos medicamentos.

**Tabela 3:** Levantamento dos dados referentes à composição química e às atividades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória dos óleos essenciais ou de seus isolados obtidos de espécies da família Myrtaceae

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Calycorectes sellowianus</i> O. Berg	Folhas	Não informado	Migração leucocitária <i>in vitro</i> ; Edema de pata induzido pela carragenina	Guaiol (13,1%); β-cariofileno (8,6%); α-cadinol (7,9%); iso- espatulenol (7,3%); espatulenol (6,6%) e τ- muurolol; óxido de cariofileno (4,4%); globulol (4,1%)	O óleo (50 mg/Kg) reduziu em 93% a migração leucocitária comparado ao controle. Além de diminuir o edema em 61,3; 58,2; 61,1 e 61,9% aos 60, 120, 180 e 240 min após o tratamento, com resultados semelhantes à indometacina na dose de 10 mg/kg	APEL et al., 2010
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg	Casca dos frutos e sementes secas	Usada como antirreumática, antidiarreico, hipocolesterolêmico, anti-inflamatório (RAMOS et al., 2007) e no tratamento da cistite e uretite (PASCOAL et al., 2014)	Edema de pata induzido por carragenina e formalina; Pleurisia; Nocicepção espontânea induzida por formalina e sensibilidade ao frio	Casca dos frutos: limoneno (13%); thujopseno (6,96%); biciclogermacreno (4,91%); β-pineno (4,82%); α-pineno (4,67%) e globulol (4%). Sementes: limoneno (20,89%); β-pineno (11,48%); α-pineno (8,5%); thujopseno (6,82%) e E-β-ocimeno (4,12%)	Os óleos da casca e das sementes (300 mg/kg) inibiram a migração leucocitária em 89 e 80%; reduziram o edema induzido por carragenina em 72 e 74%; o edema induzido por formalina em 53 e 79%, respectivamente; além de atenuarem a hipersensibilidade ao frio e serem efetivos em ambas as fases do teste da formalina	ZUNTINI et al., 2017
<i>Eugenia candolleana</i> DC.	Folhas	A infusão das folhas frescas é utilizada no tratamento da dor e da febre	Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; Teste da formalina; Placa quente e Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	Dados não informados	Redução dose dependente no número de contorções, com percentual de inibição de 89,6% (100 mg/Kg); inibição da fase 2 do teste da formalina (96,7% para a dose de 50 mg/Kg do óleo); decréscimo da migração leucocitária em 52,6% (100 mg/kg), porém ineficaz no teste da placa quente.	GUIMARÃES et al., 2009

Tabela 3: continuação

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	Botões florais	Dor e inflamação	Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; Placa quente; Edema de pata induzido por carragenina e Pleurisia induzida por carragenina	Eugenol	O eugenol (400 mg/Kg v.o) inibiu o edema de pata; reduziu o extravasamento de líquido na pleurisia em 41,1%, mas não interferiu na migração leucocitária. Reduziu o número de contorções em 61,6; 64,8 e 88,3% quando administrado nas doses de 50, 75 e 150 mg/Kg, respectivamente. Entretanto, foi incapaz de aumentar a latência no teste da placa quente.	DANIEL et al., 2009
		Não informado	Teste da formalina e Teste de retirada da cauda	Eugenol (87,34%) e acetato de eugenila (5,18%)	Na dose de 0,1 mL/Kg houve redução da resposta dolorosa em ambas as fases do teste da formalina. No teste de retirada da cauda, o óleo aumentou a latência com reversão da analgesia pela administração prévia de naloxona.	HALDER et al., 2012
		Antiespasmódico e carminativo	Edema de pata induzido por carragenina; Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; Placa quente e Atividade antipirética	Não informado	O óleo na dose de 33 mg/Kg provocou a diminuição do edema de pata em 50,6%; a redução das contorções abdominais em 87,7% comparada ao controle; o aumento no tempo de latência na placa quente de 82,3% e a diminuição da temperatura retal.	TAHER et al., 2017
		Não informado	Análise de 17 biomarcadores relacionados à inflamação, resposta imune e processos de remodelação tecidual	Não informado	Atividade antiproliferativa em fibroblastos dérmicos humanos, Diminuição dos níveis de biomarcadores inflamatórios.	HAN; PARKER, 2017

**Tabela 3:** continuação

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	Folhas	Não informado	Teste de cicatrização; Efeito na produção de NO, induzida, por lipopolissacarídeos; Atividade de angiogênese	$\beta$ -cariofileno (24,36%) e $\alpha$ -humuleno (19,3%)	Inibição da produção de NO; promoção da angiogênese; indução da migração celular com efeito na cicatrização e possibilidade de produção de produtos dermatológicos capazes de promover reparo de tecidos danificados.	SILVA et al., 2019
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Folhas	Infusões ou decoctos usados para tratar inflamações, dores reumáticas e febre, como hipoglicemiante, diurético e em problemas estomacais (AURICCHIO; BACCHI, 2003)	Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; Placa quente e Atividade hipotérmica	Espatuleno; $\beta$ -elemeno; $\gamma$ -elemeno; globulol; ledeno e $\beta$ -cariofileno. Sesquiterpenos identificados na fração pentano: atractilona e furanoeudesmeno.	O óleo reduziu em 48% as contorções abdominais e a fração contendo os sesquiterpenos em 70%; A fração pentano provocou o aumento do tempo de latência na placa quente e a diminuição da temperatura corporal dos animais	AMORIM et al., 2009
<i>Myrcia ovata</i> Cambess.	Folhas	Infusões das folhas para o tratamento de doenças gástricas e diarreia (ANDRADE et al, 2012).	Contorções abdominais induzidas por ácido acético; Teste da formalina; Teste de retirada da cauda; Edema de pata induzido por carragenina; Permeabilidade vascular de leucócitos; Medida dos níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$	4 monoterpenos oxigenados (91,78%). Nomes dos constituintes identificados não informados.	Para a dose de 300 mg/Kg, houve redução de 51% no número de contorções; diminuição de 59% e 54% no tempo de lambida da pata nas fases 1 e 2, respectivamente; aumento na latência de 91% no teste de retirada da cauda; redução do edema em 50%; inibição de 77% da migração leucocitária e supressão em 47 e 69% da produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , respectivamente.	DOS SANTOS et al., 2014

Tabela 3: continuação

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Myrcia pubiflora</i> DC.	Folhas	Não informado	Teste da formalina; Placa quente; Migração leucocitária para a cavidade peritoneal	Óxido de cariofileno (22,16%); mustacona (11,34%); 1,8-cineol (5,35%); tricicleno (5,27%); <i>trans</i> -pinocarveol (4,71%); mirtenol (4,31%)	No teste da formalina, o óleo não inibiu o tempo de lambida na fase 1, mas provovou uma redução de 98,56% na fase 2 (dose 100 mg/Kg); na placa quente, o óleo foi ineficaz, em todas as doses, quando comparado ao controle. Já a migração leucocitária foi inibida nas três doses.	ANDRADE et al., 2012
<i>Myrcia rostrata</i> DC.	Folhas frescas	Não descrito	Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; Teste da formalina; Placa quente.	Carotol (17, 68%); germacreno B (7,28%); <i>E</i> -cariofileno (6,45%); germacreno D (5,68%); amorfa-4,7(11)-dieno (4,98%); $\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno (4,75%); biciclogermacreno (4,73%); dauceno (4,7%) e $\beta$ -bisaboleno (4,46%)	Para a dose de 300 mg/Kg, o número de contorções abdominais foi reduzido em 94,18%. Na fase 1 do teste da formalina, o tempo de lambida foi reduzido em 61,5% e na fase 2 em 91,5%. Na placa quente, houve aumento da latência aos 30, 60, 90 e 120 min, com valores semelhantes à morfina (10 mg/kg).	SILVA et al., 2018
<i>Myrciaria tenella</i> (DC.) O. Berg	Folhas	Não informado	Migração leucocitária <i>in vitro</i> ; Edema de pata induzido pela carragenina.	$\beta$ -cariofileno (25,1%); espatulenol (9,7%); globulol (5,9%) e $\alpha$ -cadinol (5,2%); $\alpha$ -selineno (4,4%) e $\alpha$ -humuleno (4,2%).	O óleo (50 mg/Kg) reduziu em 91% a migração leucocitária comparado ao controle. Porém não elicitou redução do edema em comparação ao controle.	APEL et al., 2010
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) L. R. Landrum	Folhas	As folhas têm ações calmante; diurética; são usadas no tratamento de resfriados; problemas digestivos e menstruais (SANTOS et al., 2009)	Contorções abdominais induzidas por ácido acético; Edema de orelha induzido por óleo de <i>Croton</i>	Quimiotipo I: ( <i>E</i> )-metil isoeugenol (93,9%); Quimiotipo II: neral (27,59% ) e geranial (36,49%)	Os quimiotipos I e II testados nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg inibiram as contorções abdominais e apresentaram ação anti-edematogênica de modo dose dependente quando comparado ao controle. Não foi possível inferir se o mecanismo analgésico foi periférico ou central.	PAULA et al., 2012

Tabela 3: continuação

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Psidium guajava</i> L. e <i>Syzygium cumuni</i> (L.) Skeels	Folhas	Não informado	Foi avaliado o efeito sinérgico dos óleos de ambas espécies, bem como de 4 terpenos isolados no teste da pleurisia induzida por LPS com contagem de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares	<i>Psidium guajava</i> apresentou alto teor de sesquiterpenos (85%), com predomínio de: $\beta$ -cariofileno, $\alpha$ -humuleno, $\beta$ -selineno, $\alpha$ -selineno e $\alpha$ -muurulol. Com <i>Syzygium cumuni</i> rico em monoterpenos (69%), sendo os majoritários: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, limoneno, <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno, <i>trans</i> - $\beta$ -cimeno, $\alpha$ -terpineol, $\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -humuleno.	Os óleos essenciais de <i>P. guajava</i> e <i>S. cumuni</i> inibiram a migração leucocitária em 67%. A presença dos sesquiterpenos isolados: limoneno, ocimeno, $\alpha$ -pineno e cariofileno contribuiu para a atividade anti-inflamatória do óleo rico em monoterpenos. Além disso, o $\alpha$ -pineno foi capaz de atuar de forma sinérgica tanto com o óleo rico em mono quanto em sesquiterpenos.	SIANI et al., 2013
<i>Psidium guineense</i> Sw.	Folhas	As folhas são usadas no tratamento da inflamação (FRANZON et al., 2009).	Edema de pata induzido por carragenina; Pleurisia induzida por carragenina;	espatulenol (80,71%)	O óleo inibiu o edema em até 59,46%. O óleo essencial (nas doses de 30 e 100 mg/Kg) e o espatulenol isolado (100 mg/Kg) reduziram a migração leucocitária em 45,33; 77,70 e 75,2%, respectivamente.	NASCIMENTO et al., 2018
<i>Psidium pohlianum</i> Berg	Folhas frescas	Não informado	Teste da formalina; Placa quente e compressão caudal	1,8-cineol (63,3%); <i>p</i> -cimeno (14,1 %); <i>p</i> -eudesmol (8,8%); $\alpha$ -terpinil acetato (7,2%)	Nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, houve redução do tempo de lambida da pata em 25, 45 e 84% (na fase 1) e de 31, 95 e 100% (na fase 2); aumento da latência na placa quente, não antagonizado pela naloxona. No teste de compressão caudal apenas a maior dose foi significativa em comparação ao controle.	SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1996

Tabela 3: continuação

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Testes realizados	Percentual dos majoritários (>4%) e/ou isolados	Resultados	Referência
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Botões florais secos	Não informado	Atividade anestésica no teste do reflexo conjuntival de coelhos e Atividade anestésica <i>in vitro</i> do nervo frênico de rato	$\beta$ -cariofileno isolado	Redução dose dependente do reflexo conjuntival e das contrações do nervo frênico	GHELARDINI et al., 2001
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Botões florais	Não informado	Nocicepção espontânea induzida por formalina do óleo essencial, do eugenol isolado e do óleo associado ao AINE cetorolaco	eugenol (79,2%)	O óleo essencial na dose de 100 $\mu$ g/pata reduziu a nocicepção em 74,55%. O eugenol isolado ou associado ao AINE, assim como o óleo em associação com o AINE reduziram de forma significativa, em comparação ao controle, a nocicepção induzida por formalina, indicando o efeito sinérgico na resposta antinociceptiva.	BELTRÁN-VILLALOBOS et al., 2017
<i>Syzygium cumuni</i> (L.) Skeels	Folhas	Usada no tratamento do diabetes; distúrbios gástricos e renais (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012)	Análise do padrão inflamatório induzido pela linhagem BCG Pasteur ( <i>Mycobacterium bovis</i> ) no tecido hepático de ratos	$\alpha$ -cariofileno (25,24%); $\beta$ -cariofileno (16%); $\alpha$ -terpineol (9,08%); epiglobulol (5,23%); iso-cariofileno (4,9%); $\beta$ -humuleno (4,82%)	O óleo foi capaz de interromper a proliferação de <i>M. bovis in vitro</i> e o desenvolvimento da inflamação granulomatosa no parênquima hepático dos animais após 21 dias da infecção.	MACHADO et al., 2013
<i>Ugni myricoides</i> (Kunth) O. Berg	Folhas	Não informado	Hipernocicepção mecânica induzida por carragenina e avaliada com filamentos de Von Frey; avaliação da dor neuropática pela ruptura e religamento do nervo ciático	$\alpha$ -pineno (52,1%); 1,8-cineol (11,9%); $\alpha$ -humuleno (4,6%); óxido de cariofileno + globulol (4,5%); epóxido de humuleno II (4,2%)	Houve inibição da resposta hipernociceptiva em 56% na dose de 10 mg/Kg; Diminuição da resposta hipernociceptiva induzida pela lesão ciática, com inibições de 60; 79; 68 e 30% nas doses de 5; 10; 12,5 e 25 mg/Kg, respectivamente. Os autores atribuíram eficácia semelhante entre o óleo e à indometacina e à gabentina.	QUINTÃO et al., 2010

## 1.4 Conclusão

A presente revisão da literatura possibilitou a elaboração de um panorama do potencial das mirtáceas para a descoberta de compostos bioativos com ações antinociceptiva e anti-inflamatória além de confirmar a escassez de trabalhos envolvendo os óleos essenciais de suas espécies. Ademais, a estratégia de busca utilizada possibilitou tanto a criação de um banco de referências sobre diversas atividades biológicas e farmacológicas das espécies nativas e introduzidas da família Myrtaceae quanto o conhecimento de diferentes métodos de experimentação o que favorecerá a consecução de futuros estudos pelo nosso grupo de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*, 2009, 16, 10, 923–928.
- APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M. C. M.; CORDEIRO, I.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. H. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. *Pharmaceutical Biology*. 2010, 48, 4, 433–438.
- AURICCHIO, M. T. BACCHI, E. M.; *Eugenia uniflora* L. “brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2003, 62, 55–61.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012, 2, 240–246.
- BELTRÁN-VILLALOBOS, K. L.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; AGUILAR-MARISCAL, H.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; MARTÍNEZ-SALAZAR, M. F.; RAMÍREZ-CISNEROS, M. de los Á.; RIOS, M. Y.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Synergistic antinociceptive interaction of *Syzygium aromaticum* or *Rosmarinus officinalis* coadministered with ketorolac in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, 94, 858–864.
- CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta Ambient*. 2004, 11, 1, 47–52.
- DANIEL, A. N.; SARTORETTO, S. M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009, 19, 1b, 212–217.
- DESHAMPS, C.; AMARAL, W. do; BIZZO, H. R.; PINTO, M. A. S.; BIASI, L. A.; SILVA, L. E. da. Essential oils yield and composition of Myrtaceae species from Atlantic Forest of South Brazil. *Natural Volatiles and Essential Oils. A Quarterly Open Access Scientific Journal*. 2017, 4, 3.
- DO NASCIMENTO, K. F.; MOREIRA, F. M. F.; ALENCAR SANTOS, J.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J. H. R.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. do C.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. de; FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, 210, 351–358.
- DOS SANTOS, G.; GOMES, G., GONÇALVES, G.; DE SOUSA, L.; SANTIAGO, G.; DE CARVALHO, M.; MARINHO, B. Essential Oil from *Myrcia ovata*: Chemical Composition,

Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. *Planta Medica*. 2014, 80, 17, 1588–1596.

DUNG, N. T.; BAJPAI, V. K.; YOON, J. I.; KANG, S. C. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47, 2, 449–453.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. *Embrapa Cerrados*. 2009, 1–48.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *Il Farmaco*. 2001, 56, 5-7, 387–389.

GUIMARÃES, A. G.; MELO, M. S.; BONFIM, R. R.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. de S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009, 19(4), 883–887.

HALDER, S.; MEHTA, A. K.; MEDIRATTA, P. K.; SHARMA, K. K. Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385, 6, 587–593.

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. *Pharmaceutical Biology*. 2017, 55, 1, 1619–1622.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMARTY, G.; BESSIÈRE, J. M. Essential oils from five Southern Brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). *J. Essent. Oil Res.* 1997, 9, 13–18.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quím. Nova*. 2004, 27, 916–919.

MACHADO, R. R. P.; JARDIM, D. F.; SOUZA, A. R.; SCIO, E.; FABRI, R. L.; CARPANEZ, A. G., GRAZUL, R. M.; MENDONÇA, J. P. R. F. de; LESCHE, B.; AARESTRUP, F. M. The effect of essential oil of *Syzygium cumini* on the development of granulomatous inflammation in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013, 23, 3, 488–496.

MAXIA, A.; FRAU, M. A.; FALCONIERI, D. KARCHULI, M. S.; KASTURE, S. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF-alpha. *Nat Prod Commun*. 2011, 6, 10, 1545–1548.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. das G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. da S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*. 2016, 47, 1, 213-220.

PAULA, J. A. M. de; SILVA, M. do R. R.; COSTA, M. P.; DINIZ, D. G. A.; SÁ, F. A. S.; ALVES, S. F.; COSTA, E. A.; LINO, R. C.; PAULA, J. R. de. Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1–15.

PASCOAL, A. C. R. F.; EHRENFRIED, C. A.; LOPEZ, B. G. C.; ARAÚJO, T. M.; PASCOAL, V.; GILIOLI, R.. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. 2014, 19, 1843–1855.

QUINTÃO, N.; DA SILVA, G.; ANTONIALLI, C.; ROCHA, L.; FILHO, V.; CICCÍO, J. Chemical Composition and Evaluation of the Anti-Hypernociceptive Effect of the Essential Oil Extracted from the Leaves of *Ugni myricoides* Inflammatory and Neuropathic Models of Pain in Mice. *Planta Medica*. 2010, 76, 13, 1411–1418.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L.; YANOMOTO, N. T. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biociência*. 2007, 5, 774–776.

SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*. 2013, 18, 1227–1254.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Naloxone-resistant antinociceptive activity in the essential oil of *Psidium pohlianum* Berg. *Phytomedicine*. 1996, 3, 2, 197–201.

SANTOS, B. C. B. dos; SILVA, J. C. T. da; GUERRERO, P. G.; LEITÃO, G. G.; BARATA, L. E. S. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, 19, 4303–4306.

SIANI, A. C.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharmaceutical Biology*. 2013, 51, 7, 881–887.

SILVA, A. do N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCHESE, A. M. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). *Nat. Prod. Commun*. 2013, 8, 269–271.

SILVA, A. do N.; BOMFIM, H. F.; MAGALHÃES, A. O.; ROCHA, M. L. da; LUCHESE, A. M. Composição química e atividade antinociceptiva em modelo animal do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE). *Química Nova*. 2018, 41, 9, 982–988.

SILVA, S. M. M. da; COSTA, C. R. R.; GELFUSO, G. M.; GUERRA, E. N. S.; NÓBREGA, Y. K. de M.; GOMES, S. M.; PIC-TAYLOR, A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. de O. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) Leaves. *Molecules*. 2019, 24, 2–18.

- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. *Chem. Biodivers.* 2011, 8, 73–94.
- TAHER, Y. A.; SAMUD, A. M.; EL-TAHER, F. E.; BEN-HUSSIN, G.; ELMEZOZI, J. S.; AL-MEHDAWI, B. F.; SALEM, H. A. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. *Libyan Journal of Medicine.* 2015, 10, 1, 28685.
- ZUNTINI, V. D.; ARRIGO, J. da S.; CORREIRA, C. de A. C.; KAASUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; MALDONADE, I. R.; ARGANDOÑA, E. J. S. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PLOS ONE.* 2017, 12, 2–17.

## CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE)

Aline do Nascimento Silva<sup>1\*</sup>, Horácio Freitas Bomfim<sup>2</sup>, Acsa Oliveira Magalhães<sup>1</sup>, Marilene Lopes da Rocha<sup>1</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>

### ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE) IN ANIMAL MODELS. There are approximately 300 *Myrcia* DC. species in Brazil. The antimicrobial, anti-inflammatory and antinociceptive activities of some of these species have been described in the literature. The present study aimed to analyze the chemical composition and evaluate the antinociceptive activity of essential oil from fresh *Myrcia rostrata* DC. leaves. The oil was obtained by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and chemical analysis was conducted by GC/FID and GC/MS. The acute oral toxicity and the rota rod tests were executed beforehand. The nociceptive tests (acetic acid-induced writhing, formalin and hot plate) were performed with the oil at doses of 75, 150 or 300 mg.kg<sup>-1</sup>. Of the constituents identified, 95.24% were sesquiterpenes, carotol (17.68%) being the major compound. The essential oil caused no obvious signs of toxicity, nor did it affect the motor coordination of the animals. In conclusion, the animals that received the oil, especially at 300 mg.kg<sup>-1</sup>, demonstrated a lower number of writhes (1.62 versus 27.88±2.75), a decrease in paw-licking time in both phases of the formalin test, and increased latency on the hot plate when compared to the control group.

**Keywords:** sesquiterpenes; pain; inflammation.

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

\*E-mail: [enilaans@gmail.com](mailto:enilaans@gmail.com)

## 2.1 Introdução

A dor é uma experiência sensorial e emocional, essas características, a fazem difícil de ser definida com exatidão.<sup>1</sup> É um processo fisiológico e protetor, uma vez que atua como um sistema de alerta associado não somente a lesões reais como também potenciais.<sup>2</sup>

Mesmo sendo um mecanismo de defesa natural, a persistência dos processos dolorosos, comum em portadores de artrite, câncer e doenças neurodegenerativas, requer muitas vezes uma intervenção farmacológica constituída, predominantemente, por anti-inflamatórios e analgésicos de ação periférica ou central.<sup>3-5</sup>

A família Myrtaceae é uma das mais representativas, em riqueza e abundância, nas florestas tropicais e subtropicais do globo, compreendendo entre 3.100 e 4.600 espécies distribuídas em 144 gêneros,<sup>6</sup> alguns desses com relatos de ações antimicrobiana *in vitro*<sup>7-9</sup> e antioxidante,<sup>10</sup> assim como antinociceptiva e anti-inflamatória em roedores, a exemplo de *Campomanesia adamantium* Camb.,<sup>11</sup> *Marliera tomentosa* Camb.,<sup>12</sup> *Eugenia candolleana* DC.,<sup>13</sup> *Eugenia caryophyllata* Thunb<sup>14</sup> e *Syzygium cumini* L.<sup>15</sup>

O gênero *Myrcia* DC. é um dos maiores da família, com mais de 300 espécies distribuídas do México até a região sul do Brasil.<sup>16</sup> A literatura aponta alguns estudos envolvendo os efeitos antinociceptivo, em modelo animal, dos óleos essenciais obtidos das folhas de *M. pubiflora* DC.<sup>17</sup> e *M. ovata* Cambess,<sup>18</sup> entretanto, nenhum estudo foi realizado com *M. rostrata* DC. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a composição química e avaliar o potencial antinociceptivo do óleo essencial de *M. rostrata* DC. em modelo animal.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Coleta

As folhas de *Myrcia rostrata* DC. foram coletadas em janeiro de 2016 num remanescente de Floresta Ombrófila, localizado no Campus II da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), município de Alagoinhas, estado da Bahia (12° 10' 37" S e 38° 24' 35" W). Após a expedição de coleta, o material fértil foi herborizado para a confecção da exsicata, a

qual foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob o número 155.923. A identificação taxonômica foi realizada por Aline do Nascimento Silva.

### 2.2.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de *M. rostrata* (OEMr) foi obtido, em triplicata, por hidrodestilação das folhas frescas em um aparelho de Clevenger, por um período de 3 h. Em seguida, foi seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), transferido para frascos de vidro âmbar e armazenado a  $-22\text{ }^\circ\text{C}$ , até a realização da análise química e dos testes farmacológicos. O teor de óleo essencial foi determinado pela relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal livre de umidade.

### 2.2.3 Análise química

A análise da composição química foi realizada pela utilização de duas técnicas: a Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) para a quantificação dos constituintes e a Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) para a avaliação qualitativa dos óleos essenciais. Na análise por CG/DIC foi usado um Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com DIC e coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor  $220\text{ }^\circ\text{C}$  e do detector  $240\text{ }^\circ\text{C}$ , He como gás de arraste e vazão de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , programa de temperatura do forno de: 60 a  $240\text{ }^\circ\text{C}$  ( $3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), mantendo uma isoterma de  $240\text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min. Já na análise por CG/EM foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor  $220\text{ }^\circ\text{C}$ , gás de arraste He na vazão de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperatura da interface e da fonte de ionização  $240\text{ }^\circ\text{C}$ , energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60 a  $240\text{ }^\circ\text{C}$  ( $3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), mantendo uma isoterma de  $240\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 min.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats e do índice Aritmético de cada um dos picos, obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos (C8 a C24), além da comparação com dados da literatura<sup>19</sup> e com os espectros de massa da biblioteca do equipamento.

#### 2.2.4 Testes farmacológicos

##### 2.2.4.1 Animais

Em todos os experimentos, com exceção do teste de toxicidade, foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus* L., 1758), jovens 3-4 meses (25-35 g), da linhagem Swiss, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos a  $22 \pm 2$  °C, com ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso à comida e água. Duas horas antes de cada teste, foram submetidos ao jejum. Todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana e aprovados conforme protocolo número 008/2017.

##### 2.2.4.2 Avaliação da atividade motora na barra giratória (*rota rod*)

Para evitar uma interpretação equivocada dos resultados devido a uma incapacidade natural dos animais em manter o equilíbrio e a movimentação na barra giratória, 24 h antes da execução do teste foi realizada uma pré-seleção dos animais (sem a administração de substâncias) na qual foram considerados aptos a participar aqueles que permaneceram no equipamento (com velocidade de 7 r.p.m.) durante 180 s, em até três tentativas. No dia seguinte, os camundongos pré-selecionados foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=8), sendo um grupo controle (os animais receberam o veículo, ou seja, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% por via intraperitoneal), um grupo padrão (os animais

foram tratados com diazepam Hipolabor/Sanval® na dose de 4 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (os animais receberam as doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo essencial de *M. rostrata* diluído no veículo por via i.p.). Após a administração das substâncias, os camundongos foram submetidos ao teste aos 30, 60 e 120 min, para o registro do tempo de permanência na barra giratória.

#### 2.2.4.3 Teste de toxicidade oral aguda

Para a realização do teste de toxicidade oral aguda foram utilizados camundongos fêmeas,<sup>20</sup> jovens (25-30 g), nulíparas e não grávidas. Os animais foram marcados para permitir a identificação individual e separados em cinco grupos (n=6), sendo um controle (os camundongos receberam, por via oral, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, num volume de 0,1 mL/10 g de massa corporal) e quatro experimentais, nos quais foram administradas (v.o) as doses de 300, 500, 1000 ou 2000 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo essencial de *M. rostrata* solubilizados em solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, respeitando também o volume de 0,1 mL/10 g por animal.

Os animais foram observados durante as quatro primeiras horas após a administração das substâncias, seguindo alguns dos parâmetros reunidos em um protocolo padrão,<sup>21</sup> sendo, *a posteriori*, mantidos em gaiolas durante 14 dias para avaliação diária de sinais de toxicidade. A massa corporal de cada animal foi mensurada no primeiro, sétimo e décimo quarto dias, sendo a mesma comparada com os animais do grupo controle.

#### 2.2.4.4 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Esse teste se baseia no fato de que uma injeção intraperitoneal do ácido acético a 0,8% provoca uma reação nociceptiva, caracterizada por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores.<sup>22</sup> Para a realização do experimento, cinco grupos (n=8) foram formados: o controle (animais tratados com o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% via i.p.), o padrão (animais tratados com indometacina Sigma® na dose

de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (animais tratados com o óleo essencial de *M. rostrata* nas doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.). Após 30 minutos da administração das substâncias, os animais receberam uma solução de ácido acético a 0,8% (0,1 mL.10 g<sup>-1</sup>) também por via i.p, sendo *a posteriori* colocados, individualmente, em caixas de observação, para o registro do número total de contorções abdominais apresentadas durante 15 minutos, contados a partir dos 5 min iniciais após a injeção do agente alérgico.

#### 2.2.4.5 Teste da formalina

Considerado um modelo de dor associado à lesão tecidual provocada pela injeção de formalina (2,5% de formaldeído em solução salina) na pata do camundongo, esse teste segue um padrão bifásico constituído por uma fase inicial aguda (primeira fase), e um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada.<sup>23</sup> Para a realização do mesmo, cinco grupos (n=8) foram formados: o controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% via i.p.), o padrão (os animais foram tratados com indometacina Sigma® na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (os animais foram tratados com o óleo essencial de *M. rostrata* nas doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.). Decorridos 30 minutos da administração das substâncias, os animais receberam 20 µL de formalina na região subplantar da pata posterior direita, sendo imediatamente colocados em caixas individuais de observação providas de espelhos para a contagem do tempo total gasto, em segundos, em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Tal aferição foi realizada entre 0 e 5 min (fase 1) e entre os 15 e 30 min (fase 2) após a injeção do agente flogístico.

#### 2.2.4.6 Teste da placa quente (*hot plate*)

Esse método visa avaliar o tempo de permanência dos animais sobre uma placa metálica aquecida a uma temperatura de 54 ± 1 °C até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de saltar ou lambe as patas.<sup>24</sup> A fim de evitar uma interpretação equivocada

dos resultados, um dia antes do experimento, os camundongos foram pré-selecionados (sem a administração de substâncias), sendo considerados aptos, aqueles que permaneceram na placa aquecida por mais de 10 e menos de 30 s. No dia do teste, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=8), o controle (os camundongos receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, via i.p.), o padrão (foi administrada morfina Cristália® na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (os animais foram tratados com as doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo essencial de *M. rostrata*).

Em seguida, os camundongos foram colocados, individualmente, na superfície da placa aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias. O intervalo decorrido entre a colocação do animal na placa e a ocorrência de lambida das patas ou comportamento de pular foi registrado em segundos. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado para indicar analgesia completa e evitar lesão tecidual.

#### 2.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via, seguida pelo pós teste de Dunnett. Os resultados foram representados como média ± erro padrão da média e considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 2.3 Resultados e discussão

#### 2.3.1 Análise do óleo essencial

O óleo essencial de *M. rostrata* apresentou um rendimento de 0,42% (m/v), mais do que o dobro do obtido (0,2%) a partir das folhas frescas dessa mesma espécie coletadas em populações nativas do Rio Grande do Sul.<sup>25</sup> A análise da composição química revelou que do total dos constituintes químicos identificados (87,62%); 4,76% corresponderam a monoterpenos e 95,24% a sesquiterpenos. Dentre estes últimos, destacaram-se o dauceno

(4,7%), germacreno D (5,68%), E-cariofileno (6,45%) e o germacreno B (7,28%), sendo o carotol (17,68%), o composto majoritário (Tabela 1). Esta composição química difere da descrita para o óleo essencial da espécie nativa do Rio Grande do Sul, com 93,3% de sesquiterpenos, tendo  $\alpha$ -cadinol (4,6%),  $\delta$ -cadineno (5,7%) e óxido de cariofileno (13,1%) como constituintes majoritários,<sup>25</sup> assim a população oriunda da Bahia pode se tratar de um novo quimiotipo de *M. rostrata*.

**Tabela 1:** Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *Myrcia rostrata* DC.

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	Percentual relativo (%)
$\alpha$ -pineno	939	943	1,97 $\pm$ 0,31
$\beta$ -pineno	979	989	1,1 $\pm$ 0,21
$\beta$ -mirceno	990	994	0,4 $\pm$ 0,09
Limoneno	1029	1041	0,27 $\pm$ 0,04
$\alpha$ -terpineol	1188	1212	0,41 $\pm$ 0,05
$\alpha$ -cubebeno	1348	1357	0,15 $\pm$ 0,13
Isoledeno	1376	1383	0,27 $\pm$ 0,01
$\alpha$ -copaeno	1376	1387	3,02 $\pm$ 0,14
dauceno	1381	1389	4,7 $\pm$ 0,54
$\beta$ -elemeno	1389	1399	0,26 $\pm$ 0,01
$\alpha$ -cis-bergamoteno	1412	1423	0,30 $\pm$ 0,005
E-cariofileno	1419	1436	6,45 $\pm$ 1,31
$\alpha$ -trans-bergamoteno	1434	1443	4,75 $\pm$ 0,31
aromadendreno	1441	1451	0,42 $\pm$ 0,3
epi- $\alpha$ -santaleno	1447	1455	0,79 $\pm$ 0,02
$\beta$ -farneseno	1456	1459	3,72 $\pm$ 0,26
$\alpha$ -humuleno	1454	1472	0,71 $\pm$ 0,06
dauca-5,8-dieno	1472	1476	0,97 $\pm$ 0,02
amorfa-4,7(11)-diene	1481	1487	4,98 $\pm$ 0,49
germacreno D	1485	1496	5,68 $\pm$ 0,84
viridifloreno	1496	1506	3,35 $\pm$ 0,09
biciclogermacreno	1500	1512	4,73 $\pm$ 0,22
$\beta$ -bisaboleno	1505	1520	4,46 $\pm$ 0,42
$\gamma$ -cadineno	1513	1533	3,33 $\pm$ 0,31
$\beta$ -sesquifelandreno	1522	1537	3,34 $\pm$ 0,22
germacreno B	1561	1580	7,28 $\pm$ 2,65
espatulenol	1578	1598	0,36 $\pm$ 0,1
óxido de cariofileno	1583	1600	t
viridiflorol	1592	1608	1,67 $\pm$ 0,03
carotol	1594	1627	17,68 $\pm$ 1,45
<b>Total de compostos identificados</b>			<b>87,36</b>

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, t = traços.

A predominância de sesquiterpenos nos óleos essenciais de outras espécies de *Myrcia* também foi anteriormente destacada.<sup>17,26-28</sup> Do óleo essencial de *M. cuprea* coletada no Pará, por exemplo, obteve-se como constituintes majoritários  $\beta$ -cariofileno (38,1%), germacreno D (21,8%) e germacreno B (19,5%).<sup>29</sup> Num estudo comparativo com os óleos essenciais de

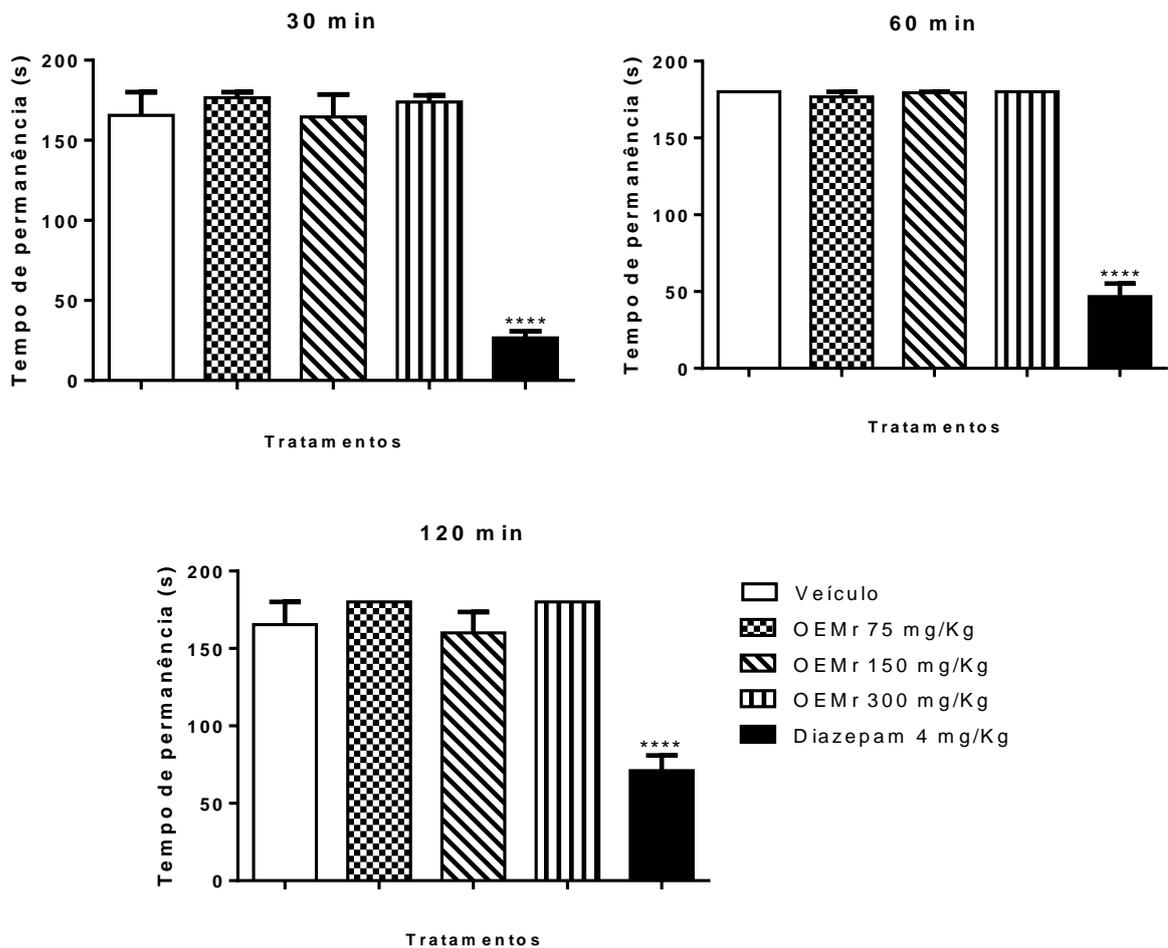
diferentes espécies de *Myrcia* foi detectada a predominância de sesquiterpenos cíclicos, principalmente os derivados das vias de ciclização do cadinano, germacrano e cariofilano.<sup>25</sup> Por outro lado, o óleo obtido das folhas de *M. ovata* Cambess apresentou os monoterpênos oxigenados como a mais abundante classe de compostos, correspondendo a 91,78% do total de identificados.<sup>18</sup>

### 2.3.2 Avaliação da coordenação motora na barra giratória (*rota rod*)

Os camundongos tratados com as doses de 75, 150, ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMr não exibiram diferença estatística significativa quanto ao tempo de permanência na barra giratória, ao serem comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo, nos três tempos avaliados (Figura 1). Levando em consideração que esse método avalia a integridade do sistema motor, permitindo a detecção de enfraquecimento neurológico, abrangendo incoordenação motora e relaxamento muscular, consequências comuns de neurotoxicidade,<sup>30,31</sup> pode-se afirmar que os constituintes químicos presentes no óleo não interferiram na capacidade motora dos animais nem provocaram ação miorelaxante. Como esperado, os murinos que receberam diazepam na dose de 4 mg.kg<sup>-1</sup> (i.p), droga conhecida por sua atividade depressora do SNC, tiveram seu tempo médio de permanência na barra giratória reduzido aos 60 e 120 min (46,75±5,81 s e 71,13±14,04 s, respectivamente) e de forma mais acentuada após 30 min da administração (26,63±13,46 s) quando comparado aos valores médios do grupo controle (T<sub>30</sub> = 165,5; T<sub>60</sub> = 180 e T<sub>120</sub> = 165,4 s).

### 2.3.3 Toxicidade oral aguda

Os resultados indicaram que mesmo para os animais que foram tratados com a dose de 2000 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMr não houve sinais de toxicidade evidente nem mortes durante os 14 dias de observação. A massa corporal dos animais no início, no sétimo dia e no final do teste, não apresentou diferença estatística significativa na análise de variância ao nível de 5% de significância, quando comparada com o grupo controle.



**Figura 1:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. na coordenação motora dos camundongos aos 30, 60 e 120 min após a administração das substâncias. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle. (ANOVA seguido de Dunnett,  $n = 8$  por grupo).

#### 2.3.4 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os dados exibidos na Figura 2 demonstram que o OEMr apresentou efeito de antinocicepção bastante significativo ( $p < 0,0001$ ), com números de contorções abdominais iguais a 6,87; 1,75 e 1,62 nos grupos tratados com as doses de 75, 150 ou 300 mg  $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente, valores bastante reduzidos quando comparados à média do grupo controle ( $27,88 \pm 2,75$ ). A indometacina, na dose de 20 mg. $\text{kg}^{-1}$  (i.p.), ocasionou uma redução também significativa ( $p < 0,0001$ ) e semelhante à maior dose do óleo essencial, com valor médio de  $1,60 \pm 2,75$  contorções. A análise de variância também revelou que não houve diferença

estatística entre os tratamentos entre si, tampouco entre os tratamentos e a indometacina, num intervalo de confiança de 95%.



**Figura 2:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido de Dunnett).

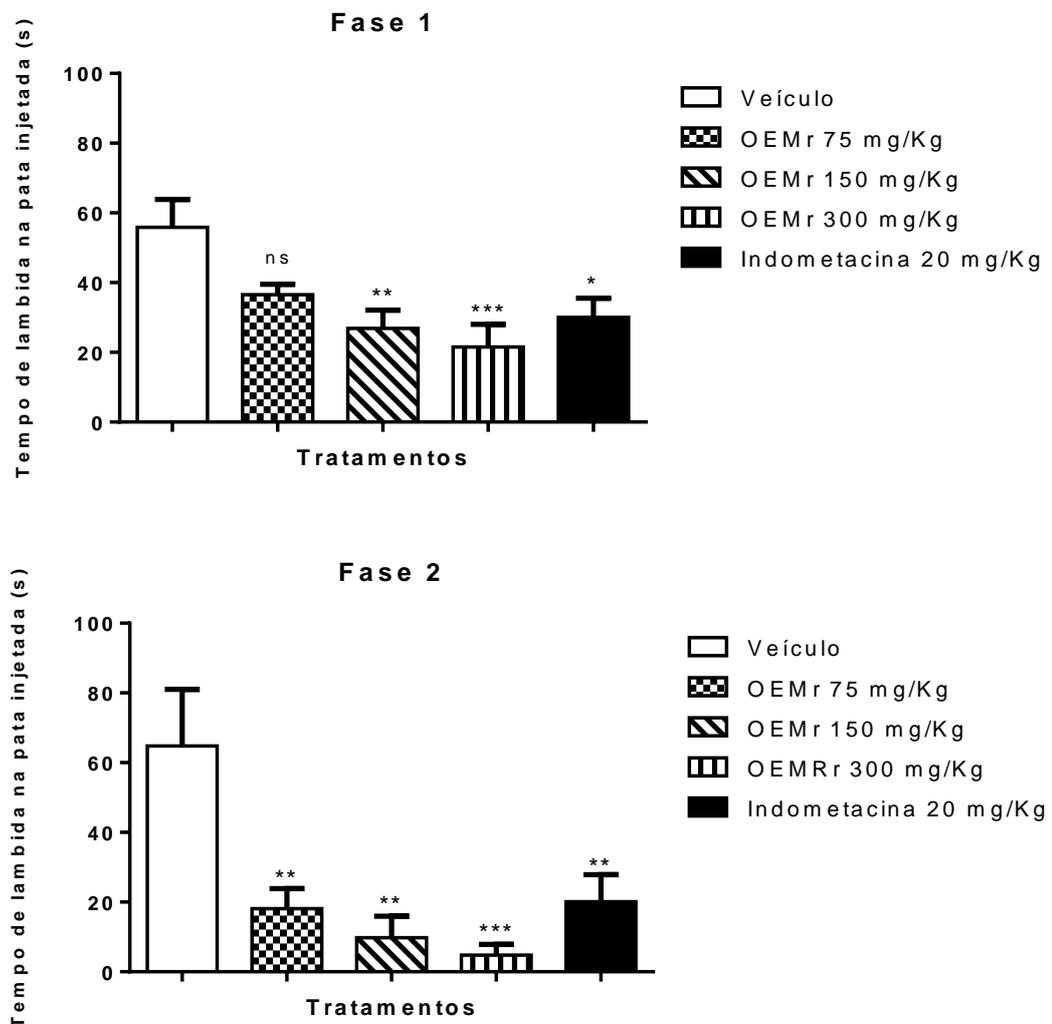
A literatura descreve que a dor inflamatória está intimamente relacionada à ativação de nociceptores polimodais sensíveis tanto à prótons (a exemplo dos canais iônicos sensíveis à ácido, conhecidos pela sigla em inglês ASICs), quanto à bradicinina, prostaglandina e citocinas.<sup>32,33</sup> Sabe-se que tal estimulação segue pela via aferente (mediada por fibras tipo C) até os impulsos atingirem o SNC.<sup>18</sup>

Alguns autores consideram a resposta nociceptiva mediada pelo ácido acético como inespecífica e de baixa seletividade, ademais tanto drogas de ação central quanto periférica podem atuar inibindo o número de contorções, assim como anti-histamínicos e anti-colinérgicos,<sup>34,35</sup> o que de certa forma dificulta eleger determinada substância como analgésica sem que testes com modelos mais específicos, a exemplo do teste da formalina, sejam realizados.

Além disso, seria pretensioso atribuir a proeminente ação do OEmr na redução do número de contorções abdominais à inibição de substâncias endógenas que atuam no estímulo de fibras nervosas associadas à nocicepção, ao bloqueio dos nociceptores ASICs ou à via dos prostanoídes pela inibição da COX (mecanismo pelo qual a indometacina atua), sem que testes mais específicos fossem realizados.

### 2.3.5 Teste da formalina

O OEMr nas doses de 150 e 300 mg.kg<sup>-1</sup> reduziu de forma significativa o tempo de lambidas e mordidas na pata dos animais, na fase 1 (neurogênica), com valores de 26,88 e 21,5±8,3 s, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (55,88 s). Na fase 2 (inflamatória), as três doses foram capazes de inibir o tempo total gasto em lambidas com valores de 18,13; 9,75 e 4,75±12,75 s, respectivamente (Figura 3), quando comparadas aos animais do grupo controle (64,75 s).



**Figura 3:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. no teste da formalina. Resultados expressos como média ± e.p.m. ns = não significativo; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. (ANOVA seguido de Dunnett).

Vale ressaltar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com o óleo e o grupo tratado com a indometacina na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup> (tempo de lambida de 20,13 s). A inibição no tempo de lambida, na fase neurogênica, evidenciada nos grupos que receberam as doses de 150 e 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMr corrobora os resultados obtidos no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. É provável que a ação do óleo esteja relacionada à inibição química direta de fibras aferentes nociceptivas, que podem ser suprimidas por analgésicos opioides como a morfina,<sup>36</sup> isso pode ser comprovado mediante a realização de experimentos com modelos que utilizem antagonistas de receptores  $\mu$ -opioides como a naloxona.

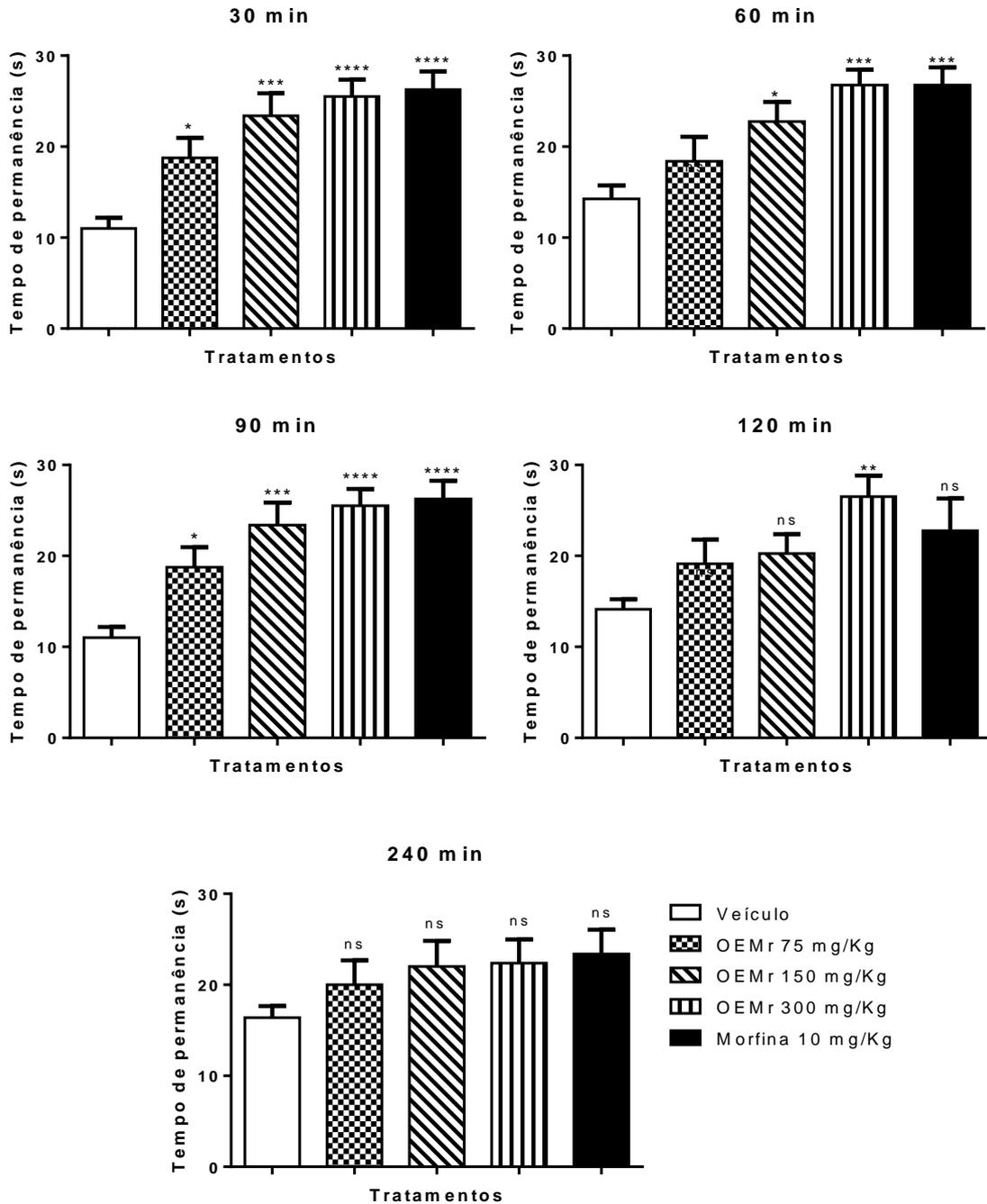
A segunda fase do teste da formalina está relacionada à liberação de mediadores da inflamação, e dessa forma, a maioria dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), a exemplo do ácido acetilsalicílico, da indometacina e do naproxeno atua minimizando o tempo de lambida e/ou mordidas.<sup>32,37</sup> Vale ressaltar que na fase inflamatória, o óleo essencial de *M. rostrata* exibiu resultados significativos nas três doses, com destaque para a de 300 mg.kg<sup>-1</sup>, que reduziu em 13,63 vezes o tempo de lambida da pata quando comparado ao grupo controle. Em síntese, o teste da formalina reproduz um modelo mais válido de dor clínica quando comparado aos que levam em conta estímulos térmicos por exemplo,<sup>38</sup> especialmente, por seguir um padrão bifásico.<sup>23</sup> Partindo dessa premissa, sua utilização pode auxiliar na detecção de drogas com ações tanto analgésicas, sejam estas de ação periférica ou central, quanto anti-inflamatórias.

### 2.3.6 Teste da placa quente (*Hot plate*)

Os resultados obtidos demonstraram que o OEMr, após 30 min da sua administração (Figura 4), promoveu um aumento da latência em resposta ao estímulo térmico, quando comparado ao grupo controle (T<sub>30</sub>: 11 s) com destaque para as doses de 150 e 300 mg.kg<sup>-1</sup> (T<sub>30</sub>: 75 mg.kg<sup>-1</sup> 18,75; 150 mg.kg<sup>-1</sup> 23,38 e 300 mg.kg<sup>-1</sup>; 25,5±2,8 s).

Aos 60 min, o mesmo efeito foi mantido em relação ao controle (T<sub>60</sub>: 14,25 s), com tempos de latência de (T<sub>60</sub>: 75 mg.kg<sup>-1</sup>, 18,38; 150 mg.kg<sup>-1</sup>, 22,75 e 300 mg.kg<sup>-1</sup>, 26,75±2,19 s). Aos 90 min, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos e a morfina e aos 120 min o aumento da latência persistiu em relação ao controle (T<sub>120</sub>: 14,1 s) para a dose

de  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $T_{120}$ :  $26,5 \pm 3,5 \text{ s}$ ), sendo inclusive superior ( $p < 0,01$ ) ao da morfina na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $T_{120}$ :  $22,75 \pm 3,5 \text{ s}$ ). Os animais que receberam a dose de  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  tiveram um aumento na latência aos 30 min duas vezes maior do que os do grupo controle.



**Figura 4:** Efeito do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. no teste da placa quente avaliado aos 30, 60, 90, 120 e 240 min após a administração das substâncias. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. ns = não significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett).

Aos 120 min, não se observou diferença estatística significativa entre os animais tratados com a morfina e os que receberam apenas o veículo, entretanto, o grupo tratado com a maior dose do óleo essencial apresentou uma resposta 1,87 vezes maior do que o controle. Aos 240 min, nenhum dos tratamentos apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, o que provavelmente está relacionado ao *clearance* das substâncias, inclusive da morfina.

Outros óleos de *Myrcia* foram avaliados nesse modelo, a exemplo do óleo essencial de *M. publiflora*, constituído majoritariamente por óxido de cariofileno (22,2%), mustacona (11,3%), 1,8-cineol (5,4%) e triciclono (5,3%), o qual foi ineficaz na inibição do tempo de reação dos animais ao estímulo térmico nas doses de 25, 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup>.<sup>17</sup>

Sabe-se que as fibras C e A $\delta$  tipo II são estimuladas após a ativação de receptores vaniloides, especialmente os do tipo TRPV-1 quando submetidos a temperaturas entre 45 e 53 °C.<sup>39,40</sup> Levando em consideração que os animais são expostos à superfície do equipamento aquecida aos 54 $\pm$ 1 °C, poder-se-ia conjecturar que a ação do OEMr, principalmente na dose de 300 mg.kg<sup>-1</sup>, ao aumentar o tempo de permanência dos animais sobre a placa ocorre pelo bloqueio dos receptores térmicos ou pela inibição do estímulo nervoso aferente. Diante de resultados tão expressivos, é notória a necessidade de posterior investigação do mecanismo de ação (se central ou periférico) do referido óleo essencial, seja pela utilização de antagonistas de receptores  $\mu$ -opioides como a naloxona, ou por intermédio de agonistas dos receptores vaniloides como o cinamaldeído ou o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tendo em vista que estudos pré-clínicos com roedores demonstraram que antagonistas de receptores catiônicos não seletivos de potencial transitório agem inibindo tanto a nocicepção como o processo inflamatório.<sup>41</sup>

## 2.4 Conclusão

A análise química do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. revelou uma predominância de sesquiterpenos, com carotol, germacreno D e B, (*E*)-cariofileno e dauceno como constituintes majoritários, indicando se tratar de um novo quimiotipo. O OEMr não demonstrou sinais de toxicidade de acordo com o preconizado pela OECD, nem ação depressora no SNC, uma vez que não houve redução na coordenação motora dos animais

frente aos critérios do teste *rota rod*. Os resultados obtidos nos testes farmacológicos evidenciaram a significativa propriedade antinociceptiva dos constituintes químicos presentes no óleo com a necessidade de realização de experimentos que avaliem seu mecanismo de ação.

## REFERÊNCIAS

1. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G.; *Rang & Dale Farmacologia*, 8<sup>a</sup> ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.
2. Fornasari, D.; Coaccioli, S.; *Reumatismo* **2014**, 66, 14.
3. Rao, Y. K.; Fang, S. H.; Tzeng, Y. M.; *Phytother. Res.* **2008**, 22, 957.
4. Dinarello, C. A.; *Cell.* **2010**, 140, 935.
5. Ekor, M.; *Front. Pharmacol* **2014**, 14, 1.
6. Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellog, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J.; *Plant systematics: a phylogenetic approach*, 3<sup>rd</sup> ed., Sinauer Associates: Sunderland, 1999.
7. Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Coelho, R. G.; Coutinho, I. D.; Honda, N. K.; Cardoso, C. A. L.; Vilegas, W.; Leite, S. R. de A.; Sato, D. N.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1222.
8. Silva, C. J.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Montanari, R. M.; Pinheiro, A. L.; Dias, I.; Andrade, N. J.; *Quim. Nova* **2010**, 33, 104.
9. Silva, A. do N.; Uetanabaro, A. P. T; Lucchese, A. M.; *Nat. Prod. Commun.* **2013**, 8, 269.
10. de Carvalho Júnior, A. R.; Gomes, G. A.; Ferreira, R. O.; de Carvalho, M. G.; *Quim. Nova* **2014**, 37, 477.
11. Vendruscolo, G. S.; Rates, S. M. K.; Mentz, L. A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 361.
12. Messias, K. L. S.; Campos-Buzzi, F. de; Fischer, L. G. O.; Malheiros, A.; Monache, F. D.; Filho, V. C.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 1747.
13. Guimarães, A. G.; Melo, M. S.; Bonfim, R. R.; Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; Ribeiro, A. de S.; Sobral, M.; Thomazzi, S. M.; Quintans-Júnior, L. J.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19, 883.
14. Daniel, A. N.; Sartoretto, S. M.; Schmidt, G.; Caparroz-Assef, S. M.; Bersani-Amado, C. A.; Cuman, R. K. N.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19, 212.

15. Lima, L. A.; Siani, A. C.; Brito, F. A.; Sampaio, A. L. F.; Henriques, M das G. M O.; Riehl, C. A. da S.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 860.
16. Sobral, M.; *A Família Myrtaceae no Rio Grande do Sul*, Unisinos: São Leopoldo, 2003.
17. Andrade, G. S.; Santana, M. T.; Siqueira, R. S.; Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; Ribeiro, A. de S.; Sobral, M.; Almeida, J. R. G. S; Quintans-Júnior, L. J.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, 22, 181.
18. dos Santos, G. C. M.; Gomes, G. A.; Gonçalves, G. M.; de Sousa, L. M; Santiago, G. M. P.; de Carvalho, M. G.; Marinho, B. G.; *Planta Med.* **2014**, 80, 1588.
19. Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.
20. Organization for Economic Co-Operation and Development, *Guidelines for Testing of Chemicals*, OECD 423, Acute oral Toxicity, OECD: Paris, 2001.
21. Almeida, R. N.; *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*, 1<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.
22. Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. J.; *Fed. Proc.* **1959**, 18, 412.
23. Dubuisson, D.; Dennis, S. G.; *Pain* **1977**, 4, 161.
24. Woolfe, G.; MacDonald, A. D.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, 80, 300.
25. Limberger, R. P.; Sobral, M.; Henriques, M. E. G.; Menut, A. T.; Jean-Marie, C. B.; *Quim. Nova.* **2004**, 27, 916.
26. Cerqueira, M. D. de; Marques, E. de J.; Martins, D.; Roque, N. F.; Cruz, F. G.; Silva, M. L.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1544.
27. Nakamura, M. J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, 38, 1170.
28. Sá, F. A. S.; Borges, L. L; Paula, J. A. M.; Sampaio, B. L.; Ferri, P. H.; Paula, J. R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, 22, 1233.
29. Zoghbi, M. das G. B.; Andrade, E. H. A.; Silva, M. H. L.; Carreira, L. M. M.; Maia, J. G. S.; *Flavour Fragrance J.* **2003**, 18, 421.
30. Mattei R.; Franca, C. I. F. Em *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*; de Almeida, R. N., eds.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006, cap. 12
31. Pultrini, A. M.; Galindo, L. A.; Costa, M.; *Life Sci.* **2006**, 78, 1720.
32. Tjolsen, A.; Berge, O. G.; Hunskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K.; *Pain* **1992**, 51, 5.
33. Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H.; Oh-ishi, S.; *Life Sci.* **2001**, 89, 2911.

34. Quintão, N. L. M.; Campos, M. M.; Calixto, J. B. Em *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental*; Carlini, E. A., Mendes, F. R., eds.; Fap-Unifesp: São Paulo, 2011, cap. 7.
35. Hayes, A. G.; Sheehan, M. J.; Tyers, T. B.; *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 91, 823.
36. do Amaral, J. F.; Silva, M. I. G.; de Aquino Neto, M. R.; Teixeira Neto, P. F.; Moura, B. A.; de Melo, C. T. V.; de Araújo, F. L. O.; de Sousa, D. P.; de Vasconcelos, P. F.; de Vasconcelos, S. M. M.; de Sousa, F. C. F.; *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 1217.
37. Dai, Y.; Ye, W. C.; Wang, Z. T.; Matsuda, H.; Kubo, M.; But, P. P. H.; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 81, 245.
38. Hunskaar, S.; Hole, K.; *Pain* **1987**, 30, 103.
39. Julius, D.; Basbaum, A. L.; *Nature* **2001**, 413, 203.
40. Almeida, F. R. C.; Oliveira, F. S. Em *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*; Almeida, R. N., eds.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006, cap. 17.
41. Andrade, E. L.; Meotti, F. C.; Calixto, J. B.; *Pharmacol. Ther.* **2012**, 133, 189.

### CAPÍTULO 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (MYRTACEAE)

Aline do Nascimento Silva<sup>1\*</sup>, Horácio Freitas Bomfim<sup>2</sup>, Acsa Oliveira Magalhães<sup>1</sup>, Marilene Lopes da Rocha<sup>1</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

(CHEMICAL COMPOSITION AND ANTINOCICEPTIVE POTENTIAL OF ESSENTIAL OIL OF *Myrcia splendens* (Sw.) DC. MYRTACEAE). Although the genus *Myrcia* contains more than 700 species, few have been studied for their antinociceptive potential. The present study analyzed the chemical composition and action of essential oils of *M. splendens* (Sw.) DC. in mouse nociception models. The oil was obtained, in triplicate, by hydrodistillation and exhibited a yield of 0.43% (V/m). Chemical analysis by Gas Chromatography/Flame Ionization Detection (GC/FID) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) revealed the predominance of sesquiterpenes, with (2E, 6E) methyl farnesoate as primary ingredient (42.64%). In the acetic acid-induced writhing test, the oil produced a significant antinociceptive effect when compared to control animals (52.13±2.87), with writhing values of 21.63; 5 and 0 for doses of 75, 150 and 300 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectively. In the formalin test, doses of 150 and 300 mg.Kg<sup>-1</sup> shortened paw licking time in phase 1 (neurogenic), with values of 55 and 16 s, when compared with the control group (82±11 s), while in phase 2 (inflammatory), all three doses were effective. In the hot plate test, only the highest oil dose increased latency 30, 60 and 90 min after the substances were administered, with results similar to those obtained by morphine. It is important to underscore that essential oil did not affect the motor coordination of the animals or provoke evident signs of toxicity even when tested at a dose of 2000 mg.Kg<sup>-1</sup>. The results demonstrated the significant antinociceptive activity of the chemical components present in the oil and the need for experiments that investigate their mechanism of action.

**Keywords:** sesquiterpenes; pain; inflammation.

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

\*E-mail: [enilaans@gmail.com](mailto:enilaans@gmail.com)

### 3.1 Introdução

*Myrcia* s.l. possui mais de 700 espécies (WCSP, 2019), configurando-o, no Brasil, como o gênero arbóreo mais rico nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (LUCAS et al., 2011) e destacando-se pela diversidade e produção de óleos essenciais (LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004). Estudos moleculares realizados nos últimos anos suscitaram a inserção dos gêneros tradicionais *Myrcia* De Candolle., *Marlierea* Cambessèdes, *Gomidesia* O. Berg e *Calyptranthes* Swartz sob *Myrcia* sl. (LUCAS et al., 2011; LUCAS et al., 2016; LUCAS et al., 2018), por consequência, muitas de suas espécies foram sinonimizadas (LIMA et al., 2017) incluindo a sinonimização de *Myrcia alagoensis* O. Berg como *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (SOBRAL et al., 2015).

Os óleos essenciais são um produto do metabolismo secundário vegetal e se destacam pela elevada quimiodiversidade, pois sua composição pode, por exemplo, variar tanto entre diferentes espécies, quanto entre estruturas anatômicas de um mesmo indivíduo (SCALVENZI et al., 2017). Tal profusão química é atribuída também à regiões com elevada biodiversidade, visto que áreas mais biodiversas impulsionariam a plasticidade das plantas devido a um maior número de interações, sejam estas sazonais, ambientais e/ou ecológicas, o que, por consequência, seria refletido na produção de metabólitos secundários (GUERRINI et al., 2014; SCALVENZI et al., 2017).

Nesse sentido, as circunstâncias supracitadas, propiciam aos óleos essenciais uma ampla gama de atividades farmacológicas, com diversos mecanismos de ação (SÁ et al., 2017), abrangendo as atividades analgésica (DE SOUSA et al., 2011; SARMENTO-NETO et al., 2015) e anti-inflamatória (SÁ et al., 2013; SÁ et al., 2014; SÁ et al., 2015).

*M. splendens* distribui-se do leste do México às florestas costeiras do Brasil (SCALVENZI et al., 2017). O potencial antioxidante do extrato de suas folhas foi determinado por Pontes et al. (2018), entretanto, mais especificamente a respeito dos seus óleos essenciais, a literatura descreve estudos que relatam a composição química e/ou a atividade antimicrobiana *in vitro* (NAKAMURA et al., 2010; JIMÉNEZ, et al., 2012; COLE; HABER; SETZER, 2013; SILVA; UETANABARO; LUCCHESI, 2013), a ação citotóxica e o potencial anti-câncer (SCALVENZI et al., 2017).

Destarte, levando-se em consideração que outras espécies de *Myrcia* tiveram sua ação antinociceptiva comprovada (ANDRADE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014;

SILVA et al., 2018) e que nenhum estudo envolvendo *M. splendens* (Sw.) DC ainda foi descrito, este trabalho buscou analisar a composição química e avaliar o potencial do óleo essencial da referida espécie, em modelos de nocicepção *in vivo*, a fim de prospectar compostos bioativos para o tratamento da dor.

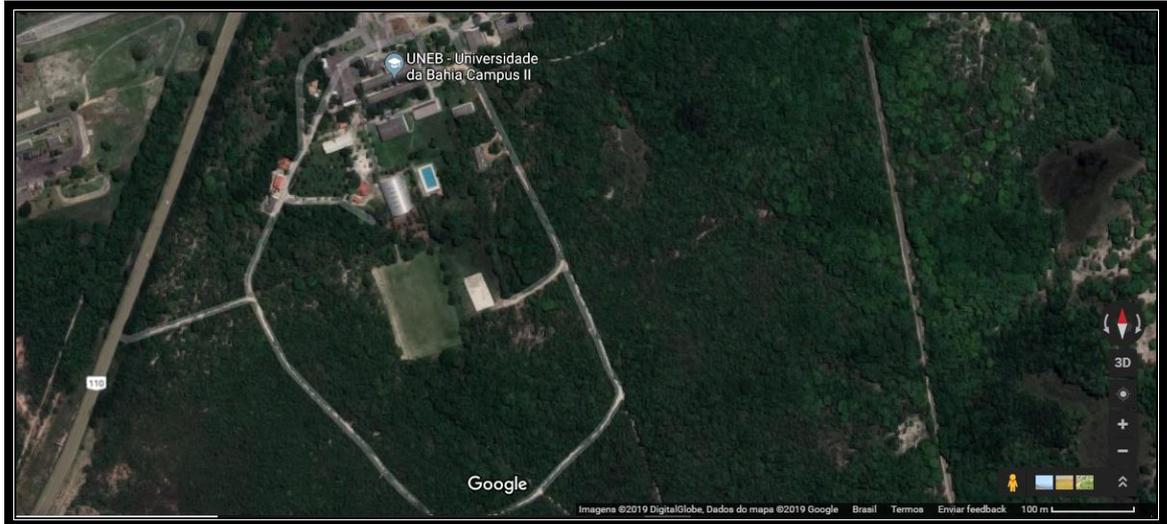
### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Coleta

As folhas de *M. splendens* (Figura 1) foram coletadas em janeiro de 2016, no período da manhã, num remanescente de Floresta Ombrófila (Figura 2), localizado no Campus II da UNEB, município de Alagoinhas – BA (12° 10' 37" S e 38° 24' 35" W). A exsicata foi depositada no HUEFS sob o número 155.925, a identificação foi realizada por Aline do Nascimento Silva e a espécie foi devidamente cadastrada no SisGen (ANEXO B).



**Figura 1:** *Myrcia splendens* (Sw.) DC. A – Folhas e botões florais, B – Inflorescência e C – Frutos imaturos.  
**Fonte:** SILVA, 2016.



**Figura 2:** Área de coleta.  
**Fonte:** GOOGLE MAPS, 2019.

### 3.2.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de *M. splendens* (OEMs) foi obtido, em triplicata, por hidrodestilação das folhas frescas, num período de 3 h contadas a partir do refluxo, utilizando um aparelho de Clevenger. Em seguida, foi seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), transferido para frascos de vidro âmbar e armazenado a  $-22\text{ }^\circ\text{C}$ , até a realização da análise química e dos testes farmacológicos. O rendimento foi determinado pela relação entre o volume de óleo extraído e a biomassa vegetal livre de umidade, conforme a Equação 1. Para a obtenção da umidade presente nas folhas, aproximadamente 1 g do material vegetal fresco foi pesado e submetido a um Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®.

$$To = \frac{Vo}{Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100}\right)} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

To = Teor de óleo essencial (%)

Vo = Volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador.

Bm = Biomassa vegetal (g)

U = Teor de umidade presente na biomassa vegetal (%)

**Equação 1:** Cálculo do rendimento do óleo essencial.

### 3.2.3 Análise química

A análise da composição química foi realizada pela utilização de duas técnicas: a Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) para a quantificação dos constituintes e a Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) para a avaliação qualitativa dos óleos essenciais.

Na análise por CG/DIC foi usado um Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com DIC e coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220 °C e do detector 240 °C, He como gás de arraste e vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, programa de temperatura do forno de: 60 a 240 °C (3 °C.min<sup>-1</sup>), mantendo uma isoterma de 240 °C durante 20 min.

Já na análise por CG/EM foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220 °C, gás de arraste He na vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura da interface e da fonte de ionização 240 °C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60 a 240 °C (3 °C.min<sup>-1</sup>), mantendo uma isoterma de 240 °C por 20 min.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice Aritmético (Equação 2) de cada um dos picos, obtido pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>), além da comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011) e com os espectros de massa da biblioteca do equipamento.

$$IA = 100N + \left[ 100 \left( \frac{TR(A) - TR(N)}{TR(N + 1) - TR(N)} \right) \right] \quad (2)$$

Onde:

IA = Índice Aritmético

N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano (C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>)

TR(A) = tempo de retenção do pico calculado

TR(N) = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

TR(N + 1) = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado

**Equação 2:** Equação de Van Den Dool e Kratz para o cálculo do Índice Aritmético.

### 3.2.4 Testes farmacológicos

#### 3.2.4.1 Animais

Em todos os experimentos, com exceção do teste de toxicidade oral aguda, foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus* L., 1758), jovens 3-4 meses (25-35 g), da linhagem *Swiss*, obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (32 x 20 x 13 cm), providas de grade aramada em aço inoxidável, comedouro, encaixe para o bebedouro e cama de maravalha. As caixas contendo os animais foram dispostas em estantes numa sala climatizada (Figura 3), com temperatura de  $22 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar em  $50 \pm 10\%$ , ciclo claro/escuro de 12 h (controlado por temporizador digital), com período claro das 6:00 às 18:00 h e livre acesso à ração do tipo peletizada e água.



**Figura 3:** Disposição das caixas em sala climatizada com os animais de experimentação.

**Fonte:** SILVA, 2019.

Duas horas antes de cada teste, foram transferidos para a sala de experimentação a fim de minimizar o estresse e possíveis alterações comportamentais decorrentes da mudança de

ambiente. Uma hora antes dos experimentos, foram privados da ração, porém a água foi ofertada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana e aprovados conforme protocolo número 008/2017 (ANEXO A).

#### 3.2.4.2 Drogas

Foram utilizados Diazepam (Hipolabor/Sanval®) na dose de 4 mg/Kg, Indometacina (Sigma®) na dose 20 mg/Kg, Sulfato de morfina (Cristália®) na dose de 10 mg/Kg, Ácido acético a 0,8% e Formalina (2,5% de formaldeído em solução salina 0,9%).

#### 3.2.4.3 Avaliação da atividade motora na barra giratória (*Rota rod*)

Esse teste teve como objetivo verificar a interferência do óleo essencial na coordenação motora dos animais. Para tanto, foi utilizado um aparelho de *Rota rod* (Modelo EFF 411/Insight® – Brasil), o qual consiste em uma barra giratória não escorregadia, dividida em quatro segmentos iguais com 5 cm de diâmetro cada (Figura 4A). 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 evitar uma interpretação equivocada dos resultados devido a uma incapacidade natural dos animais em manter o equilíbrio e a movimentação na barra giratória, 24 h antes da execução do teste foi realizada uma pré-seleção dos animais (sem a administração de substâncias) na qual foram considerados aptos a participar aqueles que permaneceram no equipamento (com velocidade de 7 r.p.m.) durante 180 s, em até três tentativas.

No dia seguinte, os camundongos pré-selecionados foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=8), sendo um grupo controle (os animais receberam o veículo, ou seja, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% por via i.p.), um grupo padrão (os animais foram tratados com Diazepam Hipolabor/Sanval® na dose de 4 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e

três grupos experimentais (os animais receberam as doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs diluído no veículo por via i.p.). Após a administração das substâncias, os camundongos foram submetidos ao teste aos 30, 60 e 120 min, para o registro do tempo de permanência no equipamento.

#### 3.2.4.4 Teste da toxicidade oral aguda

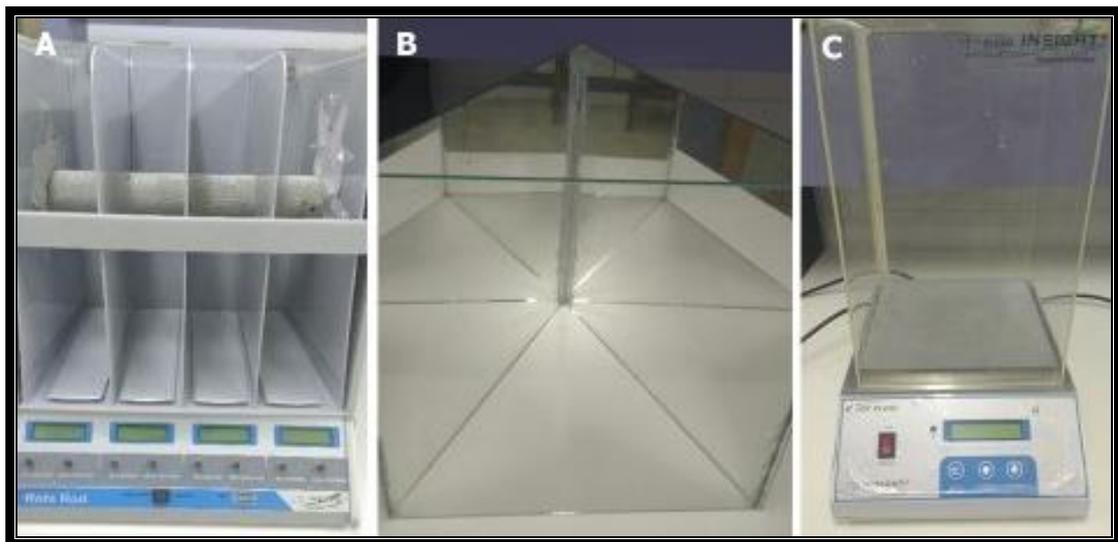
No teste de toxicidade oral aguda, realizado conforme as *Guidelines for Testing of Chemicals* da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (2008), com algumas modificações, camundongos fêmeas foram previamente marcados para permitir a identificação individual e separados em cinco grupos (n=6), sendo um controle (os animais receberam solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% (v.o.), num volume de 0,1 mL para cada 10 g de massa do animal) e quatro experimentais, nos quais foram administradas (v.o) as doses de 300, 500, 1000 ou 2000 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs solubilizadas em solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, respeitando também o volume de 0,1 mL/10 g.

Os animais foram observados durante as quatro primeiras horas após a administração das substâncias, seguindo alguns dos parâmetros reunidos (ANEXO C) em um protocolo padrão (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006), em seguida, foram mantidos em gaiolas (32 x 20 x 13 cm), com livre acesso à ração e água, durante 14 dias para avaliação diária de sinais de toxicidade. A massa corporal de cada animal foi mensurada no primeiro, sétimo e décimo quarto dias, sendo a mesma comparada com os animais do grupo controle.

#### 3.2.4.5 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O teste consiste no fato de que uma injeção intraperitoneal do ácido acético a 0,8% provoca uma reação nociceptiva, caracterizada por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER et al., 1959). Para a realização do mesmo, cinco grupos (n=8) foram formados: o controle (animais tratados com o veículo, solução

salina a 0,9% com 100  $\mu$ L de Tween 80 a 5% via i.p.), o padrão (animais tratados com Indometacina Sigma® na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (animais tratados com o OEMs nas doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.). Após 30 min da administração das substâncias, os animais receberam uma solução de ácido acético a 0,8% (0,1 mL/10 g) também por via i.p., sendo *a posteriori* colocados, individualmente, em uma caixa de observação triangular espelhada (25 x 25 x 25 cm) (Figura 4B), para o registro do número total de contorções abdominais apresentadas durante 15 min, contados a partir dos 5 min iniciais após a injeção do agente álgico.



**Figura 4:** (A) Aparelho *Rota rod* (Insight®), (B) Modelo de caixa espelhada para a observação dos animais, (C) Aparelho *Hot plate* (Insight®).

Fonte: SILVA, 2017.

#### 3.2.4.6 Teste de nocicepção espontânea induzida pela formalina

Considerado um modelo de dor associado à lesão tecidual provocada pela injeção de formalina (2,5% de formaldeído em solução salina) na pata do camundongo, esse teste segue um padrão bifásico constituído por uma fase inicial aguda (dor neurogênica), e um período mais prolongado (dor inflamatória) de atividade comportamental aumentada (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Para a realização do mesmo, cinco grupos (n=8) foram formados: o controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100  $\mu$ L de Tween 80 a 5% via i.p.), o padrão (os animais foram tratados com Indometacina Sigma® na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup>,

via i.p.) e três grupos experimentais (os animais foram tratados com OEMs nas doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.). Decorridos 30 min da administração das substâncias, os animais receberam 20 µL de formalina na região subplantar da pata posterior direita, sendo imediatamente colocados em uma caixa de observação provida de espelhos (Figura 4B) para a cronometragem do tempo total gasto, em segundos, que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Tal aferição foi realizada entre 0 e 5 min (fase 1) e entre os 15 e 30 min (fase 2) após a injeção do agente flogístico.

#### 3.2.4.7 Teste da placa quente (*Hot plate*)

Esse teste visa avaliar o tempo de permanência dos animais sobre uma placa metálica aquecida (Figura 4C) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de saltar ou lambe as patas posteriores (WOOLFE; MACDONALD, 1944), ambas as reações, desde a concepção do método, são consideradas respostas supraespinhais integradas devido ao envolvimento de uma função cerebral mais elevada (EDDY; LEIMBACH, 1953; ANKIER, 1974). É usado na pesquisa básica da dor, para a validação de candidatos a fármacos com ação central, assim como em testes de eficácia dos analgésicos, por intermédio da análise da reação álgica causada pelo estímulo térmico (DZOYEM et al., 2017).

A fim de evitar uma interpretação equivocada dos resultados, um dia antes do experimento, os camundongos foram pré-selecionados (sem a administração de substâncias), sendo considerados aptos, aqueles que permaneceram na placa aquecida a uma temperatura de  $54 \pm 1$  °C por mais de 10 e menos de 30 s. No dia do teste, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=8), o controle (os camundongos receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, via i.p.), o padrão (foi administrada Morfina Cristália® na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e três grupos experimentais (os animais foram tratados com as doses de 75, 150 ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs).

Em seguida, os camundongos foram colocados, individualmente, na superfície da placa aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração das substâncias. O intervalo decorrido entre a colocação do animal na placa e a ocorrência de lambida das patas ou comportamento de pular foi registrado em segundos. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado para indicar analgesia completa e evitar lesão tecidual.

### 3.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós teste de Dunnett. Os resultados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média e considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Análise do óleo essencial

A predominância de sesquiterpenos é peculiar aos óleos essenciais provenientes de *Myrcia* spp. (STEFANELLO et al., 2010; SÁ et al., 2012; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2018), exceto para *M. myrtifolia*, *M. acuminatissima*, *M. bombycina* e *M. ovata* que apresentaram percentuais de monoterpenos mais expressivos (CERQUEIRA et al., 2009; HENRIQUES et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

No presente estudo, um rendimento de 0,43% foi obtido para o óleo essencial das folhas frescas de *M. splendens*, teor semelhante ao reportado por Nakamura et al. (2010) e quatro vezes superior ao relatado por Scalvenzi et al. (2017). A análise da composição química evidenciou a predominância de sesquiterpenos com 2*E*,6*E*-farnesoato de metila (42,64%), *E*-cariofileno (9,69%), *E*- $\beta$ -farneseno (8,9%),  $\beta$ -bisaboleno (7,99%) e 2*E*, 6*E*-farnesol (6,43%) como constituintes majoritários (Tabela 1).

Outros trabalhos descrevendo a composição química dos óleos essenciais da referida espécie, assim como de algumas de suas sinônimas foram relatados: Nakamura et al. (2010) destacaram o  $\alpha$ -bisaboleno como majoritário (79,65%); Jimenez e colaboradores (2012) descreveram a presença de  $\beta$ -cariofileno (23,8), germacreno D (25,3%), biciclogermacreno (7,1%) e óxido de cariofileno (10,5%); para o óleo extraído das folhas coletadas na Costa Rica, os componentes mais abundantes foram germacreno D (35,9%), valerianol (16,3%), *trans*-2-hexenal (9,5%), epi- $\alpha$ -cadinol (6,8%) e  $\delta$ -cadineno (5,8%) (COLE; HABER; SETZER, 2013); e para a *M. splendens* (Sw.) DC. (*syn. M. fallax*) (Rich.) DC., proveniente da

Amazônia Equatoriana, Scalvenzi e colaboradores (2017) destacaram a preponderância de *trans*-nerolidol (67,81%) e  $\alpha$ -bisabolol (17,51%).

**Tabela 1:** Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *Myrcia splendens* (Sw.) DC.

Constituinte	IA <sub>lit</sub>	IA <sub>calc</sub>	Percentual relativo
geranato de metila	1322	1332	0,25±0,1
$\alpha$ -cubebeno	1345	1354	0,04±0,08
$\alpha$ -copaeno	1374	1382	1,28±0,54
<i>E</i> -cariofileno	1417	1429	9,69±5,66
$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno	1432	1440	0,38±0,08
<i>E</i> - $\beta$ -farneseno	1454	1457	8,9±1,36
germacreno D	1484	1490	0,67±0,34
viridifloreno	1496	1499	0,41±0,14
biciclogermacreno	1500	1505	0,54±0,21
$\beta$ -bisaboleno	1505	1516	7,99±1,14
$\delta$ -cadineno	1522	1527	0,61±0,18
<i>E</i> -nerolidol	1561	1570	0,99±0,43
$\alpha$ -epoxicedreno	1574	1576	0,24±0,25
ledol	1602	1600	0,49±0,14
(2 <i>Z</i> , 6 <i>E</i> )-farnesol	1694	1702	1,2±0,08
(2 <i>Z</i> , 6 <i>Z</i> )-farnesol	1714	1723	2,76±0,42
(2 <i>E</i> , 6 <i>E</i> )-farnesol	1722	1727	6,43±1,91
(2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i> )-farnesol	1744	1751	3,67±0,69
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )- farnesoato de metila	1783	1791	42,64±7,96
ácido (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-farnesoico	1817	1826	1,67±0,35
<b>Total de compostos identificados</b>			<b>90,85</b>

Resultados expressos como média±desvio padrão. IA<sub>lit</sub> = Índice Aritmético da literatura e IA<sub>calc</sub> = Índice Aritmético calculado.

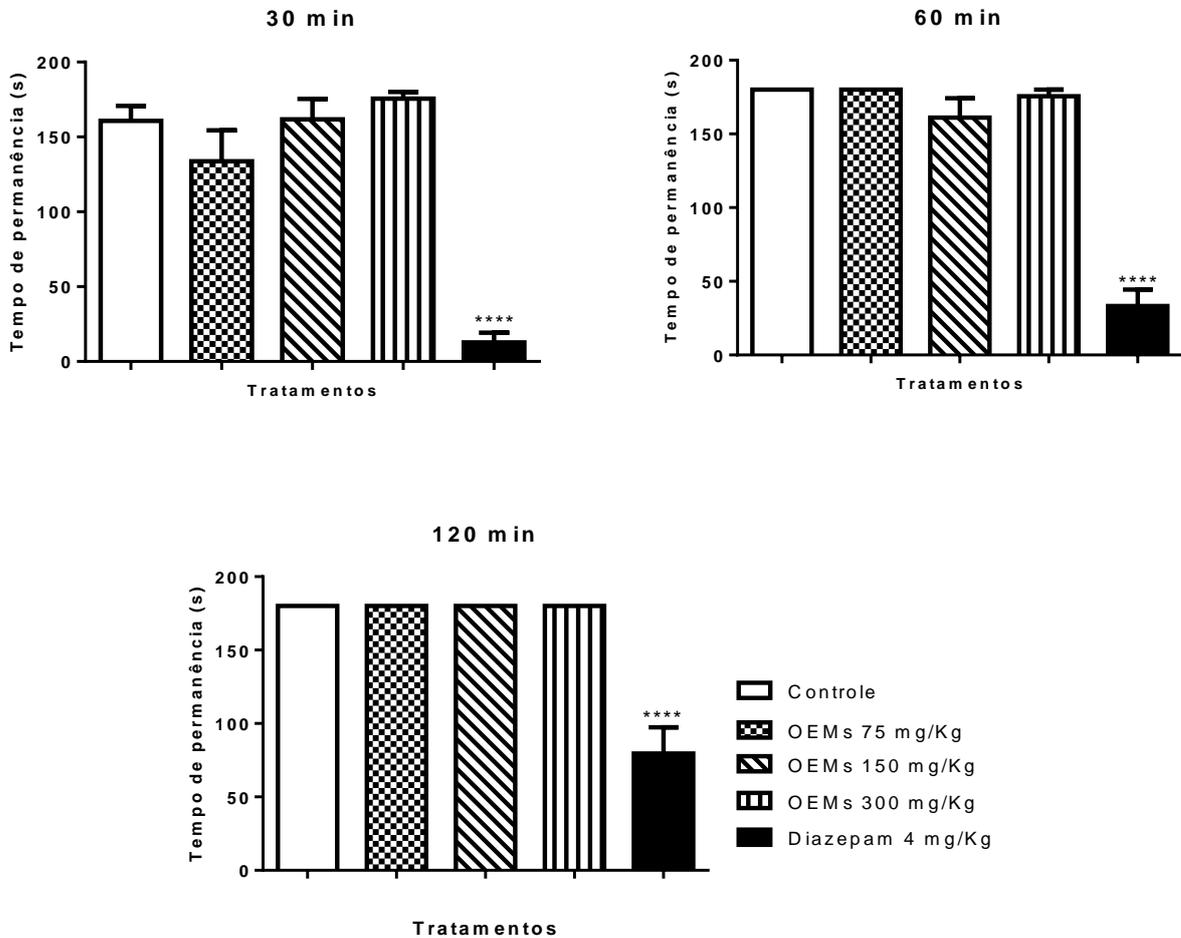
### 3.3.2 Avaliação da atividade motora na barra giratória (*Rota rod*)

O teste *rota rod* foi proposto como uma ferramenta capaz detectar danos neurológicos em roedores (DUNHAM; MIYA, 1957), desde então passou a ser tradicionalmente utilizado como um método avaliador da coordenação motora, visto que é bastante sensível para verificar disfunção cerebelar (SHIOTSUKI et al., 2010).

Os resultados obtidos revelaram que os grupos tratados com as doses de 75, 150, ou 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs não exibiram diferença estatística significativa quanto ao tempo de permanência na barra giratória, ao serem comparados com aquele em que os animais receberam apenas o veículo, nos três tempos avaliados (Figura 5).

Como esperado, os camundongos pertencentes ao grupo tratado com diazepam na dose de 4 mg.kg<sup>-1</sup> (i.p), droga conhecida por sua atividade depressora do SNC, tiveram seu

tempo médio de permanência na barra giratória reduzido de forma mais pronunciada aos 30 min ( $13 \pm 6,4$  s), mas também aos 60 min ( $33 \pm 11$  s) e 120 min ( $79,67 \pm 7,2$  s) quando comparado aos valores médios do grupo controle ( $T_{30} = 161 \pm 10$  s;  $T_{60} = 180$  s e  $T_{120} = 180$  s).



**Figura 5:** Efeito do OEMs na coordenação motora dos camundongos aos 30, 60 e 120 min após a administração das substâncias. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle. (ANOVA seguido de Dunnett,  $n = 6$  por grupo).

De acordo com Deacon (2013), o teste da atividade motora na barra giratória é útil na observação dos efeitos de substâncias no comportamento animal, por fornecer uma estimativa rápida e simples da ação deletéria na coordenação neuromuscular, pois avalia tanto a força quanto o equilíbrio do animal, especialmente na pesquisa pré-clínica.

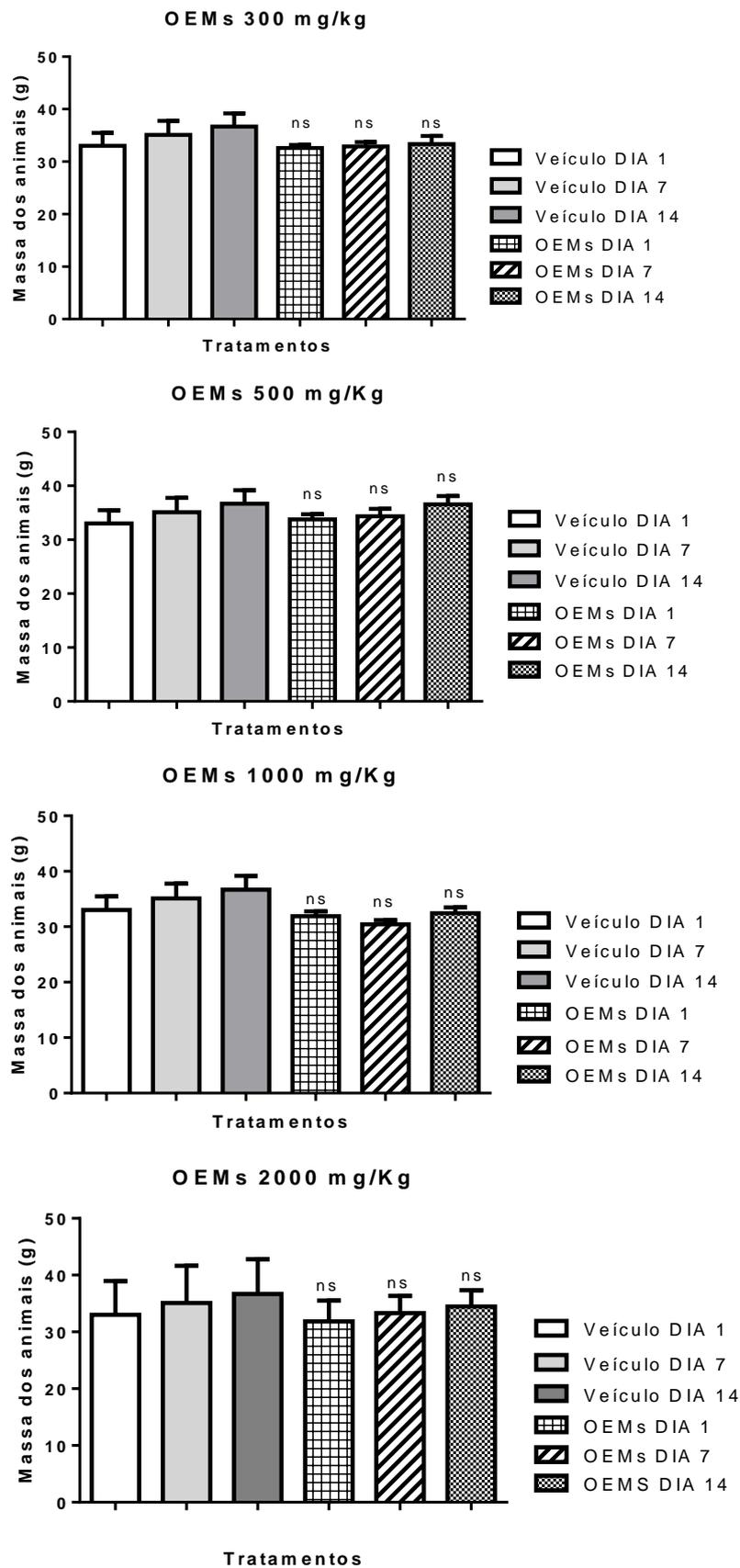
Levando em consideração que esse método permite analisar a integridade do sistema motor, favorecendo a detecção de enfraquecimento neurológico, ataxia e ação miorrelaxante,

consequências comuns de neurotoxicidade (MATTEI; FRANCA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006; DEACON, 2013), pode-se afirmar que o OEMs não interferiu na capacidade motora dos animais nem provocou relaxamento muscular nas três doses avaliadas.

### 3.3.3 Toxicidade oral aguda

Partindo do pressuposto que os óleos essenciais apresentam uma composição química complexa e diversificada, é presumível que os mesmos não sejam isentos de propriedades tóxicas, ainda que em pequenas quantidades. Há relatos, por exemplo, de hepatotoxicidade do eugenol em crianças (JAMES; PRINCE; THOMAS, 2005) e de reações alérgicas provocadas pelos óleos de canela (*Cinnamomum verum*), funcho (*Foeniculum vulgare*) e alho (*Allium sativum*), em decorrência do alto teor de cinamaldeído. Tais informações justificam a necessidade de realização de ensaios de toxicidade com óleos essenciais que exibam propriedades farmacológicas e sejam possíveis candidatos a novos fármacos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

No teste de toxicidade oral aguda, os resultados indicaram que mesmo para os animais que foram tratados com a dose de 2000 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs, não houve sinais de toxicidade evidente nem mortes durante os 14 dias de observação. A massa corporal dos animais não apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o grupo tratado com o veículo, tampouco quando as massas mensuradas no primeiro, sétimo e décimo quarto dias do teste foram confrontadas entre si (Figura 6).

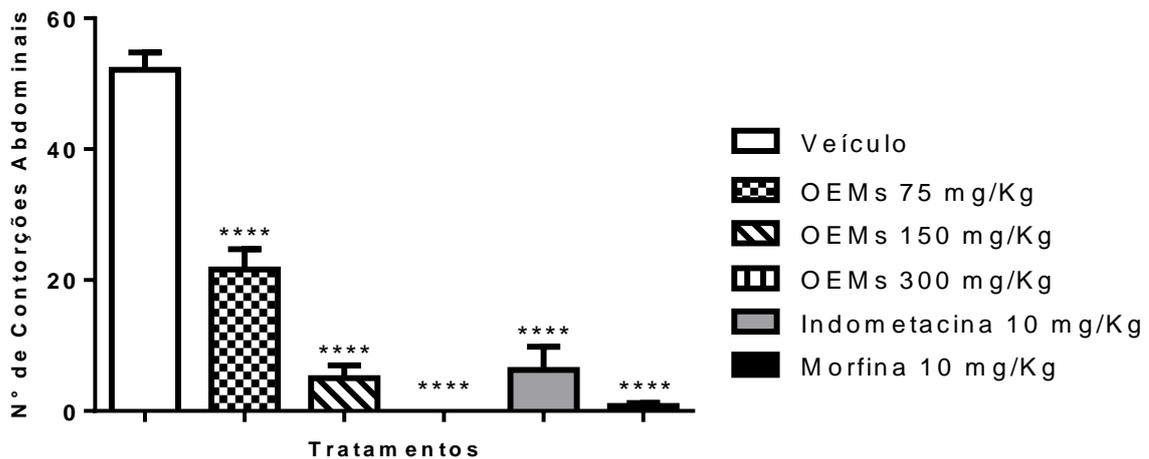


**Figura 6:** Dados do teste de toxicidade oral aguda para o OEMs. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ns = não significativo (ANOVA seguido de Dunnett, n=6 por grupo).

### 3.3.4 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O ácido acético tem a capacidade de elicitar a dor mediante a liberação de substâncias endógenas a exemplo da serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas e substância P (IKEDA et al., 2001), as quais estimulam as terminações nervosas e os receptores peritoneais (colinérgicos e histamínicos), produzindo, como resposta comportamental nos animais, contorções abdominais (*writhing*) e extensão dos membros posteriores (HUSSAIN et al., 2015).

Os dados exibidos na Figura 7 evidenciam que o OEMs, de forma dose dependente, apresentou um relevante efeito de antinocicepção, ao reduzir o número de contorções abdominais, com médias iguais a  $22 \pm 3,1$ ;  $5 \pm 2$  e  $0$ , para as doses de 75, 150 e 300  $\text{mg.Kg}^{-1}$ , respectivamente. Os animais do grupo controle exibiram um valor médio de  $52 \pm 2,6$  contorções. Vale ressaltar que não houve diferença estatística significativa entre as duas maiores doses do óleo, quando estas foram comparadas à indometacina 20  $\text{mg.kg}^{-1}$  ( $6,3 \pm 3,6$  contorções) e à morfina 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  ( $0,38 \pm 0,3$  contorções).



**Figura 7:** Efeito do OEMs no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=8$  por grupo).

Para o óleo essencial de *M. pubiflora* rico em óxido de cariofileno (22,2%) e testado nas doses de 25, 50 e 100  $\text{mg.Kg}^{-1}$  a inibição no número de contorções também foi reportada, e de acordo com os autores, as duas maiores doses apresentaram efeito similar à morfina na

dose de 3 mg.Kg<sup>-1</sup> (ANDRADE, et al., 2012). Num estudo realizado com o óleo de *M. ovata*, constituído predominantemente por monoterpenos (91,8%), as doses de 200 e 300 mg.Kg<sup>-1</sup> foram capazes de reduzir em 29 e 51%, respectivamente, o número de contorções abdominais comparadas com o grupo controle (SANTOS et al., 2014). Mais recentemente, Silva e colaboradores (2018) obtiveram para o óleo essencial de *M. rostrata* DC. valores de contorções abdominais iguais a 6,87; 1,75 e 1,62 nos grupos tratados com as doses de 75, 150 e 300 mg.Kg<sup>-1</sup>, os compostos majoritários do óleo foram carotol (17,68%), germacreno B (7,2%) e *E*-cariofileno (6,45%).

Em síntese, comparando os dados descritos na literatura para outras espécies de *Myrcia* com os resultados obtidos, pode-se atestar o expressivo potencial antinociceptivo do OEMs, visto que seus constituintes promoveram uma inibição média no número de contorções abdominais de 82,69% (57,69% para a dose 75; 90,38% para a de 150 e 100% para a de 300 mg.Kg<sup>-1</sup>).

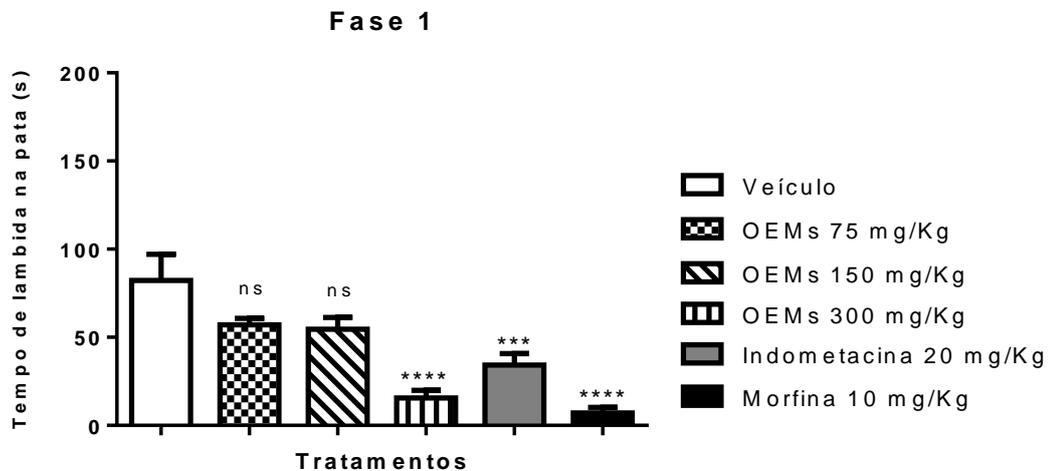
Para alguns autores a falta de seletividade inerente ao modelo das contorções abdominais (COLLIER et al., 1968; HAYES; SHEEHAN; TYERS, 1987), em parte esteja relacionada à ampla gama de mediadores envolvidos na sensação dolorosa (HUSSAIN et al., 2015), e também pela possibilidade da analgesia ser promovida por fármacos de diferentes classes terapêuticas (analgésicos de ação central ou periférica, AINE's, anti-histamínicos e anti-colinérgicos) (QUINTÃO; CAMPOS; CALIXTO, 2011).

Outros destacam que substâncias ácidas provocam dor inflamatória pelo estímulo das fibras aferentes tipo C mediante o envolvimento de receptores TRPV1 (LEFFLER; MÖNTER; KOLTZENBURG, 2006; STUCKY et al., 2009) e de bradicinina B2, assim como pela participação de neurocininas e prostanoídes o que explicaria a inibição das contorções quando a indometacina é administrada (IKEDA et al., 2001). A literatura também aponta que substâncias que atuam antagonizando os receptores vanilóides agem atenuando comportamentos de dor em modelos de inflamação em roedores (WONG; GAVVA, 2009). Assim, diante de tantas possibilidades, e sobretudo pelo fato de a dose de 300 mg.Kg<sup>-1</sup> ter propiciado a completa inibição das contorções abdominais, é notória a necessidade de uma minuciosa investigação do mecanismo de ação do OEMs.

### 3.3.5 Teste de nociceção espontânea induzida pela formalina

Caracterizado como um modelo bifásico de nociceção, esse teste se destaca quando comparado àqueles baseados na estimulação mecânica ou térmica por ser o protocolo que mais se aproxima da dor clínica (ALREJA et al., 1984). A primeira fase é iniciada imediatamente após a injeção do agente químico irritante e possui duração em torno de 5 min. Sabe-se que a sensação dolorosa dos instantes iniciais do experimento ocorre pela estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON; DENNIS, 1977), pois a formalina evoca fibras aferentes mielinizadas e amielinizadas, com predominância das fibras tipo C (TJOLSEN et al., 1992). Já segunda fase, começa aos 15–20 min depois da injeção da formalina e dura entre 20 e 40 min, com substancial envolvimento de histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina (MCNAMARA et al., 2007).

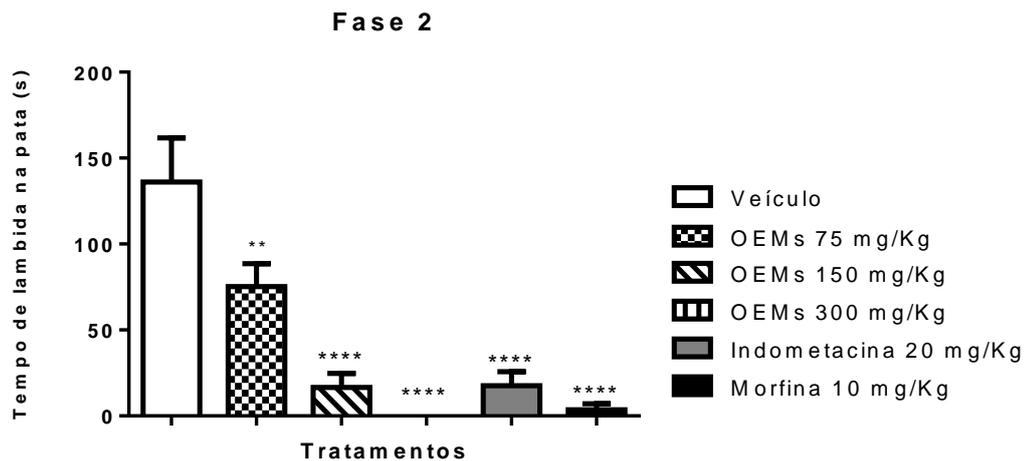
Os dados exibidos na Figura 8 evidenciam que apenas a dose de 300 mg.Kg<sup>-1</sup> do OEMs foi capaz de reduzir o tempo de lambida na fase neurogênica do teste. Comparando os resultados com o grupo controle (82±11 s), a diminuição do tempo de lambida promovida pelos constituintes do óleo foi de 80,48%, um percentual equivalente ao tempo de 16±4,3 s. Vale ressaltar que não houve diferença estatística significativa entre essa dose e os dois fármacos padrão utilizados.



**Figura 8:** Efeito do OEMs na fase 1 do teste da formalina. Resultados expressos como média ± e.p.m. ns = não significativo; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. (ANOVA seguido de Dunnett, n=8 por grupo).

Ainda a respeito dos resultados obtidos na fase 1, constatou-se que os animais dos grupos tratados com a indometacina e a morfina tiveram tempo médio de lambida de  $34 \pm 6,4$  s e  $7,1 \pm 3,1$  s, respectivamente. Isso corrobora o exposto por Barrot (2012) ao afirmar que os anti-inflamatórios não esteroidais, incluindo a indometacina, reduzem o comportamento nociceptivo na fase 2 do teste da formalina (dor inflamatória), contudo não são igualmente eficazes na primeira, e que, em contrapartida, analgésicos de ação central como a morfina são efetivos em ambas as fases.

Na fase inflamatória (Figura 9), após a comparação com os animais tratados com o veículo ( $136 \pm 26$  s), as três doses do óleo foram capazes de inibir o tempo total gasto em lambidas na pata (com médias iguais a  $75 \pm 13$  s;  $17 \pm 8,3$  s e 0 s). É importante destacar o considerável resultado exibido pelo grupo tratado com a dose de  $300 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , pois todos os animais permaneceram durante os 15 min de observação sem lambe a pata injetada pelo agente alérgico. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com as doses de  $150 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e  $300 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e aqueles tratados com a indometacina  $20 \text{ mg.Kg}^{-1}$  ( $18 \pm 8,2$  s) e a morfina  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  ( $3,5 \pm 3,5$  s).



**Figura 9:** Efeito do OEMs na fase 2 do teste da formalina. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=8$  por grupo).

Conforme já citado, é tradicionalmente descrito na literatura que a primeira fase do teste da formalina se processa mediante a estimulação dos nociceptores, sendo suscetível a anestésicos e opiáceos, enquanto a segunda fase está essencialmente condicionada à liberação de mediadores da inflamação (TJOLSEN et al., 1992) e responde a fármacos com a ação analgésica não-opioide (DUBUISSON; DENNIS, 1977), AINEs e AIEs (HUNSKAAR;

HOLE, 1987) além de antagonistas do NMDA (CODERRE; MELZACK, 1992). Há também relatos de que drogas com ação central inibem ambas as fases do teste (SHIBATA et al., 1989). Nesse sentido, levando em consideração que o OEMs se mostrou capaz de inibir a nocicepção nas duas fases, não seria sensato atribuir um mecanismo de ação tampouco afirmar que o mesmo atua de forma semelhante à indometacina ou à morfina sem que testes mais específicos fossem realizados. É possível apenas conjecturar que os óleos essenciais, de uma maneira geral, por terem uma composição química complexa podem apresentar dois ou mais dos seus constituintes atuando ao mesmo tempo em diferentes receptores, provavelmente por circunstâncias atreladas ao sinergismo (SCALVENZI et al., 2017).

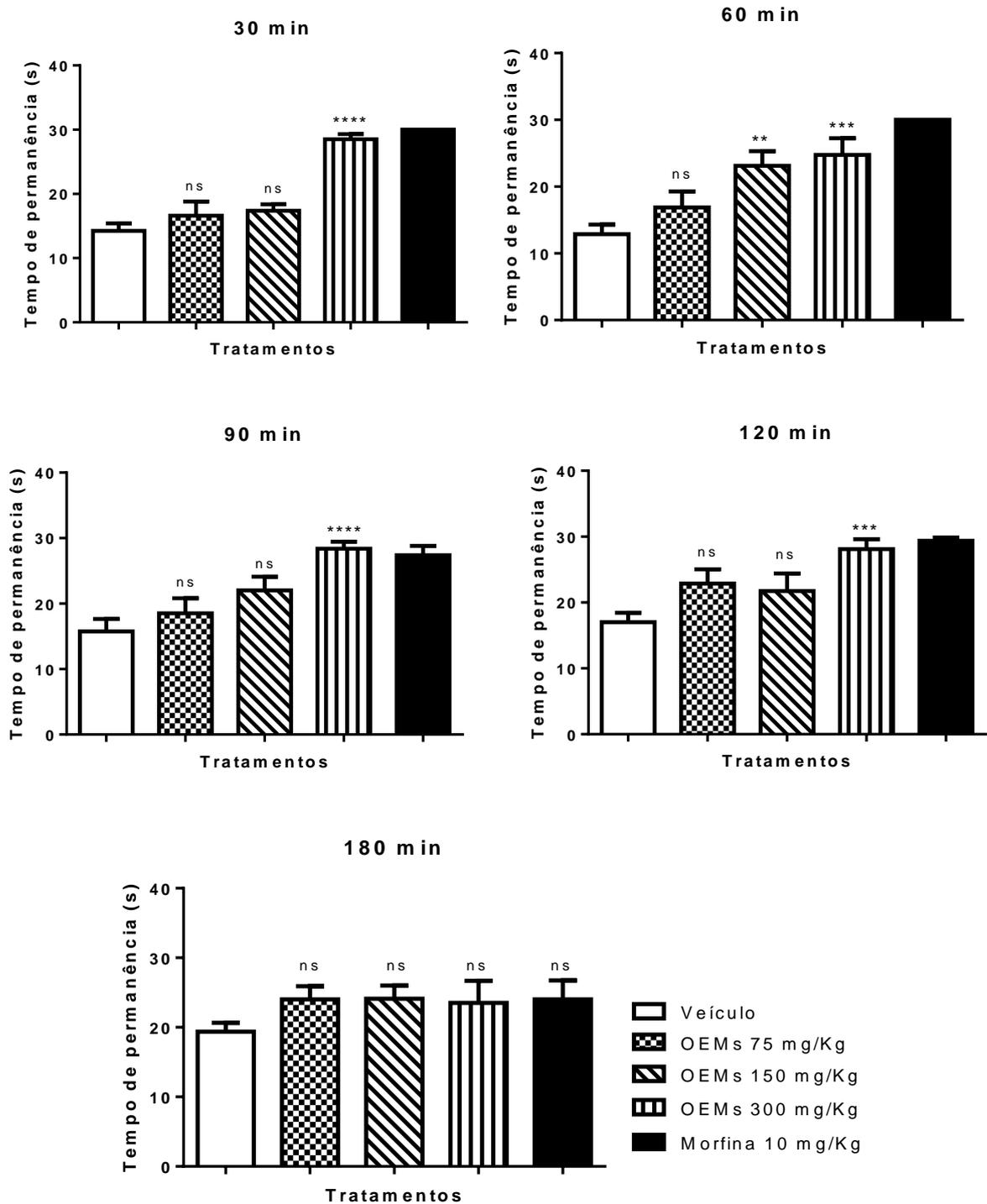
### 3.3.6 Teste da placa quente (*Hot plate*)

Os resultados reunidos na Figura 10 demonstram que apenas a dose de 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMs foi capaz de aumentar o tempo de permanência dos animais na placa quente aos 30, 60 e 90 min após a sua administração. Comparando os dados (T<sub>30</sub>: 29±0,82 s; T<sub>60</sub>: 25±2,5 s e T<sub>90</sub>: 28±1,1 s) com as médias do grupo controle (T<sub>30</sub>: 14±1,2 s; T<sub>60</sub>: 13±1,5 s e T<sub>90</sub>: 15,75±1,88 s), a referida dose do óleo praticamente duplicou o tempo de latência frente ao estímulo térmico sem apresentar diferença estatística significativa com a morfina testada na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>.

Aos 120 min, a maior dose do OEMs manteve o efeito antinociceptivo, com média do tempo de 27±2,3 s, quando comparado ao controle (14±1,1 s). É relevante mencionar que 2 h após a administração das substâncias não houve diferença estatística significativa entre os animais tratados com a droga padrão e aqueles do grupo tratado com o veículo, indicando que o tempo de meia da morfina é inferior ao dos constituintes químicos presentes no OEMs.

As respostas no teste da placa quente são supraespinhais (ANKIER, 1974) e ocorre pela estimulação das fibras C e Aδ tipo II as quais são ativadas por receptores vaniloides, especialmente os do tipo TRPV-1. Esses receptores são um tipo de canal catiônico de membrana, ativados quando submetidos a temperaturas entre 43-53 °C (JULIUS; BASBAUM, 2001). Durante o experimento, os animais foram submetidos a uma temperatura em torno dos 54±1 °C, é muito provável que os constituintes do OEMs, na dose de 300 mg.kg<sup>-1</sup>, tenham atuado no aumento significativo da latência pela via central, entretanto isso

deve ser confirmado mediante a realização de testes que utilizem a administração prévia de um antagonista de receptores  $\mu$ -opioides, a exemplo da naloxona.



**Figura 10:** Efeito do OEMs no teste da placa quente avaliado aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração das substâncias. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. ns = não significativo; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. (ANOVA seguido de Dunnett, n=8 por grupo).

### 3.4 Conclusão

A análise química do óleo essencial de *Myrcia splendens* revelou uma predominância de sesquiterpenos, com (2*E*,6*E*) farnesoato de metila como constituinte majoritário (42,64%). Os constituintes do OEMs não demonstraram sinais de toxicidade de acordo com o preconizado pela OECD, nem ação depressora no SNC, uma vez que não houve redução na coordenação motora dos animais frente aos critérios do teste *rota-rod*. Os resultados obtidos nos testes farmacológicos evidenciaram as propriedades antinociceptivas do referido óleo, com a premente necessidade de realização de experimentos que avaliem seu mecanismo de ação.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.
- ADORJAN, Barbara; BUCHBAUER, Gerhard. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr. J.* 2010, 25, 407–426.
- ALREJA, M.; MUTALIK, P.; NAYAR, U.; MANCHANDA, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain.* 1984, 20, 97–105.
- ANDRADE, G. S.; SANTANA, M. T.; SIQUEIRA, R. S.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. de S.; SOBRAL, M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012, 22, 181–188.
- BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem.* 2011, 40, 4, 43101.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012, 211, 39–50.
- CERQUEIRA, M. D. de; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2007, 18, 5, 998–1003.
- CODERRE, T.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *The Journal of Neuroscience.* 1992, 12, 9, 3665–3670.
- COLE, R. A.; HABER, W. A.; STZER, W. N. The Leaf Oil Composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 2013, 11, 1, 41–44.
- COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 1968, 32, 295–310.
- DEACON, Robert M. J. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments.* 2013, 75, 2609–2617.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 1977, 4, 161–174.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc.* 1957, 46, 208–209.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules.* 2011, 16, 2233–2252.

DOS SANTOS, G. C. M.; GOMES, G. A.; GONÇALVES, G. M.; de SOUSA, L. M.; SANTIAGO, G. M. P.; DE CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Essential oil from *Myrcia ovata*: chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. *Planta Med.* 2014, 80, 1588–1596.

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

DZOYEM, J. P.; MCGAW, L. J.; KUETE, V.; BAKOWSKY, U. *Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*, Chapter 9, 239–270 *In: Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 2017. Academic Press.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1953, 107, 385–393.

GUERRINI, A.; ROSSI, D.; GRANDINI, A.; SCALVENZI, L.; NORIEGA RIVERA, P. F.; ANDREOTTI, E.; TACCHINI, M.; SPAGNOLETTI, A.; POPPI, I.; MAIETTI, S. Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) *Citrus petitgrains*. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2014, 87, 108–116.

HAYES, A. G.; SHEEHAN, M. J.; TYERS, T. B. Differential sensitivity of models of antinociception in the rat, mouse and guinea-pig to mu- and kappa-opioid receptor agonists *Br. J. Pharmacol.* 1987, 91, 823–832.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; GÉRARD LAMATY, G.; LESS, J. M. B. S. Essential Oils from Five Southern Brazilian Species of *Myrcia* (Myrtaceae). *Journal of Essencial Oil Research.* 2011, 9, 13–18.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987, 30, 1, 103–114.

HUSSAIN, L.; MUHAMMAD, S. H. A.; NOOR-UL, A.; KANWAL, R.; MUHAMMAD, I. The Analgesic, Anti-Inflammatory and Anti-Pyretic Activities of *Tinospora cordifolia*. *Adv Clin Exp Med.* 2015, 24, 6, 957–964.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sciences.* 2001, 69, 2911–2919.

JAMES, S. E.; PRINCE, C.S.; THOMAS, D. Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *Eur J Pediatr.* 2005, 164, 520–522.

JIMÉNEZ, D.; ARAQUE, M.; ROJAS, L.; CORDERO, A.; BRICEÑO, B. Volatile components and antibacterial activity from *Myrcia splendens* (Sw.) DC. shoots. *Rev Fac Farm.* 2012, 54, 7–11.

JULIUS, D; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001, 413, 203–210.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 1959, 18, 412–415.

LEFFLER, A., MÖNTER, B.; KOLTZENBURG, M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience.* 2006, 139, 2, 699–709.

LIMA, D. F.; DOS SANTOS, L. L., GOLDENBERG, R.; LUCAS, E. J. New species of *Myrcia* sect. *Aulomyrcia* and notes on *Myrcia pinifolia* (Myrtaceae). *Phytotaxa.* 2017, 312, 94–102.

LIMBERGER, Renata P.; SOBRAL, Marcos; HENRIQUES, Amélia T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova,* 2004, 27, 6, 916–919.

LUCAS, E. J.; MATSUMOTO, K.; HARRIS, S. A.; NIC LUGHADHA, E. M.; BERNADINI, B.; CHASE, M. W. Phylogenetics, Morphology, and Evolution of the Large Genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). *International Journal of Plant Sciences.* 2011, 172, 915–934.

LUCAS, E. J.; WILSON, C. E.; LIMA, D. F.; SOBRAL, M.; MATSUMOTO, K. A. Conspectus of *Myrcia* sect. *Aulomyrcia* (Myrtaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 2016, 101, 648–698.

LUCAS, E. J.; AMORIM, B. S.; LIMA, D. F.; LIMA-LOURENÇO, A. R.; NIC LUGHADHA, E. M.; PROENÇA, C. E. B.; ROSA, P. O.; ROSÁRIO, A. S.; SANTOS, L. L.; SANTOS, M. F.; SOUZA, M. C.; STAGGEMEIER, V. G.; VASCONCELOS, T. N. C.; SOBRAL, M. A new infra-generic classification of species-rich Neotropical genus *Myrcia* s.l. *Kew Bulletin.* 2018, 73, 9.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. In: *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*; de Almeida, R. N., eds.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006, cap. 12

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007, 104, 33, 13525–135330.

NAKAMURA, M. J.; MONTEIRO, S. S.; BIZARRI, C. H. B.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochem. Syst. Ecol.* 2010, 38, 1170–1175.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *Guidelines for Testing of Chemicals*, OECD 425: Acute Oral Toxicity–Up-and-Down-Procedure (UPD) Paris: Head of Publications Service, 2008.

PONTES, F. C.; ABDALLA, V. C. P.; IMATOMI, M.; FUENTES, L. F. G.; GUALTIERI, S. C. J. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Braz. J. Biol.*, 2018, 1–6.

PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M.; *Life Sci.* 2006, 78, 1720–1725.

QUINTÃO, N. L. M.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Em *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental*; CARLINI, E. A., MENDES, F. R., eds.; Fap-Unifesp: São Paulo, 2011, cap. 7.

SÁ, F. A. S.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; SAMPAIO, B. L.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2012, 22, 1233–124.

SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules.* 2013, 18, 1227–1254.

SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DOS REIS, R. B. de O.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules.* 2014, 19, 1459–1480.

SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Nat. Prod. Commun.* 2015, 10, 1767–1774.

SÁ, Rita de Cássia da Silveira; LIMA, Tamires Cardoso; NÓBREGA, Flávio Rogério da; BRITO, Anna Emmanuela Medeiros de; SOUSA, Damião Pergentino de. Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2392–2432.

SANTOS, G. C. M. dos; GOMES, G. A.; GONÇALVES, G. M.; SOUSA, L. M. de; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. de; MARINHO, B; G. Essential Oil from *Myrcia ovata*: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. *Planta Med.* 2014, 80, 1588–1596.

SARMENTO-NETO, J. F.; NASCIMENTO, L. G. do; FELIPE, C. F.; DE SOUSA, D. P. Analgesic Potential of Essential Oils. *Molecules.* 2015, 21, 20–49.

SCALVENZI, Laura; GRANDINI, Alessandro; SPAGNOLETTI, Antonella; TACCHINI, Massimo; NEILL, David; BALLESTEROS, José Luis; SACCHETTI, Gianni; GUERRINI, Alessandra. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) Essential oil from Amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules* 2017, 22, 1163–1175.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test. Characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989, 38, 347–352.

SHIOTSUKI, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO, Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. 2010, 15, 189, 180–185.

SILVA, A. do N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESI, A. M.; *Nat. Prod. Commun.* 2013, 8, 269–271.

SILVA, A. do N.; BOMFIM, H. F.; MAGALHÃES, A. O.; ROCHA, M. L. da; LUCCHESI, A. M. Composição química e atividade antinociceptiva em modelo animal do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE). *Quim Nova*. 2018, 41, 9, 982–988.

SILVA, L. A. da; SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; SUEMITSU, C.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants*. 2016, 13, 3, 1–9.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015 *Myrtaceae* In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19862>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2019.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI, A., Jr.; SIMIONATTO, E. L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg.) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2010, 20, 82–86.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. *Chem. Biodivers.* 2011, 8, 73–94.

STUCKY, C. L.; DUBIN, A. E.; JESKE, N. A.; MALIN, S. A.; MCKEMY, D. D.; STORY, G. M. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Research Reviews*. 2009, 60, 1, 2–23.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992, 51, 1, 5–17.

WONG, G. Y.; GAVVA, N. R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Research Review*. 2009, 60, 1, 267–277.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1944, 80, 300–307.

WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES (WCSP). 2019. (MYRTACEAE). Facilitado por The Royal Botanic Gardens, Kew. <<http://wcsp.science.kew.org/>>. Acesso em 10 de Janeiro de 2019.

**CAPÍTULO 4 – POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E INVESTIGAÇÃO FARMACODINÂMICA NA ANALGESIA PROMOVIDA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *Myrcia* s.l.**

Aline do Nascimento Silva<sup>1\*</sup>, Horácio Freitas Bomfim<sup>2</sup>, Acsa Oliveira Magalhães<sup>1</sup>, Marilene Lopes da Rocha<sup>1</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

(Anti-inflammatory potential and pharmacodynamic investigation in analgesia promoted by essential oils of *Myrcia* sl. species). Although earlier studies confirmed the antinociceptive action of *Myrcia rostrata* DC. and *Myrcia splendens* (Sw.) DC., the mechanism of action by which analgesia occurs and their anti-inflammatory potential remain unknown. Thus, the present study assessed the activity of essential oils obtained from fresh leaves of both species in the formalin and glutamate-induced paw edema model, in addition to the mechanisms of action involved in analgesia reported in preliminary studies. In the formalin-induced paw edema test, the 150 mg.Kg<sup>-1</sup> dose of OEMr and OEMs inhibited plasma liquid leakage by 90%. In the glutamate-induced paw edema test, inhibition was less than 50% at the doses tested. The involvement of TRPA1,  $\alpha_2$ -adrenergic, muscarinic and  $\mu$ -opioid receptors was determined and the data showed that the significant antinociceptive activity of the chemical constituents of oils is associated with central action, confirmed by latency reversal in the hot plate test after naloxone administration. It is important to underscore that none of the nociceptive models used exhibited a statistically significant difference between the oils and morphine (10 mg.Kg<sup>-1</sup>). The results demonstrate that, in addition to anti-inflammatory potential, the oils display a strong antinociceptive profile, showing the need for future investigation of the pharmacological potential of their separate components.

**Keywords:** sesquiterpenes, TRPA, TRPV1, glutamate, yohimbine, atropine

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

\*E-mail: [enilaans@gmail.com](mailto:enilaans@gmail.com)

## 4.1 Introdução

A inflamação é a primeira resposta do organismo que propicia defesa contra algum estímulo prejudicial, pode ser evocada por uma variedade de agentes nocivos (microorganismos, antígenos ou lesões físicas) e envolve uma cascata de eventos bioquímicos que compreendem os sistemas vascular e imune além de diversos tipos celulares encontrados no tecido afetado (SÁ et al., 2013).

Os anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteroides e os analgésicos, sejam opioides ou não, constituem as classes terapêuticas usadas comumente para o tratamento da inflamação e da dor. Entretanto, as reações adversas associadas a esses medicamentos, principalmente nos portadores de doenças crônicas, comorbidades ou com idade avançada, são o fator preponderante para a busca de alternativas mais seguras (LUCAS et al., 2018). Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais têm sido uma fonte promissora (DZOYEM, et al., 2017), a exemplo dos óleos essenciais, os quais apresentam constituintes ativos que exibem uma série de propriedades farmacológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória (SÁ et al., 2014).

A família Myrtaceae distribui-se em todos os continentes do hemisfério sul e compreende cerca de 145 gêneros e 5970 espécies, no Brasil, ocorre de forma mais expressiva na Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015). O gênero *Myrcia* s.l. apresenta atualmente mais de 700 espécies (WCSP, 2019), resultantes da reunião de *Myrcia* De Candolle., *Marlierea* Cambessèdes, *Gomidesia* O. Berg e *Calyptanthes* Swartz direcionada por estudos moleculares (LUCAS et al., 2011; LUCAS et al., 2016) que culminaram na sinonimização de muitas espécies (LIMA et al., 2017).

Na medicina tradicional, partes aéreas frescas de plantas do gênero *Myrcia* são utilizadas na forma de compressas para tratar inflamação e infecções de pele (STEFANELLO, et al., 2011). Estudos prévios com os óleos essenciais de *Myrcia rostrata* DC., destacaram a presença preponderante de sesquiterpenos (LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004) bem como seu potencial antinociceptivo (SILVA et al., 2018). Já para a *Myrcia splendens* (Sw.) DC. há relatos da ação antioxidante (PONTES et al., 2018) e da predominância de sesquiterpenos na composição dos voláteis (NAKAMURA et al., 2010; COLE; HABER; SETZER, 2013), com alguns exibindo atividade antimicrobiana *in vitro* (JIMÉNEZ, et al.,

2012; SILVA; UETANABARO; LUCCHESI, 2013), potencial citotóxico e anti-câncer (SCALVENZI et al., 2017).

As atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de diversos constiuintes dos óleos essenciais já relatadas na literatura (DE SOUSA et al., 2011; SÁ et al., 2013; SÁ et al., 2014; SÁ et al., 2015), bem como os promissores resultados obtidos alhures com outras espécies de *Myrcia* (ANDRADE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014) impulsionaram a investigação de *M. rostrata* DC. e de *M. splendens* (Sw.) DC. como potenciais fontes de substâncias bioativas. Assim, esse trabalho propôs avaliar o grau de dissimilaridade na composição química dos óleos essenciais das espécies supracitadas, investigar seu potencial anti-inflamatório e os mecanismos pelos quais promovem analgesia em modelo animal, a fim de descobrir novos agentes para o tratamento da dor e da inflamação.

## **4.2 Material e métodos**

### 4.2.1 Coleta

As folhas de *M. rostrata* e de *M. splendens* foram coletadas em janeiro de 2016, no período da manhã, num remanescente de Floresta Ombrófila, localizado no Campus II da UNEB, município de Alagoinhas – BA (12° 10' 37" S e 38° 24' 35" W). As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da UEFS sob os números 155.923 e 155.925, respectivamente, a identificação taxonômica foi realizada por Aline do Nascimento Silva e as espécies foram devidamente cadastradas no SisGen (ANEXO B).

### 4.2.2 Obtenção do óleo essencial

Os óleos essenciais de *M. rostrata* (OEMr) e de *M. splendens* (OEMs) foram obtidos, em triplicata, por hidrodestilação das folhas frescas, num período de 3 h contadas a partir do refluxo, utilizando um aparelho de Clevenger. Em seguida, foram secos com sulfato de sódio

anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), transferidos para frascos de vidro âmbar e armazenados a  $-22\text{ }^\circ\text{C}$ , até a realização da análise química e dos testes farmacológicos. Seus rendimentos foram determinados pela relação entre o volume de óleo extraído e a biomassa vegetal livre de umidade. Para a obtenção da umidade presente nas folhas, aproximadamente 1,0 g do material vegetal fresco foi pesado e submetido a um Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®.

#### 4.2.3 Análise química

A análise da composição química foi realizada pela utilização de duas técnicas: a Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) para a quantificação dos constituintes e a Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) para a avaliação qualitativa dos óleos essenciais.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats e do índice Aritmético de cada um dos picos, obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcanos (C8 a C24), além da comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011) e com os espectros de massa da biblioteca do equipamento.

##### 4.2.3.1 Análise multivariada dos óleos essenciais de *Myrcia rostrata* e *Myrcia splendens*

Levando em consideração que alguns autores consideram *M. rostrata* e *M. splendens* como sinônimos (SOBRAL et al., 2015; LIMA et al., 2017), buscou-se através da análise multivariada avaliar o grau de dissimilaridade na composição química dos dois óleos essenciais, e assim, corroborar a classificação taxonômica vigente ou refutá-la. De acordo com Sabino e colaboradores (2012), as técnicas de análise multivariada são úteis no estudo de divergências taxonômicas e de variabilidade intraespecífica em espécies com potencial econômico.

Para tanto, foram realizadas a análise dos componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis* – HCA) mediante a utilização do programa estatístico *Past* versão 3.2. Inicialmente, as médias dos percentuais relativos de cada um dos 48 constituintes químicos identificados no OEMr e no OEMs foram submetidas à PCA e à HCA. Em seguida, o dendrograma foi obtido pelo método da ligação média entre grupos (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* – UPGMA), a distância euclidiana foi utilizada como coeficiente de dissimilaridade com correlação cofenética de 0,8593.

#### 4.2.4 Testes farmacológicos

##### 4.2.4.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus* L., 1758), jovens 3-4 meses (25-35 g), da linhagem *Swiss*, obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (32 x 20 x 13 cm), providas de grade aramada em aço inoxidável, comedouro, encaixe para o bebedouro e cama de maravalha. As caixas contendo os animais foram dispostas em estantes numa sala climatizada, com temperatura de  $22 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar em  $50 \pm 10\%$ , ciclo claro/escuro de 12 h (controlado por temporizador digital), com período claro das 6:00 às 18:00 h e livre acesso à ração do tipo peletizada e água.

Duas horas antes de cada teste, foram transferidos para a sala de experimentação a fim de minimizar o estresse e possíveis alterações comportamentais decorrentes da mudança de ambiente. Uma hora antes dos experimentos, foram privados da ração, porém a água foi ofertada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana e aprovados conforme protocolo número 008/2017 (ANEXO A).

#### 4.2.4.2 Drogas

Foram utilizados Indometacina (Sigma®) na dose 20 mg/Kg, Sulfato de morfina (Cristália®) na dose de 10 mg/Kg, Cloridrato de naloxona (Hipolabor®) na dose de 5 mg/Kg, Ácido glutâmico (Sigma®) na concentração de 20  $\mu\text{mol/pata}$ , Cinamaldeído (Sigma®) na concentração de 10 nmol/pata, Atropina (Sigma®) na dose de 5 mg/Kg, Ioimbina (Sigma®) na dose de 0,15 mg/Kg e Formalina (2,5% de formaldeído em solução salina 0,9%).

#### 4.2.4.3 Testes de atividade anti-inflamatória

##### 4.2.4.3.1 Edema de pata induzido por formalina

O teste do edema de pata é um dos métodos utilizados tradicionalmente tanto para a prospecção de substâncias anti-inflamatórias como para avaliar a eficácia de fármacos já disponíveis. O experimento baseia-se na capacidade desses agentes em inibir o edema produzido na pata do animal após a injeção de um agente inflamatório, incluindo formalina, culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e dextrana (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962), ou ainda histamina, serotonina, bradicinina e carragenina (KASAHARA et al., 1985).

Durante o teste, a variação no volume da pata posterior direita dos animais foi avaliada previamente (medida basal), e após a aplicação da formalina. Para tanto, antes da administração de quaisquer substâncias, foram realizadas as medidas das patas de todos os camundongos com o auxílio de um pletismômetro digital (Insight®).

Em seguida, os animais foram, randomicamente, separados em cinco grupos (n=8): um controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100  $\mu\text{L}$  de Tween 80 a 5% via i.p.), um padrão (os animais foram tratados com indometacina Sigma® na dose de 20  $\text{mg.kg}^{-1}$ , via i.p.) e três grupos experimentais (os animais foram tratados com cada óleo essencial nas doses de 75, 150 ou 300  $\text{mg.kg}^{-1}$ , diluídos no veículo, por via i.p.).

Decorridos 30 min, receberam 20  $\mu\text{L}$  de formalina (i.pl.) na pata posterior direita, as quais foram medidas aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração do referido agente

flogístico. O edema foi determinado pela diferença entre o volume lido em cada um dos tempos e a medida basal. As médias dos valores da atividade anti-inflamatória dos animais tratados com os óleos e com a droga padrão foram comparadas com o grupo controle mediante a análise de variância. O percentual de inibição foi calculado mediante a utilização da equação 1.

$$\% \text{Inibição} = \frac{\text{Edema do controle} - \text{Edema da dose}}{\text{Edema do controle}} \times 100$$

**Equação 1:** Percentual de inibição do edema de pata.

#### 4.2.4.3.2 Edema de pata induzido por glutamato

A injeção intraplantar (i.pl.) do glutamato está associada tanto a uma resposta nociceptiva rápida quanto à formação de edema, provocado pelo extravasamento de plasma para os sítios da lesão tecidual (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

De forma semelhante ao teste anterior, o objetivo foi avaliar a variação no volume da pata posterior direita dos animais, antes (medida basal) e após a aplicação do estímulo inflamatório, nesse caso, o glutamato. *A priori*, foram realizadas as medidas das patas de todos os camundongos com o auxílio de um pletismômetro digital (Insight®), em seguida, os animais foram, randomicamente, separados em quatro grupos (n=6): o controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% via i.p.); um padrão (os animais foram tratados com indometacina na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup>) e dois experimentais (os animais foram tratados com o OEMr e o OEMs na dose 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.).

Decorridos 30 min da administração dos tratamentos, os animais receberam 20 µL de glutamato (20 µmol/pata, em solução salina, via i.pl.) na pata posterior direita, as quais foram medidas aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração do referido agente flogístico. O edema foi determinado pela diferença entre o volume lido em cada um dos tempos e a medida basal. As médias dos valores da atividade anti-inflamatória dos animais tratados com os óleos e com a droga padrão foram comparadas com o grupo controle mediante a análise de variância.

#### 4.2.4.4 Testes de mecanismo de ação

Para a realização dos testes de mecanismo de ação apenas a dose de 300 mg/Kg dos óleos essenciais de *M. rostrata* e de *M. splendens* foi utilizada visto que em experimentos preliminares de nocicepção a referida dose se mostrou mais efetiva para ambas as espécies, em todos os testes realizados.

##### 4.2.4.4.1 Nocicepção induzida por glutamato

Esse teste foi realizado com a finalidade de investigar se os constituintes químicos do OEMr e o OEMs seriam capazes de atuar antagonizando a nocicepção induzida pelo glutamato. Para tanto foi utilizado o método descrito por Beirith et al. (2002), com algumas adaptações, assim, os camundongos foram separados em cinco grupos (n=6): um controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5% via i.p.); dois grupos padrão (os animais foram tratados com indometacina na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p. ou morfina na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.) e dois experimentais (os animais foram tratados com os óleos na dose 300 mg.kg<sup>-1</sup>, diluídos no veículo, por via i.p.). Após 30 min da administração dos tratamentos, um volume de 20 µL de glutamato (20 µmol/pata, em solução salina) foi injetado (i.pl.) na pata posterior direita de cada animal, sendo estes observados, individualmente, durante 5 min em caixas triangulares espelhadas (25 x 25 x 25 cm), com o propósito de cronometrar, em segundos, o tempo total gasto em lambidas ou mordidas na pata, comportamento considerado como indicativo de nocicepção.

##### 4.2.4.4.2 Nocicepção induzida por cinamaldeído

A estimulação de receptores periféricos do tipo TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina tipo 1) por agonistas, a exemplo do óleo de mostarda e do cinamaldeído, está relacionada a uma série de respostas pró-inflamatórias, as quais compreendem fatores

vasculares como a formação de edema e a consequente sensação dolorosa (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012). O procedimento foi realizado de acordo com uma adaptação ao método descrito por Cordova et al. (2011), no qual os camundongos foram previamente separados em cinco grupos (n=6): um controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100  $\mu$ L de Tween 80 a 5% via i.p.); dois grupos padrão (os animais foram tratados com indometacina na dose de 20  $\text{mg.kg}^{-1}$ , via i.p. ou morfina na dose de 10  $\text{mg.kg}^{-1}$ , via i.p.) e dois experimentais (os animais foram tratados com o OEMr e o OEMs na dose 300  $\text{mg.kg}^{-1}$ , diluídos no veículo, por via i.p.). Após 30 min, o cinamaldeído foi injetado (i.pl.) na pata posterior direita, na concentração de 10 nmol/pata. Em seguida, os animais foram colocados numa caixa de observação triangular espelhada (25 x 25 x 25 cm) para serem individualmente observados durante 5 min, a fim de que o tempo total, em segundos, utilizado com lambidas ou mordidas na pata fosse cronometrado e considerado como um parâmetro de nocicepção.

#### 4.2.4.4.3. Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos

A fim de avaliar o possível envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na antinocicepção exibida, em testes realizados previamente, pelos constituintes do OEMr e do OEMs, foi utilizado o método descrito por De Souza e colaboradores (2009), no qual os animais devem receber 15 min antes da administração do veículo, das substâncias teste e da droga padrão uma dose de 0,15  $\text{mg.kg}^{-1}$  (i.p.) de ioimbina (um antagonista dos adrenoceptores  $\alpha_2$ ). Para tanto, os animais foram divididos em seis grupos (n=6): sendo um controle, os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100  $\mu$ L de Tween 80 a 5% (i.p.); dois grupos com os animais tratados com o OEMr e o OEMs na dose 300  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; um grupo tratado com morfina na dose de 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  (i.p.) todos associados à precedente injeção de ioimbina, e por fim, dois grupos com murinos tratados apenas com os óleos na dose 300  $\text{mg.kg}^{-1}$ , diluídos no veículo (i.p.). Trinta minutos após receber os respectivos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste da nocicepção espontânea induzida pela formalina.

#### 4.2.4.4.4 Envolvimento do sistema muscarínico

Para avaliar o possível envolvimento do sistema muscarínico no potencial antinociceptivo exibido pelo OEMr e o OEMs foi utilizado o teste da nocicepção espontânea induzida pela formalina com pré-tratamento dos animais (15 min antes da administração de quaisquer substâncias) com uma dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (i.p.) de atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (PEANA, et al., 2003). Sendo assim, os animais foram divididos em sete grupos (n=6): o controle (os animais receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100  $\mu\text{L}$  de Tween 80 a 5% via i.p.); dois grupos com os murinos tratados com os óleos essenciais na dose  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ , diluídos no veículo (i.p.); dois grupos padrão, um tratado com morfina na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  (i.p.) e outro com indometacina na dose de  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  (i.p.), todos associados à precedente injeção de atropina, e por fim, dois grupos com os camundongos tratados apenas com cada um dos óleos essenciais na dose  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ , diluídos no veículo (i.p.). É importante destacar que a formalina foi injetada na região intraplantar da pata posterior direita dos animais somente após 30 min da administração dos tratamentos.

#### 4.2.4.4.5 Envolvimento do sistema opioide

Para fins de comprovação do efeito central dos óleos essenciais, esse teste foi executado mediante a prévia administração do cloridrato de naloxona, droga conhecida por deslocar, competitivamente, fármacos analgésicos opioides dos seus respectivos receptores, antagonizando, por consequência, seus efeitos. Como as reações comportamentais exibidas durante o experimento são consideradas respostas supraespinhais devido ao envolvimento de uma função cerebral mais elevada (EDDY; LEIMBACH, 1953; ANKIER, 1974), sua utilização na pesquisa pré-clínica da dor é de relevante importância, tendo em vista que possibilita a validação de candidatos a fármacos com ação sobre o SNC (DZOYEM et al., 2017).

Visando evitar uma interpretação equivocada dos resultados, um dia antes do experimento, os camundongos foram pré-selecionados (sem a administração de substâncias),

sendo considerados aptos, aqueles que permaneceram na placa aquecida a uma temperatura de  $54 \pm 1$  °C por mais de 10 e menos de 30 s. No dia do teste, os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n=6): o controle (os camundongos receberam o veículo, solução salina a 0,9% com 100 µL de Tween 80 a 5%, via i.p.); o padrão (foi administrada morfina na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, via i.p.); dois grupos experimentais (os animais foram tratados com a dose de 300 mg.kg<sup>-1</sup> do OEMr e do OEMs) e, por último, os três grupos que receberam a naloxona (antagonista de receptores µ-opioides) na dose de 1,5 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p.), 15 min antes da administração da morfina ou de cada um dos óleos essenciais.

Em seguida, os camundongos foram colocados, individualmente, na superfície da placa aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias. O intervalo decorrido entre a colocação do animal na placa e a ocorrência de lambida das patas ou comportamento de pular foi registrado em segundos. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado para indicar analgesia completa e evitar lesão tecidual.

#### 4.2.5. Análise estatística

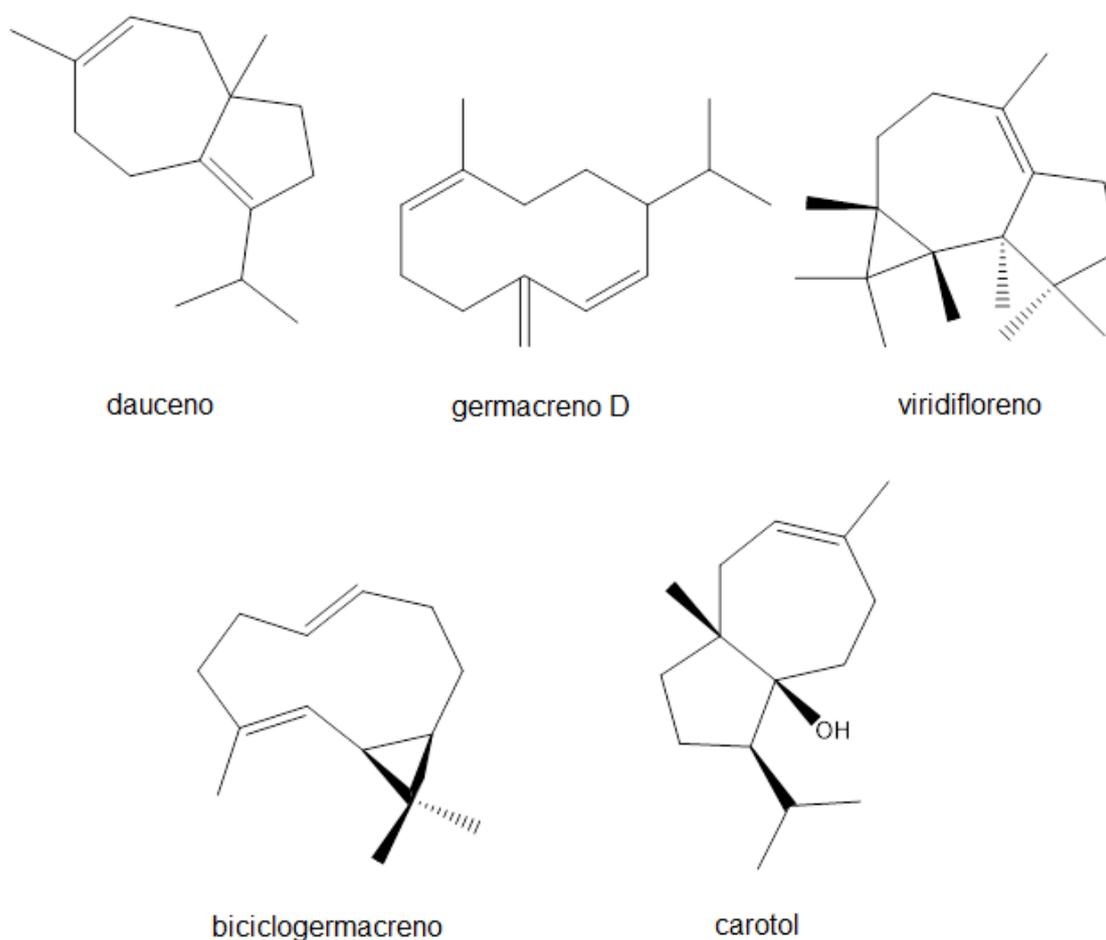
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós teste de Dunnett. Os resultados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média e considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1. Análise multivariada dos óleos essenciais de *Myrcia rostrata* e *Myrcia splendens*

As técnicas de análise multivariada possibilitam compreender o polimorfismo químico de óleos essenciais, o qual pode estar atrelado à variabilidade genética ou à resposta das plantas frente às alterações no ambiente. Nesse sentido, a PCA e a HCA são técnicas estatísticas apropriadas para avaliar o grau de dissimilaridade entre amostras caracterizadas

por um número elevado de variáveis (SANTOS et al., 2005). Assim, os resultados evidenciaram que os componentes principais 1 e 2, formados por constituintes como dauceno, germacreno D, viridifloreno, biclogermacreno e carotol (Figura 1, p. 112) explicam 99,98% da variação dos constituintes químicos presentes no OEMr (Figura 2, p.113). Já para o OEMs, ledol,  $\alpha$ -epoxicedreno,  $\beta$ -bisaboleno, *E*-nerolidol, *2E,6E*-farnesol e *2E,6E*-farnesoato de metila (Figura 3, p. 114), além de outros, explicam 97,6% da variabilidade (Figura 4, p. 115). De maneira semelhante, os PCs 1 e 2 explicam 98,96% da variação, quando os dados das duas espécies são analisados conjuntamente (Figura 5, p. 116).

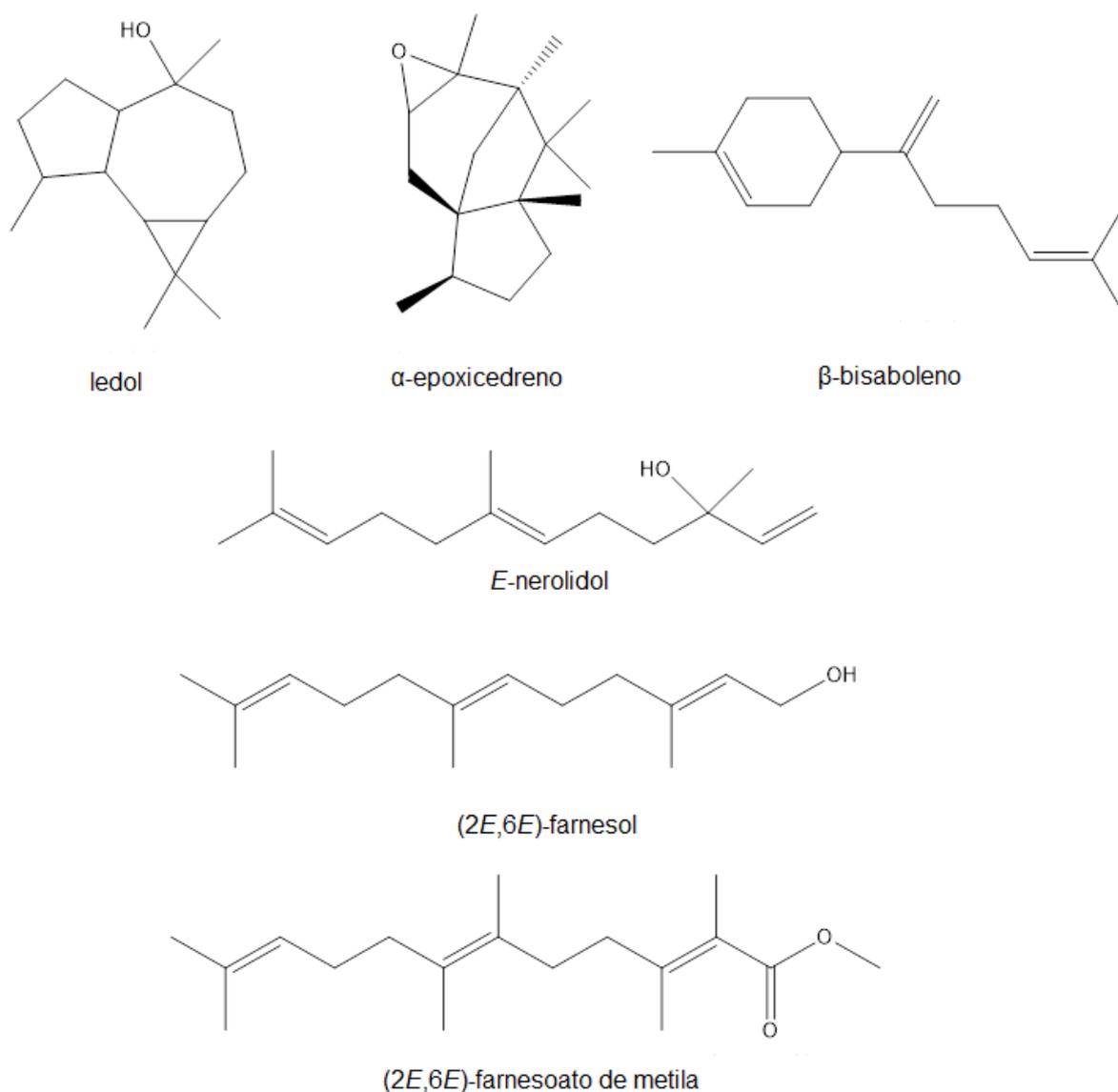


**Figura 1:** Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Myrcia rostrata*.

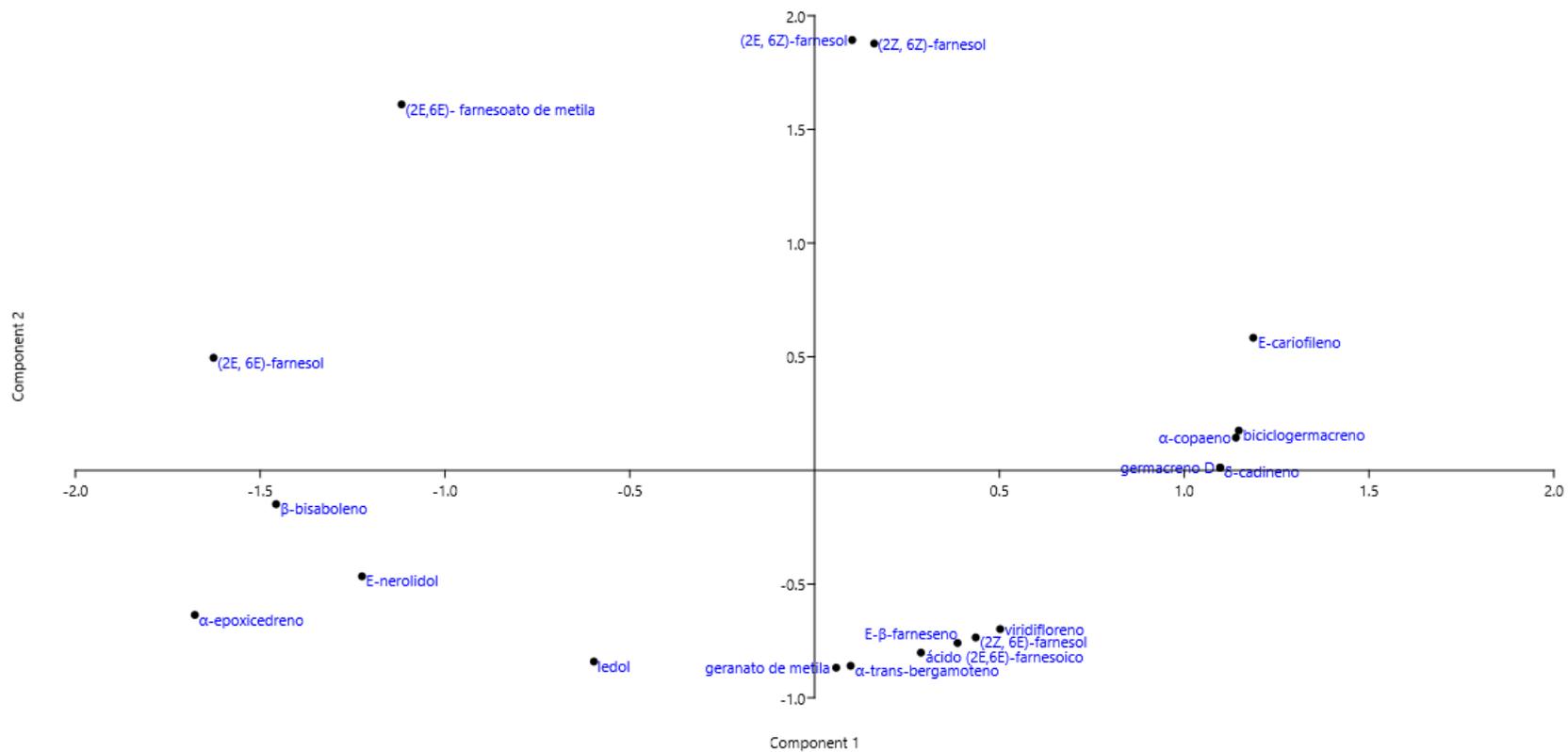
Na análise HCA utilizada para a construção do dendrograma (Figura 6, p. 117), a estratégia de agrupamento por UPGMA possibilitou a separação dos grupos, sendo a distância euclidiana a ferramenta que permitiu a obtenção da medida de dissimilaridade. Para Ferraudo



Para Stefanello et al. (2011), Myrtaceae enquanto família é bem delimitada, entretanto sua classificação taxonômica em níveis inferiores é difícil, visto que a separação de alguns gêneros não é clara. Os autores sugeriram que estudos químicos poderiam auxiliar na relação filogenética das mirtáceas, mas também afirmaram que os escassos estudos por PCA realizados com seus óleos essenciais não mostraram concordância entre os clados definidos pela base química e a classificação taxonômica em subtribos. Sendo assim, devido às dificuldades de classificação inerentes à família, os resultados aqui obtidos deverão ser associados com os estudos filogenéticos para uma análise minuciosa, num futuro próximo, a fim de validar ou não a sinonimização vigente de *M. rostrata* como *M. splendens*.

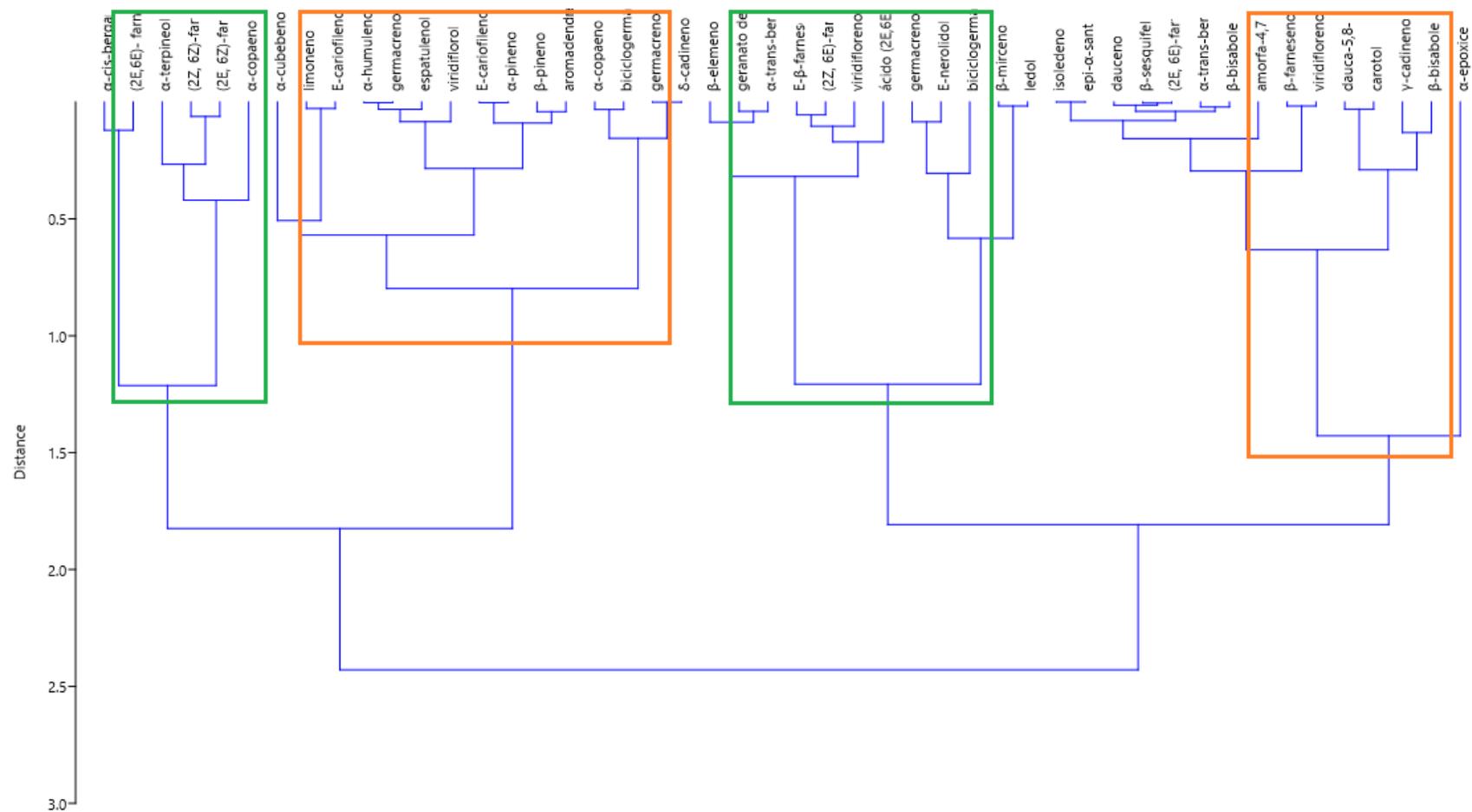


**Figura 3:** Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Myrcia splendens*.



**Figura 4:** Análise dos componentes principais para o óleo essencial de *Myrcia splendens*





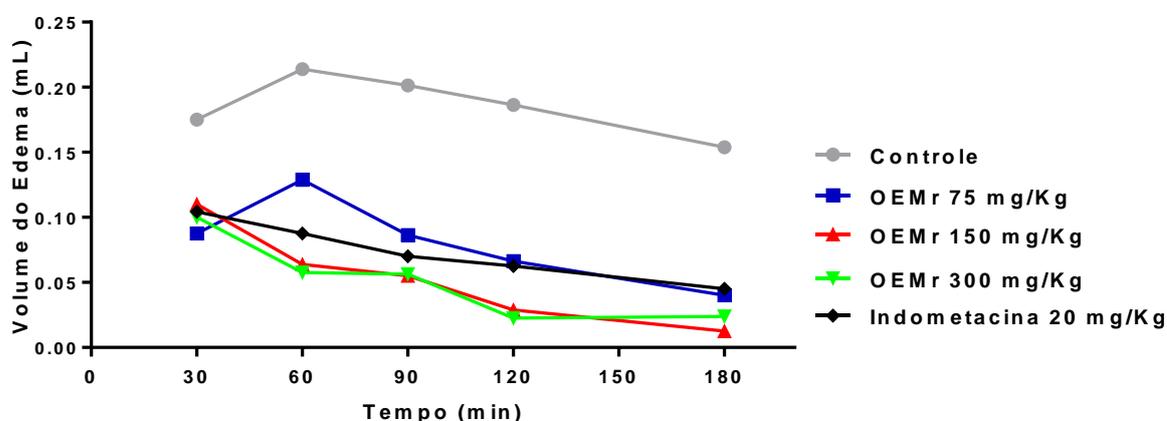
**Figura 6:** Dendrograma vertical da matriz de distâncias pelo método da ligação média entre os grupos para os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *M. rostrata* (em vermelho) e *M. splendens* (em verde) e agrupados por grau de similaridade, gerado pelo programa *Past*.

#### 4.3.2. Testes de atividade anti-inflamatória

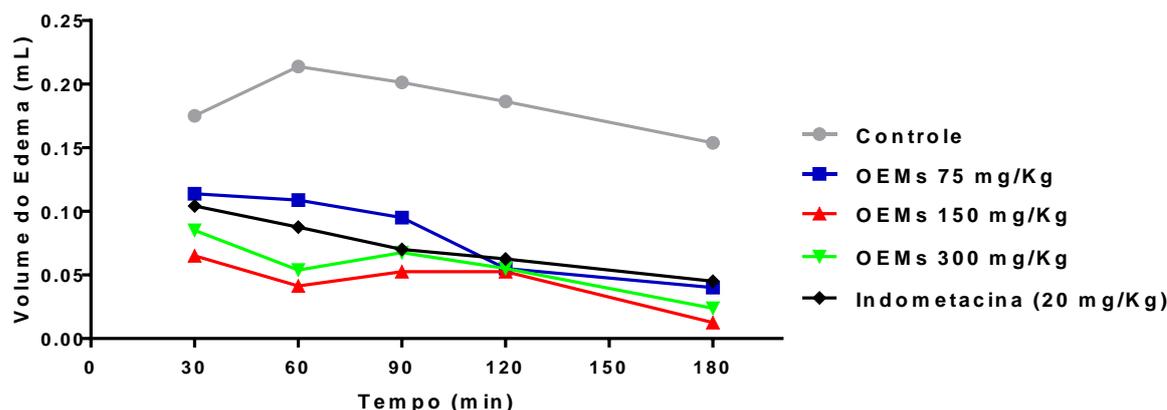
##### 4.3.2.1 Edema de pata induzido por formalina

A formalina injetada na pata do animal provoca a formação de edema como consequência de um processo inflamatório mediado por prostaglandina, serotonina, histamina, bradicinina e citocinas como a interleucina-1 $\beta$ , além do TNF- $\alpha$  e do óxido nítrico (FU; LIGHT; MAIXNER, 2001), sendo assim, por intermédio desse teste foi possível verificar de forma direta o quanto os óleos essenciais inibiram o edema, e indiretamente, sua influência na liberação dos mediadores inflamatórios e da imunidade inata supracitados.

Os resultados obtidos indicaram a relevante atividade anti-inflamatória do OEMr e do OEMs evidenciada pela redução no volume do edema (Figuras 7 e 8). Com exceção da dose de 75 mg.kg<sup>-1</sup>, ambos os óleos apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) aos 60, 90, 120 e 180 min após a administração da formalina, quando comparados ao grupo controle. A indometacina na dose 20 mg.Kg<sup>-1</sup>, anti-inflamatório não esteroidal reconhecido por sua atividade inibitória não seletiva sobre a COX e droga padrão do teste, também reduziu o edema conforme esperado (Tabelas 1 e 2).



**Figura 7:** Efeito do OEMr no teste do edema de pata induzido pela formalina aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração do agente flogístico.



**Figura 8:** Efeito do OEMs no teste do edema de pata induzido pela formalina aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração do agente flogístico.

**Tabela 1:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pela formalina. Os resultados indicam o volume em mL do edema, medido em cada um dos tempos, subtraído da medida basal.

Tempo	Controle	OEMr		OEMs		Indometacina			
		75 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg	150 mg/Kg	20 mg/Kg	20 mg/Kg		
<b>Volume do edema (mL)</b>									
30'	0,175±0,035	0,098±0,036	**	0,11±0,037	ns	0,1±0,0489	*	0,104±0,025	**
60'	0,213±0,007	0,128±0,043	**	0,063±0,017	****	0,057±0,024	****	0,087±0,022	****
90'	0,201±0,06	0,086±0,039	****	0,055±0,027	****	0,056±0,028	****	0,07±0,021	****
120'	0,186±0,083	0,066±0,035	****	0,028±0,032	****	0,022±0,017	****	0,062±0,01	****
180'	0,153±0,054	0,040±0,040	****	0,012±0,023	****	0,023±0,024	****	0,045±0,02	****
<b>Volume do edema (mL)</b>									
30'	0,175±0,035	0,113±0,024	ns	0,065±0,034	****	0,085±0,044	**	0,104±0,025	*
60'	0,213±0,007	0,108±0,046	****	0,041±0,022	****	0,053±0,039	****	0,087±0,022	****
90'	0,201±0,06	0,095±0,05	****	0,052±0,022	****	0,067±0,034	****	0,07±0,021	****
120'	0,186±0,083	0,055±0,029	****	0,052±0,035	****	0,055±0,033	****	0,062±0,01	****
180'	0,153±0,054	0,04±0,04	****	0,013±0,02	****	0,024±0,026	****	0,045±0,02	****

Resultados expressos como média±desvio padrão e comparados com o grupo controle. ns= não significativo; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001. (Anova seguido de Dunnett, n = 8)

Os dados reunidos na Tabela 2 demonstram que o OEMr e o OEMs nas doses de 150 e 300 mg.Kg<sup>-1</sup> apresentaram percentuais de inibição do edema expressivos e superiores àqueles obtidos para a indometacina. Vale ressaltar que a dose de 150 mg.Kg<sup>-1</sup> de ambos os óleos essenciais promoveu uma inibição superior a 90%, 180 min após a administração do agente flogístico. Percentuais de inibição inferiores exibidos pela dose de 300 quando comparada à de 150 mg.Kg<sup>-1</sup> podem ser atribuídos à completa ocupação dos receptores, indicando que o

aumento da dose, nesse caso, não estaria, necessariamente, relacionado a um acréscimo da atividade anti-inflamatória.

**Tabela 2:** Percentual de inibição do edema de pata induzido pela formalina para o OEMr e o OEMs.

Tempo	OEMr	OEMr	OEMr	OEMs	OEMs	OEMs	IND
	75 mg/Kg	150 mg/Kg	300 mg/Kg	75 mg/Kg	150 mg/Kg	300 mg/Kg	20 mg/Kg
	<b>Inibição do edema (%)</b>						
30'	44	37	42,85	35,4	62,86	51,42	40,57
60'	39,9	70,4	73,2	49,29	80,75	75,11	59,15
90'	57,2	72,63	72,13	52,73	74,12	66,66	65,17
120'	64,5	84,94	88,17	70,43	72,04	70,43	66,7
180'	73,85	92,15	84,96	73,85	91,5	84,96	70,58

De acordo com Gangwar et al. (2015), a formalina induz a formação de edema resultante de um processo inflamatório mediado por neuropeptídeos como a substância P, além de prostanoídes, serotonina e histamina, com a bradicinina desempenhando um papel muito mais preponderante na estimulação de neurônios aferentes nociceptivos do que nas alterações vasculares. O edema de pata induzido pela formalina envolve também infiltrações de neutrófilos, macrófagos e proliferação de fibroblastos, sendo um método que reproduz relativamente bem, em modelo animal, a artrite humana e por isso, se destaca como um dos ensaios mais adequados para identificar agentes anti-inflamatórios eficazes no tratamento de inflamação aguda e crônica (DUTTA; DAS, 2010; JOHN; SHOBANA, 2012).

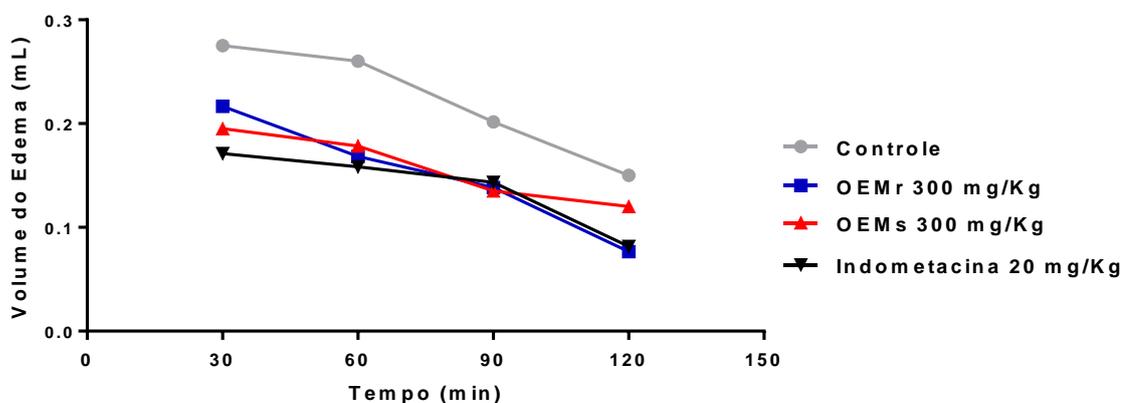
Para Moilanen e colaboradores (2012), os TRPA1 também apresentam um papel significativo na mediação da resposta inflamatória. Estudos apontam que camundongos *knockout* com expressão deficitária de TRPA1 apresentaram respostas muito reduzidas a substâncias químicas irritantes como a formalina. Além disso, o bloqueio desses receptores *in vivo* seja pelo uso de um antagonista específico ou através da alteração do gene TRPA1 atenua, substancialmente, as respostas relacionadas tanto com a dor quanto com a inflamação aguda elicitadas pelo referido agente (MCNAMARA et al, 2007).

Seguindo a linha de raciocínio supracitada, os óleos essenciais de *Myrcia* poderiam ter minimizado o edema induzido pela formalina ao antagonizarem os TRPA1, para fins de comprovação dessa conjectura, a realização de testes que utilizem a injeção intraplantar de agonistas desses receptores, a exemplo do cinamaldeído, é de extrema importância. Por outro lado, de acordo com uma publicação recente, sesquiterpenos como o guaieno foram capazes de reduzir as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , assim como a produção de NO em

culturas de macrófagos (MARQUES et al., 2018). Diante do exposto e dos relevantes resultados obtidos, depreende-se que o OEMr e o OEMs, assim como os óleos essenciais em geral, por apresentarem uma composição química complexa, podem ser detentores de constituintes capazes de atuar em uma ou mais vias, por diferentes mecanismos de ação, sendo de extrema importância a sua ulterior investigação.

#### 4.3.2.2 Edema de pata induzido por glutamato

Uma das características do processo inflamatório agudo é o edema resultante da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de líquido para o local acometido por uma lesão. Assim, a formação do edema é uma medida extremamente útil para mensurar os níveis de inflamação, bem como a ação de um agente anti-inflamatório (CABRINI et al., 2011). Os resultados obtidos no teste revelaram que os constituintes dos óleos essenciais foram capazes de reduzir o edema ao serem comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo (Figura 9 e Tabela 3). A diminuição do extravasamento de líquido para o local da injeção do glutamato foi evidenciada mais tardiamente, aos 120 min para o OEMr, e aos 90 min após a injeção do glutamato para o OEMs. Entretanto, os resultados não foram tão expressivos, considerando que os percentuais de inibição se mantiveram inferiores a 50% em todos os tempos avaliados (Tabela 4).



**Figura 9:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pelo glutamato aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do agente flogístico.

Um relato na literatura aponta que o edema de pata induzido por glutamato apresenta envolvimento de receptores ionotrópicos não-NMDA e liberação de óxido nítrico. Essa relação foi estabelecida por intermédio de ensaios utilizando um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), o L-NOARG, o qual reduziu, significativamente, tanto a nocicepção quanto o edema promovidos por esse aminoácido, com subsequente reversão quando L-arginina, um precursor do NO, foi administrado. Além disso, a injeção i.pl. de glutamato ocasionou uma expressiva produção de nitrito no exsudato da pata dos animais, confirmando o envolvimento do NO em uma das vias de sinalização que contribuem para a dor e a inflamação provocadas pelo glutamato (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2003).

**Tabela 3:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste do edema de pata induzido pelo glutamato. Os resultados indicam o volume em mL do edema, medido em cada um dos tempos, subtraído da medida basal.

Tempo	Controle	OEMr 300 mg/Kg	OEMs 300 mg/Kg	Indometacina 20 mg/Kg
Volume do edema mL				
30'	0,275±0,042	0,216±0,056 *	0,195±0,036 **	0,171±0,028 ****
60'	0,26±0,025	0,168±0,028 ***	0,178±0,018 ***	0,158±0,035 ****
90'	0,201±0,011	0,138±0,018 *	0,135±0,042 *	0,143±0,035 *
120'	0,15±0,032	0,076±0,03 **	0,12±0,039 ns	0,081±0,028 **

Resultados expressos como média±desvio padrão e comparados com o grupo controle. ns=não significativo; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001. (Anova seguido de Dunnett, n=6)

**Tabela 4:** Percentual de inibição do edema de pata induzido pelo glutamato para o OEMr e o OEMs.

Tempo	OEMr 300 mg/Kg	OEMs 300 mg/Kg	Indometacina 20 mg/Kg
Percentual de inibição (%)			
30'	21,45	29	37,81
60'	35,38	31,53	39,26
90'	31,34	32,83	28,85
120'	49,33	20	46

A indometacina, droga padrão utilizada no teste, e reconhecida por sua atividade na inibição não seletiva da COX também foi pouco efetiva na redução do edema. Alguns trabalhos abordam o uso do glutamato em modelos animais de artrite como um indutor de edema e inflamação, visando a busca de fármacos com ação antiartrítica. Nos experimentos, os autores relatam que o inchaço das articulações, a hiperemia e as alterações histológicas que incluem infiltrado de células polimorfonucleares e erosão cartilaginosa somente são

suprimidos pela co-administração de dexametasona e moléculas que antagonizem os receptores de substância P e glutamatérgicos (LAM; NG, 2010; BONNET et al., 2013). Nesse sentido, os óleos essenciais testados certamente não atuam como antagonistas dos referidos receptores, assim, sua ação ao reduzir o edema, mesmo pouco significativa nas doses testadas, provavelmente esteja relacionada a outro mecanismo, ainda não elucidado nos experimentos por ora executados.

#### 4.3.3 Testes de mecanismo de ação

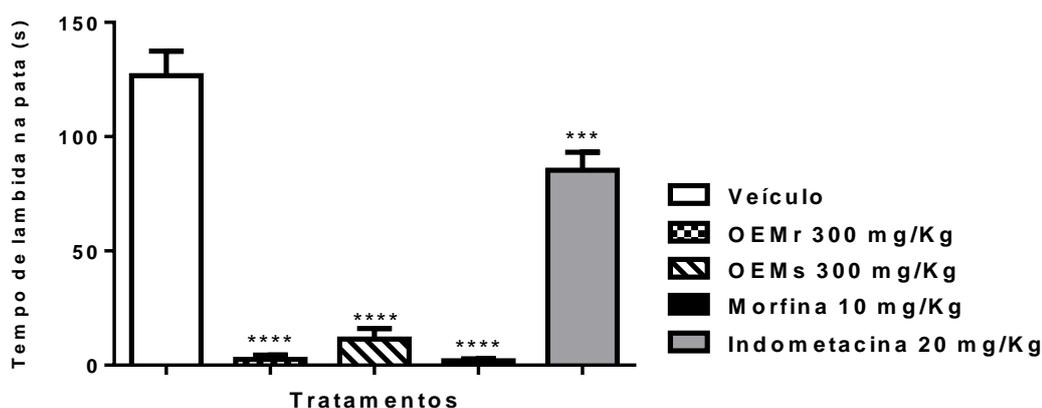
##### 4.3.3.1 Nocicepção induzida por glutamato

O glutamato é um aminoácido que atua como neurotransmissor excitatório nas sinapses centrais, além disso, muitos neurônios sensoriais primários também o liberam na presença de substâncias nocivas ou danos teciduais. Nos terminais nervosos periféricos sua exocitose ocasiona dor e inflamação crônica, desta forma o antagonismo dos receptores de glutamato está associado à diminuição da excitabilidade aferente e conseqüentemente, ao efeito antinociceptivo (MILLER et al., 2011). Através da interação com os receptores NMDA e não-NMDA por um mecanismo que depende da via L-arginina-óxido nítrico, o glutamato desempenha um papel relevante na transdução dos estímulos deletérios, sendo assim, o modelo de nocicepção induzida por esse aminoácido tende a identificar substâncias que atuam nos referidos alvos (DU; KOLTZENBURG; CARLTON, 2001; SCHEIDT, et al., 2002).

Os resultados obtidos para o OEMr e OEMs (Figura 10) evidenciaram uma redução de 98,02 e 90,98%, respectivamente, no tempo de lambida da pata dos camundongos quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo ( $126,7 \pm 10,71$  s). A indometacina reduziu o tempo de lambida em 32,71% e a morfina em 98,48%, esses dados demonstram que não houve diferença estatística dos dois óleos essenciais entre si, tampouco entre eles e a morfina.

Conforme já mencionado, a nocicepção promovida pela injeção de glutamato na pata dos animais está atrelada à liberação de NO e à ativação de receptores NMDA e não-NMDA, envolvendo não somente uma ação periférica como também espinhal e supra espinhal (MILLER et al., 2011). Apesar do pronunciado efeito antinociceptivo dos óleos essenciais não

é possível atribuir a estes uma ação antagonista à via do óxido nítrico ou aos receptores glutamatérgicos. Mesmo porque a baixa eficácia dos óleos na inibição do edema de pata induzido pelo glutamato descartaria essa possibilidade. Por outro lado, a semelhança dos resultados do OEMr e do OEMs com o retratado para a morfina sugerem que a antinocicepção esteja relacionada à ação central, a qual pode ser corroborada ou refutada mediante a realização de experimentos com a co-administração de antagonistas  $\mu$ -opioides.



**Figura 10:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste da nocicepção induzida pelo glutamato. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).

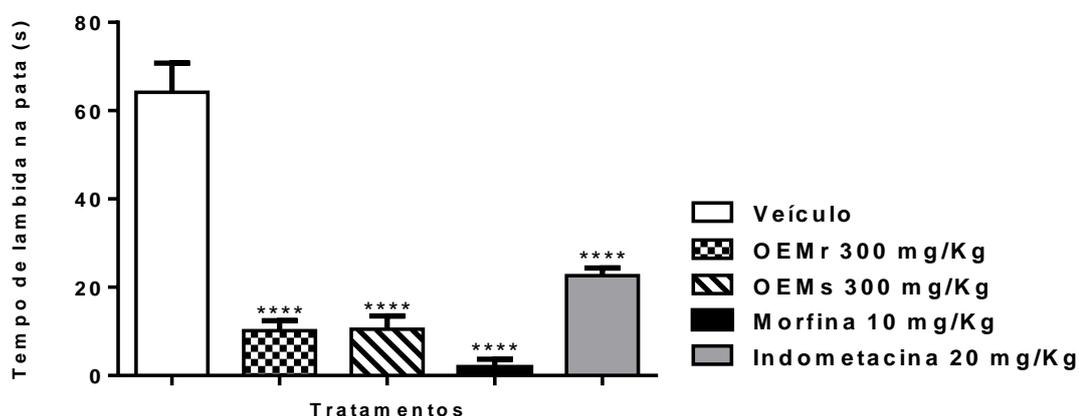
#### 4.3.3.2 Nocicepção induzida por cinamaldeído

O receptor de potencial transitório anquirina tipo 1 é um canal iônico envolvido nos processos nociceptivos e de sensibilização intermediados pelos estímulos térmicos, podendo ser ativado tanto por substâncias formadas em reações inflamatórias como por irritantes exógenos, a exemplo do cinamaldeído (PETRUS et al., 2007). Além disso, fornecem transdução de estímulos deletérios mediante sinalização elétrica nos terminais periféricos de vias aferentes, amplificando a transmissão para interneurônios espinhais até alcançarem as terminações centrais no corno dorsal da medula (KOIVISTO et al., 2014).

Há relatos também da sua participação, de maneira dependente da COX, para o desenvolvimento da inflamação aguda, indicando que seus antagonistas podem apresentar também propriedades anti-inflamatórias, além dos efeitos analgésicos previamente reconhecidos na dor inflamatória. Nessa perspectiva o antagonismo do TRPA1 revelou ser um

potencial alvo para a descoberta de novos agentes anti-inflamatórios (DA COSTA et al., 2010; MOILANEN et al., 2012), apresentando-se como uma alternativa aos inibidores da COX, que apesar de eficientes estão associados ao aparecimento de reações adversas, principalmente no TGI e nas funções renais (LUCAS et al., 2018).

Os dados exibidos na Figura 11 indicam que os grupos tratados com OEMr e OEMs tiveram tempo médio de lambida da pata iguais a  $10,17 \pm 2,2$  e  $10,5 \pm 3$  segundos. Tais valores correspondem a uma redução de 84,15 e 83,63%, respectivamente, quando comparados com os animais que receberam o veículo ( $64,17 \pm 6,57$  s). A indometacina na dose de  $20 \text{ mg.Kg}^{-1}$  inibiu o comportamento de lambar ou morder a pata em 64,67% (com tempo de  $22,67 \pm 1,7$  s) e a morfina, testada na dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  em 97,14%.



**Figura 11:** Efeito do OEMr e do OEMs no teste da nocicepção induzida pelo cinamaldeído. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).

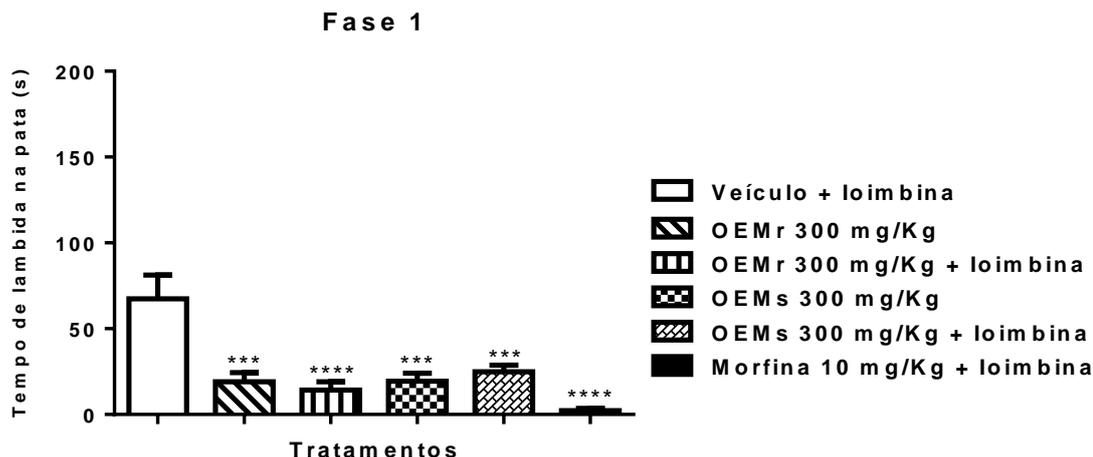
A análise estatística também revelou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com OEMr e OEMs quando comparados com aqueles que receberam indometacina ou morfina. Assim, os expressivos percentuais de inibição do tempo de lambida das patas favorecidos pela administração dos dois óleos essenciais permitem considerar a possibilidade de uma ação antagônica dos seus constituintes nos canais TRPA1 ou atribuir a atividade antinociceptiva ao envolvimento de vias centrais.

#### 4.3.3.3 Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos

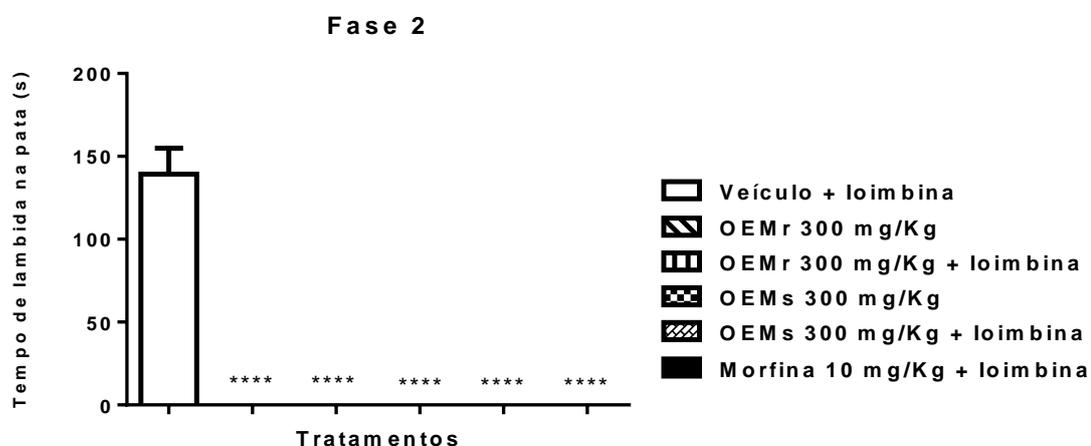
Esse teste foi realizado com o intuito de avaliar o possível envolvimento dos  $\alpha_2$ -adrenoreceptores na antinocicepção promovida pelo OEMr e o OEMs em experimentos realizados preliminarmente. Para tanto, a reversão do efeito analgésico foi obtida pela prévia administração da ioimbina, um potente e seletivo antagonista desses receptores (LALCHANDANI et al., 2002).

Sabe-se que durante a analgesia modulada pela via noradrenérgica, os receptores  $\alpha_2$  acoplados à proteína Gi provocam a inibição dos canais pré-sinápticos de  $Ca^{+2}$  localizados no corno dorsal da medula espinhal. A redução do influxo de íons cálcio por sua vez evita que neurotransmissores excitatórios como o glutamato sejam liberados das fibras aferentes primárias. Ao mesmo tempo, ocorre a abertura dos canais de  $K^+$  gerando hiperpolarização das membranas com consequente diminuição da excitabilidade das células pós-sinápticas. Nesse sentido, as propriedades analgésicas dos agonistas dos referidos receptores envolvem mecanismos periféricos e centrais e estão relacionados especialmente com a diminuição da dor neuropática (CHAN; CHEUNG; CHONG, 2010; KIMURA; SAITO; OBATA, 2012; OBATA, 2017).

Os resultados obtidos a partir da análise de variância (Figuras 12 e 13) indicaram que não houve diferença estatística significativa com relação ao tempo de lambida da pata, na fase 1 do teste da formalina, entre o grupo tratado com o OEMr ( $19,1 \pm 5,29$  s) e aquele que recebeu OEMr + Ioimbina ( $14,1 \pm 4,95$  s), tampouco quando o OEMs ( $19,33 \pm 4,79$  s) foi comparado ao grupo OEMs + Ioimbina ( $24,8 \pm 3,9$  s). Na fase 2 do teste de nocicepção espontânea induzida pela formalina, que reproduz a dor neuropática, isso ficou ainda mais evidente, pois a inibição do tempo de lambida da pata foi de 100% para todos os grupos (com ou sem pré-tratamento com ioimbina) em comparação ao grupo controle. Portanto, depreende-se que a analgesia promovida pelos óleos essenciais testados não apresenta envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos visto que a ioimbina não foi capaz de antagonizar seus efeitos, em ambas as fases do experimento.



**Figura 12:** Envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 1 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de ioimbina. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).



**Figura 13:** Envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 2 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de ioimbina. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).

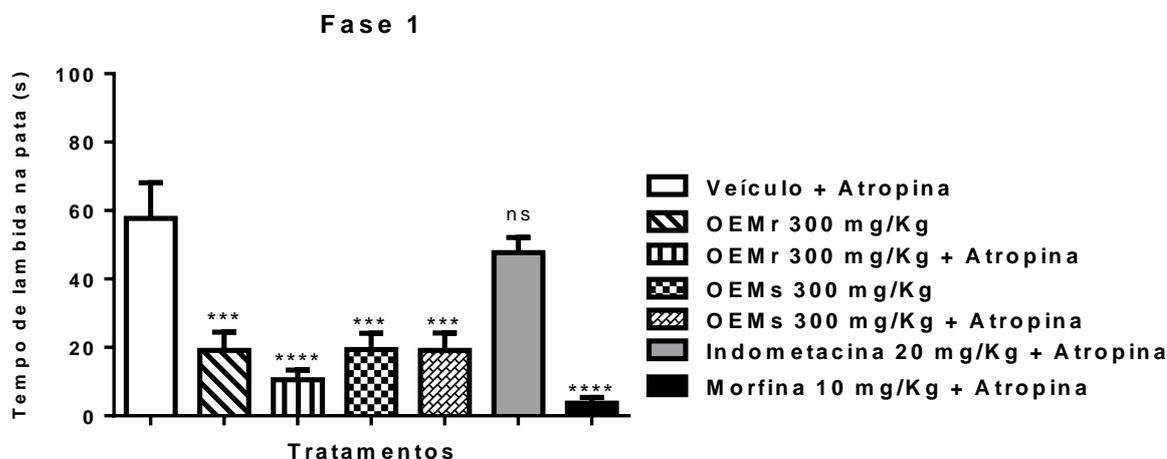
#### 4.3.3.4 Envolvimento dos receptores muscarínicos

Existem algumas evidências que indicam o envolvimento de inibidores da acetilcolinesterase, como a neostigmina e a fisostigmina, na modulação da dor. Injeções intra-articulares e intratecais desses fármacos foram atreladas à analgesia no modelo de dor articular em joelho de ratos (BUERKLE et al., 1998). De modo semelhante, constatou-se que essas substâncias atuam minimizando a sensação dolorosa em ambas as fases do teste da

formalina (TJOLSEN et al., 1992). Em contrapartida, o efeito antinociceptivo promovido pelos inibidores da AChE é revertido pelo pré-tratamento com atropina (YOON; YOO; JEONG, 2001; YOON; CHOI; JEONG, 2003).

Nesse sentido, a atropina (antagonista seletivo dos receptores muscarínicos) age nas terminações nervosas parassimpáticas inibindo a atividade da acetilcolina e, conseqüentemente, reduzindo o limiar da dor ao dificultar a antinocicepção induzida por agonistas colinérgicos (MOJTAHEDIN; TAMADDONFARD; ZANBOURI, 2009).

Diante das informações supracitadas e avaliando os resultados reunidos nas Figuras 14 e 15, nota-se que a atropina coadministrada com o OEMr e o OEMs não foi capaz de antagonizar a analgesia promovida pelos dois óleos essenciais no teste da formalina, nem na dor neurogênica (Fase 1) tampouco na inflamatória (Fase 2), indicando não haver qualquer relação do envolvimento dos receptores muscarínicos na atividade antinociceptiva observada.

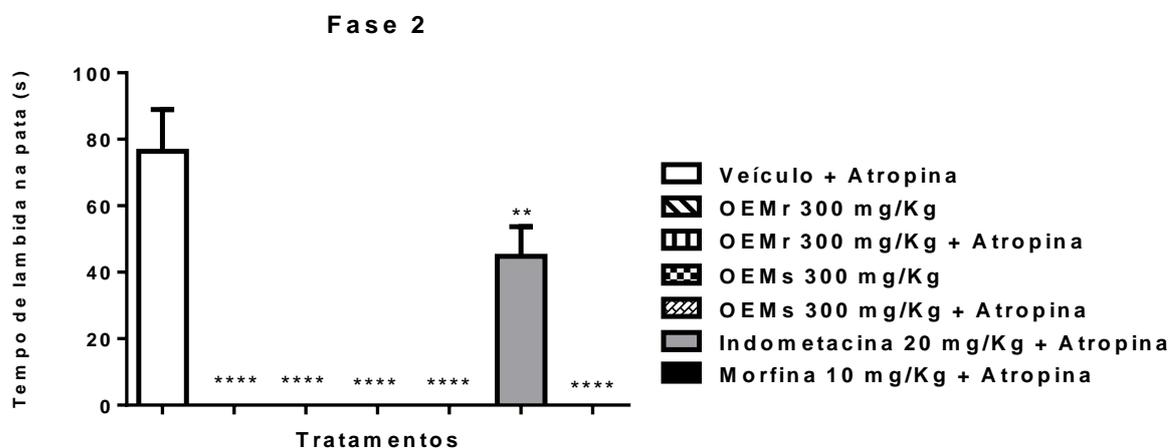


**Figura 14:** Envolvimento dos receptores colinérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 1 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de atropina. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. ns=não significativo; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).

Os resultados exibidos para o padrão indometacina estão em conformidade com o já relatado na literatura, desde a concepção do método, ou seja, inibidores da COX são eficazes para reduzir a resposta dolorosa na segunda fase do teste da formalina, embora não tenham efeito, ou apresentem efeito reduzido na primeira fase (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Na fase 2, o OEMr e o OEMs assim como a morfina foram capazes de inibir em 100% o tempo de lambida das patas injetadas com formalina, sugerindo que a atividade

antinociceptiva dos constituintes químicos de ambos os óleos essenciais nas fases neurogênica e inflamatória se deva a uma ação central, o que pode ser comprovado, subsequentemente, pela coadministração destes com um antagonista de receptores  $\mu$ -opioides.



**Figura 15:** Envolvimento dos receptores colinérgicos na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs na fase 2 do teste de nocicepção induzida pela formalina com prévia administração de atropina. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (ANOVA seguido de Dunnett,  $n=6$  por grupo).

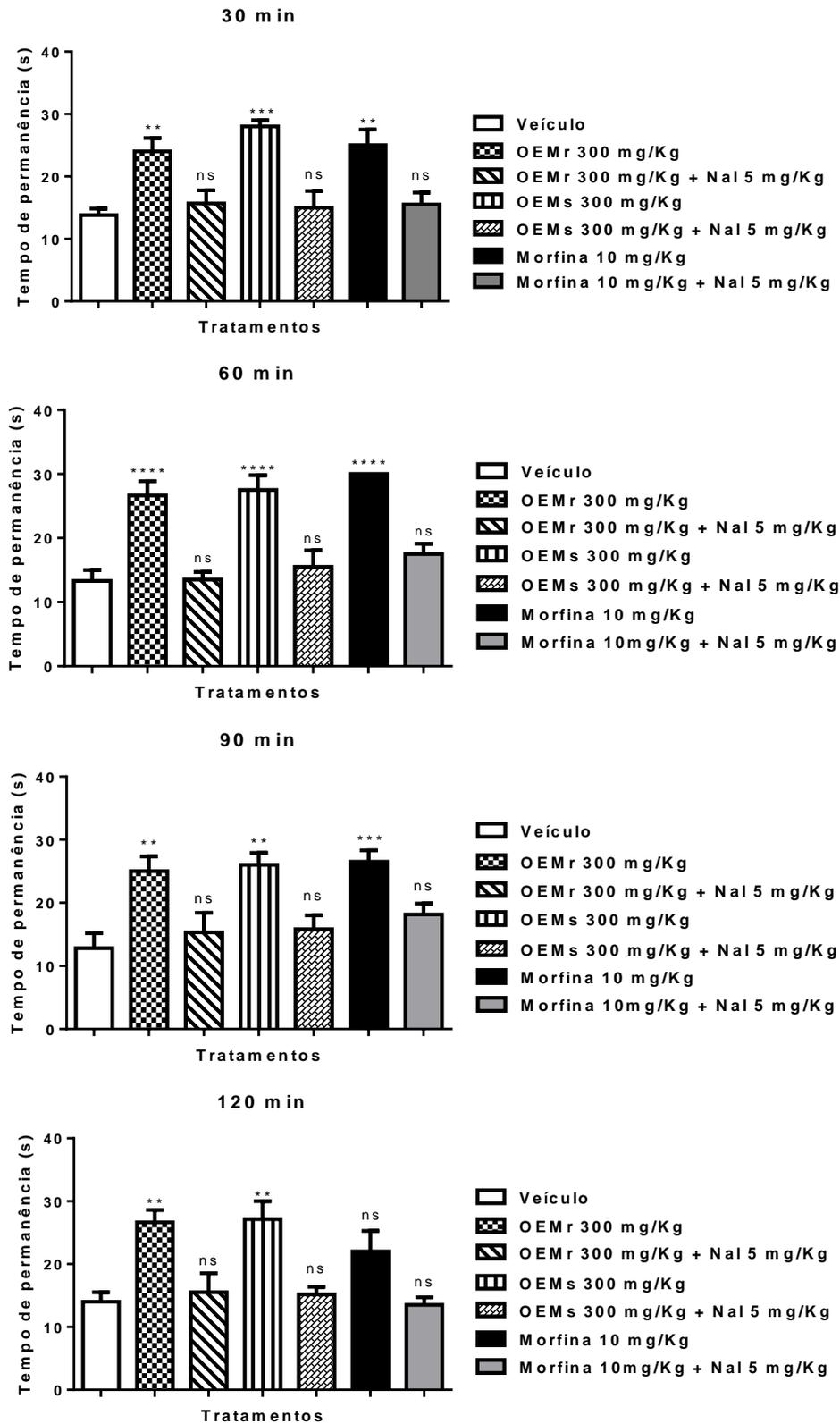
#### 4.3.3.5 Envolvimento do sistema opioide

Por intermédio do teste da placa quente é possível identificar substâncias capazes de alterar o limiar nociceptivo, distinguindo aquelas que aumentam a latência dos animais (analgesia) das que diminuem (hiperalgesia). Medicamentos anti-inflamatórios que atuam minimizando a dor, incluindo o AAS, o paracetamol e o ibuprofeno, são menos ativos nesse experimento do que os analgésicos opioides (WILLIAMS; PORSOLT, 2007). Assim, constituintes químicos que apresentem ação antinociceptiva no referido modelo têm ampla possibilidade de atuar no SNC, sendo os antagonistas opioides, a exemplo da naloxona, coadministrados com a finalidade de ratificação dos efeitos espinhais e supra-espinhais.

Analisando os dados exibidos na Figura 16, p. 131, é notória a ação central do OEMr e do OEMs testados, a qual foi antagonizada nos grupos tratados previamente com a naloxona na dose de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Óleos essenciais de outras espécies de *Myrcia* s.l. que tiveram sua atividade antinociceptiva investigada, ou não foram testados na placa quente (SANTOS et al.,

2014) ou não foram capazes de minimizar a sensação dolorosa para esse modelo (ANDRADE et al., 2012).

Nota-se portanto a importância do uso de diferentes modelos durante a investigação preliminar de novos agentes analgésicos, para que diversos estímulos (químicos, físicos ou térmicos), assim como a intensidade e duração sejam avaliados com o intuito de obter dados mais abrangentes a respeito das propriedades antinociceptivas de uma substância. Tal conduta também é válida para evitar resultados falsos positivos, principalmente, por erros de interpretação do comportamento animal.



**Figura 16:** Envolvimento do mecanismo opioide no teste da placa quente. Tempo de latência avaliado aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração das substâncias. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m e comparados com o grupo controle. ns = não significativo. (ANOVA seguido de Dunnett, n=6 por grupo).

#### 4.4 Conclusão

A análise multivariada realizada por PCA e HCA com o OEMr e o OEMs demonstraram que *Myrcia rostrata* e *Myrcia splendens* formam dois grupos quimicamente distintos, entretanto os resultados aqui apresentados não são suficientes para refutar os estudos filogenéticos que levaram à sinonização de *M. rostrata* como *M. splendens*. Assim como não seria prudente conjecturar que se tratam de quimiotipos sem que um estudo mais detalhado fosse executado, a exemplo da avaliação dos óleos essenciais obtidos de plantas de diferentes localidades e coletadas em diversas épocas do ano. Os óleos essenciais demonstraram uma expressiva atividade anti-inflamatória, todavia, como a inflamação é um processo complexo, com envolvimento de uma variedade de mediadores e diferentes vias é de extrema importância verificar, *a posteriori*, seu mecanismo de ação. Em se tratando da investigação farmacodinâmica na analgesia promovida pelo OEMr e o OEMs foi possível comprovar a ação central de ambos os óleos essenciais, visto que a atividade antinociceptiva foi revertida pela prévia administração de um antagonista de receptores opioides. Dessa forma, as espécies de *Myrcia* estudadas demonstraram ser uma fonte promissora de compostos com potencial para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios e analgésicos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012, 133, 2, 189–204.

ANDRADE, G. S.; SANTANA, M. T.; SIQUEIRA, R. S.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. de S.; SOBRAL, M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012, 22, 181–188.

ANKIER, S. I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *European Journal of Pharmacology*. 1974, 27, 1, 1–4.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem.* 2011, 40, 4, 43101.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research*. 2002, 924, 2, 219–228.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Research*. 2003, 969, 110–116.

BONNET, C. S.; WILLIAMS, A. S.; GILBERT, S. J.; HARVEY, A. K.; EVANS, B. A.; MASON, D. J. AMPA/kainate glutamate receptors contribute to inflammation, degeneration and pain related behaviour in inflammatory stages of arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015, 74, 242–251.

BROCK, S. C.; TONUSSI, C. R. Intrathecally Injected Morphine Inhibits Inflammatory Paw Edema: The Involvement of Nitric Oxide and Cyclic-Guanosine Monophosphate. *Anesthesia & Analgesia*. 2008, 106, 3, 965–971.

BUERKLE, H.; BOSCHIN, M.; MARCUS, M. A. E.; BRODNER, G.; WUSTEN, R.; VAN AKEN, H. Central and peripheral analgesia mediated by the acetylcholinesterase inhibitor neostigmine in the rat in ammed knee joint model. *Anaesth Analg*. 1998, 86, 1027–1032.

CABRINI, D. A.; MORESCO, H. H.; IMAZU, P.; SILVA, C. D.; PIETROVSKI, E. F. Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2010, 2011, 1–7.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research*. 2000, 14, 6, 401–418.

CHAN, A. K. M.; CHEUNG, C. W.; CHONG, Y. K. Alpha-2 agonists in acute pain management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2010, 11, 17, 2849–2868.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; STZER, W. N. The Leaf Oil Composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2013, 11, 1, 41–44.

CORDOVA, M. M.; WERNER, M. F. de P.; SILVA, M. D. da; RUANI, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. *Neuroscience Letters*. 2011, 495, 3, 173–177.

DA COSTA, D. S.; MEOTTI, F. C.; ANDRADE, E. L.; LEAL, P. C.; MOTTA, E. M.; CALIXTO, J. B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 2010, 148, 431–437.

DE SOUZA, M. M.; PEREIRA, M. A.; ARDENGHI, J. V.; MORA, T. C.; BRESCIANI, L. F.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2009, 93, 1, 40–46.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules*. 2011, 16, 3, 2233–2252.

DOS SANTOS, G. C. M.; GOMES, G. A.; GONÇALVES, G. M.; de SOUSA, L. M.; SANTIAGO, G. M. P.; DE CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Essential oil from *Myrcia ovata*: chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. *Planta Med*. 2014, 80, 1588–1596.

DU, J.; KOLTZENBURG, M.; CARLTON, S. M. Glutamate-induced excitation and sensitization of nociceptors in rat glabrous skin. *Pain*. 2001, 89, 2, 187–198.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977, 4, 161–174. PMID:564014

DUTTA, S.; DAS, S. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. *Pharmacognosy Research*. 2010, 2, 5, 313–318.

DZOYEM, J. P.; MCGAW, L. J.; KUETE, V.; BAKOWSKY, U. *Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*, Chapter 9, 239–270 *In: Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 2017. Academic Press.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1953, 107, 385–393.

FERNANDES, E. S.; RUSSELL, F. A.; SPINA, D.; MCDOUGALL, J.J.; GRAEPEL, R.; GENTRY, C.; STANILAND, A. A.; MOUNTFORD, D. M.; KEEBLE, J. E.; MALCANGIO, M.; BEVAN, S.; BRAIN, S. D. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2011, 63, 819–829.

FERRAUDO, A. S. *Técnicas de Análise Multivariada*. Universidade Estadual Paulista (UNESP): Jaboticabal, São Paulo, 2009.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *J Pain*. 2001, 2, 1, 2–11.

GANGWAR, M.; GAUTAM, M. K.; GHILDIYAL, S.; NATH, G.; GOEL, R. K. Pharmacological evaluation of *Mallotus philippinensis* (Lam.) Muell.Arg. fruit hair extract for anti-inflammatory, analgesic and hypnotic activity. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2015, 5, 14-21.

GHELARDINI, C.; MALMBERG-AIELLO, P.; GIOTTI, A.; MALCANGIO, M.; BARTOLINI, A. Investigation into atropine-induced antinociception. *Br. J. Pharmacol*. 1990, 101, 49-54.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987, 30, 1, 103–114.

HUSSAIN, L.; MUHAMMAD, S. H. A.; NOOR-UL, A.; KANWAL, R.; MUHAMMAD, I. The Analgesic, Anti-Inflammatory and Anti-Pyretic Activities of *Tinospora cordifolia*. *Adv Clin Exp Med*. 2015, 24, 6, 957–964.

JIMÉNEZ, Dilma; ARAQUE, María; ROJAS, Luis; CORDERO, Atilio; BRICEÑO, Benito. Volatile components and antibacterial activity from *Myrcia splendens* (Sw.) DC. shoots. *Rev Fac Farm*. 2012, 54, 7–11.

JOHN, N. A. A.; SHOBANA, G. Anti-inflammatory activity of *Talinum fruticosum* L. on formalin induced paw edema in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012, 2, 1, 123–127.

KASAHARA, Y.; HIKINO, H.; TSURUFUJI, S.; WATANABE, M.; OHUCHI, K. Anti-inflammatory Actions of Ephedrines in Acute Inflammations. *Planta Medica*. 1985, 51, 4, 325–331.

KIMURA, M.; SAITO, S.; OBATA, H. Dexmedetomidine decreases hyperalgesia in neuropathic pain by increasing acetylcholine in the spinal cord. *Neurosci. Lett*. 2012, 529, 70–74.

KOIVISTO, A.; CHAPAMAN, H.; JALAVA, N.; KORJAMO, T.; SAARNILEHTO, M.; LINDSTEDT, K.; PERTOVAARA, A. TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014, 114, 1, 50-55.

- LALCHANDANI, S. G.; LEI, L.; ZHENG, W.; SUNI, M. M.; MOORE, B. M.; LIGGETT, S. B.; MILLER, D. D.; FELLER, D. R. Yohimbine Dimers Exhibiting Selectivity for the Human  $\alpha$ 2c-Adrenoceptor Subtype. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, 303, 3, 979–984.
- LAM, F. F.; NG, E. S. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *Br J Pharmacol*. 2010, 159, 958–69.
- LIMA, D. F.; DOS SANTOS, L. L., GOLDENBERG, R.; LUCAS, E. J. New species of *Myrcia* sect. *Aulomyrcia* and notes on *Myrcia pinifolia* (Myrtaceae). *Phytotaxa*. 2017, 312, 94–102.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from *Myrcia* species native to Rio Grande do Sul. *Quím. Nova*. 2004, 27, 6, 916–919.
- LUCAS, E. J.; MATSUMOTO, K.; HARRIS, S. A.; NIC LUGHADHA, E. M.; BERNADINI, B.; CHASE, M. W. Phylogenetics, Morphology, and Evolution of the Large Genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). *International Journal of Plant Sciences*. 2011, 172, 915–934.
- LUCAS, Eve J.; WILSON, Christine Elizabeth.; LIMA, Duane F.; SOBRAL, Marcos; MATSUMOTO, Kazue. A Conspectus of *Myrcia* sect. *Aulomyrcia* (Myrtaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard*. 2016, 101, 648–698.
- LUCAS, G. N. C.; LEITÃO, A. C. C.; ALENCAR, R. L.; XAVIER, R. M. F.; DAHER, E. de F.; JUNIOR, G. B. da S. Aspectos fisiopatológicos da nefropatia por anti-inflamatórios não esteroidais. *J. Bras. Nefrol*. 2018, 1–7.
- MARQUES, F. M.; FIGUEIRA, M. M.; SCHMITT, E. F. P.; KONDRATYUK, T. P.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Inflammopharmacology*. 2018.
- MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104, 33, 13525–13530.
- MILLER, K. E.; HOFFMAN, E.M.; SUTHARSHAN, M.; SCHECHTER, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2011, 130, 3, 283–309.
- MOILANEN, L. J.; LAAVOLA, M.; KUKKONEN, M.; KORHONEN, R.; LEPPÄNEN, T.; HÖGESTÄTT, E. D.; MOILANEN, E. TRPA1 Contributes to the Acute Inflammatory Response and Mediates Carrageenan-Induced Paw Edema in the Mouse. *Scientific Reports*, 2012, 380, 1, 2–6.
- MOJTAHEDIN, A.; TAMADDONFARD, E.; ZANBOURI, A. Role of central muscarinic cholinergic receptors in the formalin-induced pain in rats. *Indian J Pharmacol*. 2009, 41, 3, 144–147.

- NAKAMURA, M. J.; MONTEIRO, S. S.; BIZARRI, C. H. B.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochem. Syst. Ecol.* 2010, 38, 1170–1175.
- OBATA, H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017, 18, 11, 2483–2495.
- PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European Journal of Pharmacology.* 2003, 460, 1, 37–41.
- PETRUS, M.; PEIER, A. M.; BANDELL, M.; HWANG, S. W.; HUTNH, T.; OLNEY, N.; JEGLA, T.; PATAPOUTIAN, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol. Pain.* 2007, 3, 40.
- PITCHER, G.; HENRY, J. Mediation and modulation by eicosanoids of responses of spinal dorsal horn neurons to glutamate and substance P receptor agonists: results with indomethacin in the rat *in vivo*. *Neuroscience.* 1999, 93, 3, 1109–1121.
- PONTES, F. C.; ABDALLA, V. C. P.; IMATOMI, M.; FUENTES, L. F. G.; GUALTIERI, S. C. J. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Braz. J. Biol.* 2018.
- SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules.* 2013, 18, 1227–1254.
- SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DOS REIS, R. B. de O.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules.* 2014, 19, 1459–1480.
- SÁ, R. de C. da S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Nat. Prod. Commun.* 2015, 10, 1767–1774.
- SABINO, J. F. P.; REYES, M. M.; BARRERA, C. D. F. Analysis and discrimination of the chemotypes of *Lippia graveolens* H.B.K. of Guatemala by solid phase microextraction, GC-MS and multivariate analysis. *Quím. Nova.* 2012, 35, 1, 97–101.
- SANTOS, P. A. G.; BARROSO, J. G.; FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; SALGUEIRO, L. R.; FONTINHA, S. S.; DEANS, S. G.; SCHEFFER, J. J. C. Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespitius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science.* 2005, 169, 6, 1112–1117.
- SCALVENZI, Laura; GRANDINI, Alessandro; SPAGNOLETTI, Antonella; TACCHINI, Massimo; NEILL, David; BALLESTEROS, José Luis; SACCHETTI, Gianni; GUERRINI, Alessandra. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) Essential oil from Amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules* 2017, 22, 1163–1175.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology*. 2002, 43, 3, 340–347.

SIEBEL, J. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Research*. 2004, 1003, 1-2, 61–67.

SILVA, A. do N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESI, A. M.; *Nat. Prod. Commun.* 2013, 8, 269–271.

SILVA, A. do N.; BOMFIM, H. F.; MAGALHÃES, A. O.; ROCHA, M. L. da; LUCCHESI, A. M. Composição química e atividade antinociceptiva em modelo animal do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE). *Quim Nova*. 2018, 41, 9, 982–988.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINI, F.; LUCAS, E. 2015 *Myrtaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2019.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. *Chem. Biodivers.* 2011, 8, 73–94.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992, 51, 1, 5–17.

WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES (WCSP). 2019. (MYRTACEAE). Facilitado por The Royal Botanic Gardens, Kew. < <http://wcsp.science.kew.org/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

WILLIAMS, Michael; PORSOLT, Roger D. The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007, p. 1-13. In: CASTAGNÉ, Vincent; HERNIER, Anne Marie; PORSOLT, R.D. CNS Safety Pharmacology. Elsevier, 2014.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Experimental Biology and Medicine*. 1962, 111, 3, 544–547.

YOON, M. H.; YOO, K. Y.; JEONG, C. Y. Synergistic effects between intrathecal clonidine and neostigmine in the formalin test. *J Korean Med Sci*. 2001, 16, 498–504.

YOON, M.H.; CHOI, J.I.; JEONG, S. W. Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003, 47, 1079–1084.

## CONCLUSÃO GERAL

A presente pesquisa comprovou o potencial das mirtáceas para a descoberta de compostos bioativos com ações antinociceptiva e anti-inflamatória além de confirmar a escassez de trabalhos envolvendo os óleos essenciais de suas espécies. Mais especificamente sobre *Myrcia rostrata* DC. e *Myrcia splendens* (Sw.) DC. a análise da composição química revelou a predominância de sesquiterpenos, amplamente relatada para a maioria das espécies dessa família. Os constituintes químicos presentes não demonstraram sinais de toxicidade de acordo com o preconizado pela OECD, nem ação depressora no SNC, uma vez que não houve redução na coordenação motora dos animais. Os resultados obtidos nos testes farmacológicos evidenciaram a proeminente propriedade tanto antinociceptiva quanto anti-inflamatória dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais, sendo esclarecido somente o mecanismo de ação pelo qual a analgesia é promovida. Levando em consideração que os óleos essenciais são uma mistura complexa de constituintes químicos, e que estes podem sofrer alterações quantitativas e qualitativas influenciadas pela sazonalidade e pela própria interação das plantas produtoras com o ambiente, é de extrema importância o ulterior isolamento seguido da investigação farmacológica dos sesquiterpenos identificados nas referidas espécies de *Myrcia*. Destarte, o presente trabalho contribuiu para confirmar que as mirtáceas são uma rica fonte de metabólitos secundários bioativos os quais, futuramente, poderão ser utilizados como fitoterápicos ou como adjuvantes de medicamentos já disponíveis no mercado para o tratamento da dor e da inflamação.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A – DADOS DO TESTE *ROTA ROD* PARA O OEMr (TEMPO DE PERMANÊNCIA NA BARRA GIRATÓRIA MEDIDO EM SEGUNDOS)**

<b>30 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	180	180	180	150	36
<b>2</b>	164	152	67	180	16
<b>3</b>	180	180	170	180	17
<b>4</b>	180	180	180	180	20
<b>5</b>	180	180	180	180	48
<b>6</b>	180	180	180	161	20
<b>7</b>	180	180	180	180	36
<b>8</b>	180	180	180	180	20

<b>60 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	180	154	180	180	37
<b>2</b>	180	180	180	180	66
<b>3</b>	180	180	175	180	13
<b>4</b>	180	180	180	180	29
<b>5</b>	180	180	180	180	59
<b>6</b>	180	180	180	180	31
<b>7</b>	180	180	180	180	89
<b>8</b>	180	180	180	180	50

<b>120 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	180	180	180	180	46
<b>2</b>	180	180	180	180	100
<b>3</b>	63	180	180	180	56
<b>4</b>	180	180	180	180	50
<b>5</b>	180	180	180	180	57
<b>6</b>	180	180	82	180	61
<b>7</b>	180	180	180	180	73
<b>8</b>	180	180	119	180	126

**APÊNDICE B – DADOS DO TESTE DA TOXICIDADE ORAL AGUDA PARA O  
OEMr (MASSA DOS ANIMAIS MEDIDA EM GRAMAS)**

<b>Dia 1</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	25	26	25	25	24,6
<b>2</b>	21,7	21	23	24,6	23,5
<b>3</b>	26,6	26	21	22,7	23
<b>4</b>	24,8	22	23	24	22
<b>5</b>	23,8	26	24	25	24
<b>6</b>	20,7	21	23	22	23

<b>Dia 7</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	28	29	26	22	22
<b>2</b>	23	22	25	24,8	25
<b>3</b>	30	26	20	23,6	24
<b>4</b>	28	22	24	27	22
<b>5</b>	26	26	26	26	22
<b>6</b>	23	21	20	21	25

<b>Dia 14</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	31,62	33,02	26,54	21,87	22,1
<b>2</b>	22,11	22,43	25,63	26,11	27,98
<b>3</b>	33,65	27,05	21,24	26,89	26,58
<b>4</b>	28,65	24,31	25,09	31,46	23,1
<b>5</b>	27,53	26,97	28,05	28,25	21,69
<b>6</b>	25,52	22,36	20	19,9	25,65

**APÊNDICE C – DADOS DO TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS  
INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO PARA O OEMr (NÚMERO DE  
CONTORÇÕES EM 15 MIN)**

<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>
1	46	4	4	1	0
2	34	9	0	7	0
3	28	11	4	3	0
4	12	1	0	0	0
5	21	1	4	0	7
6	22	10	0	2	4
7	26	16	1	0	0
8	34	3	1	0	2

**APÊNDICE D – DADOS DO TESTE DA FORMALINA PARA O OEMr (TEMPO DE LAMBIDA DA PATA EM SEGUNDOS)**

<b>Fase 1</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>
1	42	40	16	40	51
2	70	43	52	14	42
3	43	53	37	55	23
4	71	37	22	13	44
5	35	30	42	12	15
6	30	28	16	2	17
7	59	29	20	30	12
8	97	32	10	60	31

<b>Fase 2</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>
1	27	16	7	20	8
2	155	35	49	0	39
3	38	13	0	18	31
4	37	13	0	0	0
5	29	0	22	0	6
6	44	47	0	0	5
7	80	0	0	0	17
8	108	21	0	0	61

**APÊNDICE E – DADOS DO TESTE DA PLACA QUENTE PARA O OEMr (TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLACA EM SEGUNDOS)**

<b>30 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	13	18	30	17	30
2	8	12	14	30	16
3	16	20	15	24	25
4	10	30	17	23	30
5	13	14	24	30	30
6	5	12	27	30	30
7	12	24	30	20	19
8	11	20	30	30	30
<b>60 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	12	19	30	30	30
2	8	10	22	29	16
3	20	17	19	29	20
4	16	14	13	16	30
5	20	15	28	30	30
6	12	30	21	26	30
7	12	30	30	24	28
8	14	12	19	30	30
<b>90 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	13	18	30	17	30
2	8	12	14	30	16
3	16	20	15	24	25
4	10	30	17	23	30
5	13	14	24	30	30
6	5	12	27	30	30
7	12	24	30	20	19
8	11	20	30	30	30
<b>120 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	16	9	14	30	30
2	11	13	23	29	30
3	11	30	14	30	10
4	15	21	21	21	30
5	15	17	13	30	9
6	11	12	30	30	30
7	20	25	23	12	13
8	14	24	24	30	30
<b>240 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	20	30	22	18	30
2	13	25	30	30	20
3	20	12	17	26	8
4	19	30	30	29	26
5	19	16	9	30	18
6	13	20	24	18	28
7	11	16	30	10	27
8	16	11	14	18	30

**APÊNDICE F – DADOS DO TESTE *ROTA ROD* PARA O OEMs (TEMPO DE PERMANÊNCIA NA BARRA GIRATÓRIA MEDIDO EM SEGUNDOS)**

<b>30 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	153	92	98	153	1
<b>2</b>	153	180	180	180	3
<b>3</b>	180	180	180	180	20
<b>4</b>	180	180	180	180	11
<b>5</b>	119	92	153	180	41
<b>6</b>	180	78	180	180	1

<b>60 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	180	180	98	153	73
<b>2</b>	180	180	180	180	1
<b>3</b>	180	180	175	180	53
<b>4</b>	180	180	180	180	11
<b>5</b>	180	180	153	180	41
<b>6</b>	180	180	180	180	20

<b>120 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Diazepam 4 mg/Kg</b>
<b>1</b>	180	180	180	180	76
<b>2</b>	180	180	180	180	58
<b>3</b>	180	180	180	180	91
<b>4</b>	180	180	180	180	60
<b>5</b>	180	180	180	180	93
<b>6</b>	180	180	180	180	100

**APÊNDICE G – DADOS DO TESTE DA TOXICIDADE ORAL AGUDA PARA O  
OEMs (MASSA DOS ANIMAIS MEDIDA EM GRAMAS)**

<b>Dia 1</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	39	33,5	30,1	34,3	30,7
<b>2</b>	34	31,6	35,5	30,3	30
<b>3</b>	28,8	32,1	34,1	32,1	35,2
<b>4</b>	33,4	34,6	33,5	30,2	33,7
<b>5</b>	23,8	33	32,6	29,8	26
<b>6</b>	39,2	30,9	36,9	34,7	35,5

<b>Dia 7</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	39,3	30,6	32,4	29,98	31,5
<b>2</b>	38,05	29,9	36,4	32,8	32,4
<b>3</b>	31,22	33,6	33,4	27,92	37,7
<b>4</b>	33,4	34,3	34,4	32,1	33,63
<b>5</b>	25,2	34,7	39,7	29,03	29,06
<b>6</b>	43,5	34,2	29,7	30,8	35,6

<b>Dia 14</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>500 mg/Kg</b>	<b>1000 mg/Kg</b>	<b>2000 mg/Kg</b>
<b>1</b>	40,1	30,7	34,3	29,75	33,37
<b>2</b>	39	27,6	38,93	35,65	33,92
<b>3</b>	34,6	35	35,7	30,3	39,05
<b>4</b>	34,4	33,1	36,56	35,36	34,04
<b>5</b>	27	35,7	42,44	31,48	30,53
<b>6</b>	44,9	38,06	31,55	31,96	36,02

**APÊNDICE H – DADOS DO TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS  
INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO PARA O OEMs (NÚMERO DE  
CONTORÇÕES EM 15 MIN)**

<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	56	16	1	0	1	0
2	56	32	14	0	0	3
3	51	28	2	0	8	0
4	54	14	8	0	30	0
5	47	26	0	0	7	0
6	65	14	3	0	4	0
7	48	11	12	0	0	0
8	40	32	0	0	0	0

**APÊNDICE I – DADOS DO TESTE DA FORMALINA PARA O OEMs (TEMPO DE LAMBIDA DA PATA EM SEGUNDOS)**

<b>Fase 1</b>						
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	161	54	41	20	15	20
2	124	72	61	15	63	6
3	47	53	24	11	17	21
4	48	60	45	1	31	8
5	51	53	82	8	52	0
6	71	48	52	8	48	2
7	59	43	78	41	17	0
8	97	73	53	21	31	0

<b>Fase 2</b>						
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	165	107	12	0	8	28
2	305	68	1	0	4	0
3	107	82	1	0	46	0
4	105	99	0	0	0	0
5	99	82	67	0	0	0
6	120	2	36	0	5	0
7	80	119	5	0	17	0
8	108	43	10	0	61	0

**APÊNDICE J – DADOS DO TESTE DA PLACA QUENTE PARA O OEMs (TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLACA EM SEGUNDOS)**

<b>30 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	13	13	20	28	30
2	19	12	14	26	30
3	18	30	20	30	30
4	14	12	21	30	30
5	15	20	17	24	30
6	15	18	15	30	30
7	9	16	14	30	30
8	11	12	18	30	30
<b>60 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	16	23	15	30	30
2	16	30	14	29	30
3	8	11	20	18	30
4	14	12	28	30	30
5	18	14	30	16	30
6	13	14	28	30	30
7	6	11	23	30	30
8	12	20	27	15	30
<b>90 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	15	30	20	30	19
2	12	15	14	30	30
3	11	24	27	30	30
4	22	9	26	30	30
5	23	19	30	30	30
6	8	21	17	23	26
7	19	13	26	30	30
8	16	17	16	24	24
<b>120 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	22	29	19	30	29
2	14	16	14	30	30
3	11	30	12	30	30
4	18	22	26	27	26
5	23	24	30	30	30
6	18	29	15	18	30
7	14	15	28	30	30
8	16	18	30	30	30
<b>180 min após a administração das substâncias</b>					
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>75 mg/Kg</b>	<b>150 mg/Kg</b>	<b>300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>
1	17	20	30	13	11
2	22	16	23	30	27
3	23	30	23	13	30
4	18	26	19	30	17
5	15	24	30	30	30
6	24	18	25	30	17
7	15	30	28	12	30
8	20	28	15	30	30

**APÊNDICE K – DADOS DO TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR  
GLUTAMATO PARA O OEMr E O OEMs (TEMPO DE LAMBIDA DA PATA EM  
SEGUNDOS)**

<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 g/Kg</b>
1	94	2	40	2	46
2	164	3	0	1	65
3	127	23	28	3	60
4	92	0	19	10	92
5	102	0	0	3	77
6	80	2	10	4	50
7	82	0	40	0	93
8	193	0	0	0	106
9	126	0	0	0	133
10	160	0	0	0	78
11	157	0	0	0	123
12	143	0	0	0	100

**APÊNDICE L – DADOS DO TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR  
CINAMALDEÍDO PARA O OEM<sub>r</sub> E O OEM<sub>s</sub> (TEMPO DE LAMBIDA DA PATA EM  
SEGUNDOS)**

<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEM<sub>r</sub> 300 mg/Kg</b>	<b>OEM<sub>s</sub> 300 mg/Kg</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg</b>	<b>Indometacina 20 g/Kg</b>
1	81	6	17	0	24
2	86	19	6	0	25
3	59	13	5	11	20
4	46	3	15	0	21
5	62	11	19	0	29
6	51	9	1	0	17

**APÊNDICE M – DADOS DO TESTE DE AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS  
RECEPTORES  $\alpha_2$ -ADRENÉRGICOS PARA O OEMr E O OEMs (TEMPO DE  
LAMBIDA DA PATA EM SEGUNDOS)**

<b>Fase 1</b>						
<b>Animais</b>	<b>Veículo + Ioimbina</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg + Ioimbina</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg + Ioimbina</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg + Ioimbina</b>
1	51	14	30	20	41	0
2	75	13	4	15	24	5
3	101	12	18	11	14	7
4	111	40	26	8	29	2
5	25	30	4	41	17	0
6	41	6	3	21	24	0

<b>Fase 2</b>						
<b>Animais</b>	<b>Veículo + Ioimbina</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg + Ioimbina</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg + Ioimbina</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg + Ioimbina</b>
1	51	14	30	20	41	0
2	75	13	4	15	24	5
3	101	12	18	11	14	7
4	111	40	26	8	29	2
5	25	30	4	41	17	0
6	41	6	3	21	24	0

**APÊNDICE N – DADOS DO TESTE DE AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS PARA O  
OEMr E O OEMs (TEMPO DE LAMBIDA DA PATA EM SEGUNDOS)**

**Fase 1**

<b>Animais</b>	<b>Veículo + Atropina</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg + Atropina</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg + Atropina</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg + Atropina</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg + Atropina</b>
1	73	14	5	20	28	40	0
2	95	13	6	15	6	53	5
3	60	12	11	11	14	67	9
4	23	40	24	8	5	38	8
5	37	30	8	41	29	46	0
6	58	6	9	21	33	42	0

**Fase 2**

<b>Animais</b>	<b>Veículo + Atropina</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg</b>	<b>OEMr 300 mg/Kg + Atropina</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg</b>	<b>OEMs 300 mg/Kg + Atropina</b>	<b>Indometacina 20 mg/Kg + Atropina</b>	<b>Morfina 10 mg/Kg + Atropina</b>
1	107	0	0	0	0	31	0
2	68	0	0	0	0	66	0
3	82	0	0	0	0	60	0
4	99	0	0	0	0	26	0
5	82	0	0	0	0	19	0
6	20	0	0	0	0	67	0

**APÊNDICE O – DADOS DO TESTE DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIOIDE (TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLACA QUENTE EM SEGUNDOS)**

<b>30 min</b>							
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEMr</b>	<b>OEMr + Naloxona</b>	<b>OEMs</b>	<b>OEMs + Naloxona</b>	<b>Morfina</b>	<b>Morfina + Naloxona</b>
1	13	17	13	28	15	30	11
2	11	30	12	26	23	25	19
3	18	24	15	30	20	19	19
4	14	23	14	24	4	30	10
5	12	30	14	30	13	16	13
6	15	20	26	30	15	30	21
<b>60 min</b>							
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEMr</b>	<b>OEMr + Naloxona</b>	<b>OEMs</b>	<b>OEMs + Naloxona</b>	<b>Morfina</b>	<b>Morfina + Naloxona</b>
1	12	30	15	30	9	30	23
2	8	29	11	29	9	30	17
3	20	29	9	30	22	30	20
4	16	16	17	16	14	30	13
5	12	30	14	30	15	30	13
6	12	26	15	30	24	30	19
<b>90 min</b>							
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEMr</b>	<b>OEMr + Naloxona</b>	<b>OEMs</b>	<b>OEMs + Naloxona</b>	<b>Morfina</b>	<b>Morfina + Naloxona</b>
1	19	20	10	19	7	19	23
2	9	29	10	30	17	30	14
3	20	29	16	30	22	30	22
4	14	16	13	23	13	26	17
5	9	30	13	24	20	30	13
6	6	26	30	30	16	24	20
<b>120 min</b>							
<b>Animais</b>	<b>Veículo</b>	<b>OEMr</b>	<b>OEMr + Naloxona</b>	<b>OEMs</b>	<b>OEMs + Naloxona</b>	<b>Morfina</b>	<b>Morfina + Naloxona</b>
1	16	21	14	13	15	11	8
2	11	30	15	30	12	27	15
3	20	29	9	30	16	30	15
4	15	20	14	30	16	17	16
5	11	30	11	30	20	30	12
6	11	30	30	30	12	17	15

**ANEXOS**

**ANEXO A – PROTOCOLO DE AUTORIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*  
EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UEFS)**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Ofício Nº: 24/2017

Feira de Santana, 16 de agosto de 2017.

Da: Professora Iraci Gomes Bonfim  
CEUA/UEFS

PARA: Dr<sup>a</sup> Angélica Maria Lucchesi  
Coordenadora do Projeto

Prezado Professor Coordenador,

Informamos que o projeto: “**Prospecção de ativos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória em espécies de Myrcia DC (MYRTACEAE)**”, registrado nessa comissão sob o número 008/2016, de vossa autoria, foi apreciado e após análise concluiu-se que o mesmo é coerente e os procedimentos com os animais se mostram adequados aos objetivos do projeto e às questões éticas, motivo pelo qual foi de **PARECER FAVORÁVEL** a sua execução, conforme cronograma.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading 'Iraci Gomes Bonfim', is positioned above the typed name.

Prof. Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEFS

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO DE PESQUISA



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A3D4910**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	<b>A3D4910</b>
Usuário:	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA</b>
CPF/CNPJ:	<b>14.045.546/0001-73</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico</b>

### Espécie

**Myrcia rostrata**

Título da Atividade: **Prospecção de ativos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória em espécies de Myrcia (MYRTACEAE)**

### Equipe

<b>Aline do Nascimento Silva</b>	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA</b>
<b>Angélica Maria Lucchese</b>	<b>Universidade Estadual de Feira de Santana</b>
<b>Marilene Lopes da Rocha</b>	<b>Universidade Estadual de Feira de Santana</b>

Data do Cadastro:	<b>24/01/2018 21:05:30</b>
Situação do Cadastro:	<b>Concluído</b>



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:38** de **11/03/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

**ANEXO C – PROTOCOLO UTILIZADO PARA A AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS NO  
TESTE DA TOXICIDADE ORAL AGUDA**

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
<b>1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo de endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuída					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Autolimpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 – SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO</b>					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTES</b>					
<b>Observações complementares:</b>					

FONTE: ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006