



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO
E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia sylvatica*
(G.Mey.) DC.**

MARISSOL RABELO DE ALMEIDA

Santarém, Pará
Março, 2014

MARISSOL RABELO DE ALMEIDA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO
E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia sylvatica*
(G.Mey.) DC.**

**ORIENTADOR: DR. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADORA: DRA. ROSA HELENA VERAS MOURÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará
Março, 2014**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

A447e Almeida, Marissol Rabelo de
Estudo farmacológico do estrato aquoso bruto e do óleo essencial das
folhas de *Myrcia Sylvatica* (G.Mey) DC. / Marissol Rabelo de Almeida. –
Santarém, 2014.
83 f.: il.
Inclui bibliografias.

Orientador Ricardo Bezerra de Oliveira, Co-orientadora Rosa Helena
Veras Mourão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa
de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2014.

1. Plantas medicinais. 2. *Myrcia Sylvatica*. 3. Essencias e óleos essenciais.
4. Farmacognosia. I. Oliveira, Ricardo Bezerra de, orient. II. Mourão, Rosa
Helena Veras, co-orient. III. Título.

CDD: 23 ed. 615.321

ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, área de concentração: Bioprospecção e Manejo de recursos naturais da Amazônia. Aprovada pelo Programa de Pós-graduação *Stricto Senso* em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 31 de março de 2014.

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Coordenador do PGRNA

Apresenta a comissão examinadora, integrada pelos professores:

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP
Examinador 01

Prof^ª. Dr^ª. LENISE VARGAS FLORES DA SILVA
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Examinador 02

Prof^ª. Dr^ª. SORAIA VALÉRIA DE OLIVEIRA COELHO LAMEIRÃO
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Examinador 03

Prof. Dr. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Orientador

Prof. Dr^ª. ROSA HELENA VERAS MOURÃO
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Co-orientadora

Santarém, março, 2014

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
Aos meus pais Anderson e Maria do Carmo,
A minha irmã Máira
E ao meu esposo Walter.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Prof. Dr. Ricardo Bezerra**, por aceitar ser meu orientador de mestrado e por toda a confiança e atenção dispensada.

À **Profª. Drª. Rosa Mourão**, co-orientadora deste trabalho, que sempre esteve disposta a colaborar com a realização da pesquisa.

A minha família, em especial meus pais **Anderson** e **Maria do Carmo** e minha irmã **Maíra** pelo amor e carinho e por todo o apoio e incentivo aos meus estudos.

Ao meu esposo **Walter Lopes** por ter sempre me incentivado desde a realização da seleção do mestrado até a fase de preparação da dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental que de forma direta ou indireta me auxiliaram neste trabalho, em especial à **Adrielle Serra**, **Ana Paula Assunção**, **Sandra Sarrazin**, **Soraia Baia** e **Wania Cristina**, as quais foram fundamentais na execução dos experimentos e não mediram esforços para me ajudar.

Ao colega **Elissandro Banhos**, que se dispôs a me auxiliar na coleta de material e eutanásia dos animais.

Aos professores e colegas de turma do PGRNA 2012 pelas experiências e conhecimento repassados.

Aos órgãos financiadores **CAPES**, **CNPq** e **FAPESPA** pelo apoio financeiro ao projeto.

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!
(Renato Russo)

ALMEIDA, Marissol Rabelo de. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.** 2014. 76 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de Concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2014.

RESUMO

As plantas medicinais são consideradas de grande importância para a obtenção de moléculas biologicamente ativas e para a descoberta de novos fármacos, sendo necessária a realização de pesquisas que avaliem os efeitos de plantas de uso popular. A *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. é uma espécie vegetal da família Myrtaceae, produtora de óleo essencial, conhecida como pedra-ume-caá, utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, como diabetes, diarreia e inflamações. Apesar de ser bastante utilizada na forma de chás e comercializada em mercados e feiras como planta medicinal, há poucos estudos sobre suas atividades farmacológicas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial farmacológico dessa espécie, avaliando as atividades antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *M. sylvatica*, além de avaliar a atividade do extrato aquoso bruto sobre o comportamento e aprendizado em ratos wistar. Para isso, foram realizados os testes farmacológicos de edema de pata induzido por carragenina e teste da formalina, e os testes comportamentais: labirinto em Y, campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto aquático de Morris e barra giratória. Os resultados obtidos indicaram que o extrato aquoso de *M. sylvatica* reduziu significativamente o edema de pata nas doses orais de 90, 180 e 270 mg/kg, assim como na aplicação tópica e na aplicação por fonoforese (redução de até 66,9% do edema na dose de 270 mg/kg), demonstrou efeito antinociceptivo nas doses de 180 e 270 mg/kg nas duas fases do teste da formalina (inibição de até 60,2% da resposta nociceptiva na dose de 270 mg/kg) e também não apresentou efeito sobre o comportamento animal após administração durante 21 dias. O óleo essencial de *M. sylvatica* não mostrou efeito antiedematogênico em nenhuma das doses testadas (50, 100 e 200 mg/kg), porém revelou importante efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste aplicado, nas três doses utilizadas (inibição de até 98,8 % na dose de 50 mg/kg). Esses resultados indicam um potencial farmacológico do extrato aquoso e do óleo essencial dessa planta devido às atividades verificadas, havendo a necessidade de realização de novos estudos para conhecimento dos princípios ativos e dos possíveis mecanismos de ação dessas substâncias.

Palavras-Chave: *Myrcia sylvatica*; edema; fonoforese; nocicepção; comportamento animal.

ALMEIDA, Marissol Rabelo de. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.** 2014. 76 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de Concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2014.

ABSTRACT

Medicinal plants are considered very important for obtaining biologically active molecules, for discovery of new drugs and it is very important to conduct research to evaluate the effects of plants of popular use. *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. is a species of Myrtaceae, essential oil producer, known as “pedra-ume-caá”, used in folk medicine to treat various diseases such as diabetes, diarrhea and inflammations. Although much used in the form of teas and sold in markets and fairs as a medicinal plant, there are few studies about its pharmacological activities. Therefore, the aim of this study was to investigate the pharmacological potential of the species, evaluating the antiedematogenic and antinociceptive activities of the aqueous extract and essential oil of *M. sylvatica*, and to evaluate the activity of the crude aqueous extract on behavior and learning in Wistar rats. For this, the pharmacological tests (paw edema induced by carrageenan and formalin test) and behavioral tests (Y maze, Open Field, Light-dark Box, Morris Watermaze and Rota-rod) were performed. The results indicated that the aqueous extract of *M. sylvatica* significantly reduced the paw edema in oral doses of 90, 180 and 270 mg/kg, as well as the topical application and application by phonophoresis (maximum reduction of 66.9% of edema at dose of 270 mg/kg), showed antinociceptive effect at doses of 180 and 270 mg/kg in both phases of the formalin test (maximum inhibition of 60.2% of nociceptive response at dose of 270 mg /kg) and also had no effect on animal behavior after administration for 21 days. The essential oil of *M. sylvatica* showed no antiedematogenic effect on any of the doses tested (50, 100 and 200 mg/kg), but showed significant antinociceptive effect in both phases of the test at the three doses used (inhibition to 98, 8% at a dose of 50 mg/kg). Results indicate a pharmacological potential of aqueous extract and essential oil of this plant due to the observed activities, thus requiring new studies to know active compounds and possible mechanisms of action of these substances.

Keywords: *Myrcia sylvatica*; edema; phonophoresis; nociception; animal behavior.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1.1 Plantas Medicinais	11
1.1.1.1 <i>Myrcia sylvatica</i> (G. Mey.) DC. – Myrtaceae.....	14
1.1.2 Inflamação	17
1.1.2.1 Vasodilatação e edema.....	19
1.1.2.2 Migração e função dos leucócitos.....	20
1.1.2.3 Mediadores inflamatórios.....	21
1.1.2.4 Tratamento da inflamação.....	23
1.1.3 Nocicepção	24
1.1.3.1 Tratamento da dor.....	26
1.1.3.2 Testes nociceptivos	27
1.1.4 Toxicidade de plantas medicinais	28
1.1.5 Vias de administração de medicamentos	30
1.1.5.1 Ultrassom terapêutico e fonoforese	31
1.2 OBJETIVOS	32
1.2.1 Objetivo Geral	32
1.2.2 Objetivos Específicos	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	34
2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO.....	34
2.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	35
2.4 PREPARAÇÃO DO GEL DO EXTRATO AQUOSO.....	35
2.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	35

2.6	ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	36
2.7	TESTES FARMACOLÓGICOS	36
2.7.1	Teste de atividade antiedematogênica.....	36
2.7.2	Teste de atividade antinociceptiva	38
2.8	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
2.8.1	Labirinto em Y.....	40
2.8.2	Campo Aberto.....	41
2.8.3	Caixa Claro-escuro	42
2.8.4	Labirinto Aquático	43
2.8.5	Barra Giratória – Rota-rod.....	44
2.9	ANÁLISE DE DADOS.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
3	CAPÍTULO I (ARTIGO).....	55
4	SÍNTESE INTEGRADORA	74
	ANEXOS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Myrcia sylvatica</i> (G. Mey.) DC.....	15
Figura 2: Distribuição geográfica de <i>M. sylvatica</i> no Brasil.....	15
Figura 3: Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	38
Figura 4: Teste da formalina: animal lambendo a pata.....	39
Figura 5: Teste do labirinto em Y.	41
Figura 6: Teste do campo aberto.	42
Figura 7: Teste da caixa claro-escuro	42
Figura 8: Teste do labirinto aquático	43
Figura 9: Teste da barra giratória.	44

Lista de Figuras do Capítulo I (Artigo)

Fig. 1. Efeito do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o edema da pata induzido por carragenina em ratos.....	71
Fig. 2. Efeito do óleo essencial de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o edema da pata induzido por carragenina em ratos.	72
Fig. 3. Efeito do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre a nocicepção no teste da formalina em ratos.....	73
Fig. 4. Efeito do óleo essencial de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre a nocicepção no teste da formalina em ratos.....	73
Fig. 5. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o comportamento de ratos nos parâmetros avaliados no teste do campo aberto.....	74
Fig. 6. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre a porcentagem de sequências corretas no teste do labirinto em Y.....	75
Fig. 7. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o tempo de latência para entrada no ambiente escuro no teste da caixa claro-escuro.....	75
Fig. 8. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o tempo para encontrar a plataforma submersa no teste do labirinto aquático.....	75
Fig. 9. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Myrcia sylvatica</i> sobre o tempo de permanência na barra giratória.	75

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que, para 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento, as plantas medicinais eram a única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento médico à obtenção de exames e medicamentos. Além disso, a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (Veiga Júnior *et al.*, 2005).

O Brasil, em decorrência da miscigenação cultural proporcionada por europeus, africanos e indígenas, possui uma “farmacopeia popular” muito diversa, baseada em plantas medicinais. Associado a isso, há ainda as dimensões continentais do país com suas peculiaridades climáticas e diferentes biomas, e por isso uma grande diversidade de plantas medicinais. Nesse sentido, grande contribuição tem sido dada ao longo de décadas pelo resgate do conhecimento popular, por meio de estudos etnobotânicos e etnofarmacêuticos, os quais têm trazido muitas informações importantes (Carvalho *et al.*, 2010).

Segundo a Resolução n. 14, de 31 de março de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é uma “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”. Droga vegetal é a “planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização (quando aplicável) e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada”. Já o derivado vegetal é um “produto da extração de planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros derivados”.

Neste trabalho, foram estudados efeitos farmacológicos dos derivados vegetais do tipo extrato aquoso e óleo essencial. Segundo Lameira e Pinto (2008), as soluções extrativas são resultantes da dissolução de uma planta, já em formato de pó, num líquido solvente a fim de extrair alguns constituintes com atividade farmacológica; vários tipos de solventes podem ser utilizados para esse fim, porém a água e o álcool

são os principais. No caso do extrato aquoso, são extraídas substâncias hidrofílicas, como aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, saponinas, heterosídeos, flavanoides e mucilagens (Simões, 2001).

Os óleos essenciais, por sua vez, são produtos voláteis do metabolismo das plantas, produzidos e armazenados em células especiais em diferentes partes dos vegetais, tais como: flores, folhas e talos, sementes, cascas de frutas, raízes e tronco. São substâncias orgânicas solúveis em óleos e gorduras que, em geral, constituem-se de moléculas de álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e fenóis pertencentes à classe das substâncias químicas dos terpenoides (Almeida, 2011). As substâncias existentes nos óleos essenciais além de serem utilizadas como aromatizantes em alimentos, perfumes, cosméticos e produtos farmacêuticos, também têm demonstrado ter vários efeitos farmacológicos importantes (Rocha *et al.*, 2011).

A espécie vegetal objeto desta pesquisa é a *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC., em virtude do conhecimento tradicional de sua utilização para tratamento de diversas enfermidades, do potencial farmacológico das plantas da família Mirtaceae e da carência de estudos publicados sobre as atividades farmacológicas dessa espécie. Será apresentada a seguir uma breve revisão sobre as principais temáticas abordadas neste estudo.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Plantas Medicinais

A utilização das plantas medicinais é praticada desde os primórdios da civilização humana, havendo registros desde 5000 a.C de listagens de drogas derivadas de plantas produzidas pelos chineses. Outras civilizações antigas, como Grécia, Roma e Egito também possuem registro de uso de plantas para diversos fins terapêuticos. Essa conduta foi observada até mesmo em povos primitivos e isolados, como as tribos indígenas da América do Sul, e o conhecimento sobre as plantas medicinais foi sendo transmitido a outros povos ao longo do tempo, servindo de base para a produção de vários tipos de medicamentos (Lameira e Pinto, 2008).

Entre as décadas de 1950 e 1970, as plantas medicinais foram negligenciadas pelo mercado e pelos consumidores, em virtude do grande impulso provocado pela química orgânica na medicina alopática. Entretanto, na década de 1980 essa realidade

começou a mudar e, as plantas voltaram a ser valorizadas por suas propriedades curativas e seu baixo custo (Lameira e Pinto, 2008; Ethur *et al.*, 2011).

Nas últimas duas décadas, o interesse por plantas medicinais e respectivos produtos tem aumentado, impulsionando a abertura de mercados nacionais e mundiais na área de fitoterápicos e plantas bioativas. Atualmente, há descobertas constantes sobre o uso de plantas na área terapêutica (Ethur *et al.*, 2011) e a exploração comercial dessas plantas apresenta perspectivas cada vez mais promissoras de se tornar uma atividade economicamente rentável (Aprile e Siqueira, 2012).

Segundo Almeida (2011), é uma orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS) que haja uma conexão entre a medicina tradicional empírica e a medicina científica, de modo que os medicamentos à base de plantas não sejam aceitos como verdade absoluta sem questionamentos, mas que também não sejam refutados por puro preconceito, tendo em vista que a terapêutica moderna emprega grande número de substâncias que, embora sejam obtidas na sua maioria por intermédio de síntese, foram originalmente isoladas de espécies vegetais.

São consideradas plantas medicinais as espécies vegetais que possuem em sua composição substâncias sintetizadas de forma natural a partir de sua matéria prima básica (água e nutrientes), que podem atuar em um organismo animal, promovendo cura ou atenuação dos sintomas de uma enfermidade (Aprile e Siqueira, 2012). Os compostos quimicamente ativos responsáveis pela ação terapêutica da planta são denominados “princípios ativos” (Martins *et al.*, 2003).

Os princípios ativos são decorrentes da capacidade das plantas para sintetizar metabólitos secundários, substâncias diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio e servem como mecanismos de defesa contra micro-organismos, insetos e herbívoros, proteção contra raios ultravioleta e para atrair polinizadores ou animais dispersores de sementes. Esses metabólitos muitas vezes apresentam propriedades biológicas interessantes, sendo estes uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (Dignani, 2009).

O metabolismo secundário das plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores, tais como sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, radiação ultravioleta, composição atmosférica e disponibilidade hídrica e de nutrientes. Tais fatores, bem como outros que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, como condições de coleta,

estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu uma política de regulação chamada de Política Nacional de Plantas Mediciniais Fitoterápicos, com o objetivo de melhorar a saúde, o uso sustentável da biodiversidade, promover o respeito à diversidade regional (cultural e ambiental), além de aumentar a conscientização e participação da comunidade nessas questões (Coelho-Ferreira, 2009). Essa política tem como diretriz garantir aos usuários do sistema único de saúde (SUS) o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos, com eficácia, qualidade e segurança, visando à melhoria da atenção à saúde e à inclusão social (Brasil, 2009).

De acordo com Almeida (2011), o Brasil possui competência em todas as áreas da ciência relacionadas ao estudo de plantas medicinais. Além disso, as bases legais para a regulamentação da Fitoterapia foram objeto de diversas resoluções e portarias. Como exemplo, pode-se citar a Portaria nº 212 do Ministério da Saúde, de 1989, a qual define o estudo das plantas como uma prioridade da investigação em saúde, apontando áreas prioritárias no estudo sobre plantas medicinais, tais como: 1) estudos de identificação, avaliação e controle de preparações fitoterápicas oficiais e de uso popular generalizado; 2) estudos botânicos, farmacotécnicos e químicos de preparação fitoterápica, com vistas a definições de métodos de preparo, dose de princípios ativos e controle da qualidade; 3) desenvolvimento de ensaios farmacotécnicos para avaliação das propriedades terapêuticas das preparações farmacêuticas de uso popular obtidas de plantas medicinais; e 4) investigação farmacológica e fitoquímica de espécies selecionadas da flora brasileira e outros produtos.

Apesar das recomendações, o uso das plantas medicinais nos serviços públicos de saúde ainda não se tornou uma realidade nacional. Isso pode ser explicado pela falta de dados científicos sobre as espécies nativas ou a falta de sistematização dos dados já existentes (Barbosa *et al.*, 2009). Mesmo havendo mais de 50 anos de pesquisa com plantas medicinais no país, o número de espécies estudadas ainda é muito reduzido (Carvalho *et al.*, 2010).

Dentre as inúmeras espécies vegetais existentes no Brasil com potencial para uso terapêutico está a *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. cujas atividades farmacológicas foram objeto deste estudo.

1.1.1.1 *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. – Myrtaceae

A Família Myrtaceae, é pertencente à ordem Myrtales, sendo encontrada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com muitas espécies concentradas na região tropical da América e na Austrália. Espécies dessa família são encontradas em praticamente todos os *habitat* terrestres, com exceção das regiões áridas e semiáridas, compreendendo, ao redor do mundo, aproximadamente 100 gêneros e 3000 a 3500 espécies (Smith *et al.*, 2004).

Essa família é uma das mais importantes do Brasil, na qual se destacam os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthes*, com mais de uma centena de espécies, enquanto os demais gêneros possuem menos de 60 espécies brasileiras (Gressler *et al.*, 2006). Destes, *Eugenia* e *Myrcia* são os dois mais importantes, compreendendo cerca de 550 e 250 espécies, respectivamente (Nakamura *et al.*, 2010).

O gênero *Myrcia* compreende cerca de 400 espécies tropicais e subtropicais desde o México e Caribe até o norte da Argentina. (Landrum e Kawasaki, 1997). Na região de Santarém-PA, espécies desse gênero são abundantes em ambientes de vegetação aberta, como savanas e bordas de matas secundárias (Almeida, 2009).

Esse gênero é conhecido por seu amplo espectro de atividades farmacológicas. No Brasil, várias espécies são utilizadas em tribos indígenas e comunidades tradicionais com finalidade adstringente, diurética, antidiabética, antidiarreica, anti-hipertensiva, para estancar hemorragias e para tratar úlceras bucais (Cerqueira *et al.*, 2013).

Dentro do gênero *Myrcia*, um grupo de espécies conhecidas por pedra-ume-caá é utilizado na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, tais como diabetes, aftas, leucemia, inflamações uterinas, ferimentos e doenças infecciosas (Silva, 2012). Na literatura sobre Myrtaceae, verificou-se que nove espécies são denominadas popularmente como pedra-ume-caá, sendo elas: *Eugenia biflora* (L.) DC., *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., *Myrcia amazonica* DC., *Myrcia citrifolia* (Aubl.) Urb., *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. (chamada de *Myrcia sphaerocarpa* DC. por alguns autores), *Myrcia salicifolia* DC., *Myrcia speciosa* (Amshoff) McVaugh. e *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (Cruz e Kaplan, 2004; Jorge *et al.*, 2000; Limberger *et al.*, 2004; Silva, 2012; Souza Filho *et al.*, 2006).

Dentro desse grupo, destaca-se a *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC., objeto de estudo desta pesquisa. A *M. sylvatica* (Figura 1) é classificada como arbusto ou arvoreta, medindo entre três e quatro metros de altura (Silva, 2012). Além de ser

chamada de pedra-ume-caá, na literatura verificou-se outros nomes populares atribuídos à planta, tais como: cumatê-folha-miúda (Silva, 2012), murta (Lustosa *et al.*, 2011; Zoghbi *et al.*, 2002), murtinha (Dutra *et al.*, 2004; Silva, 2012) e vassourinha (Almeida, 2009; Souza e Scudeller, 2011).

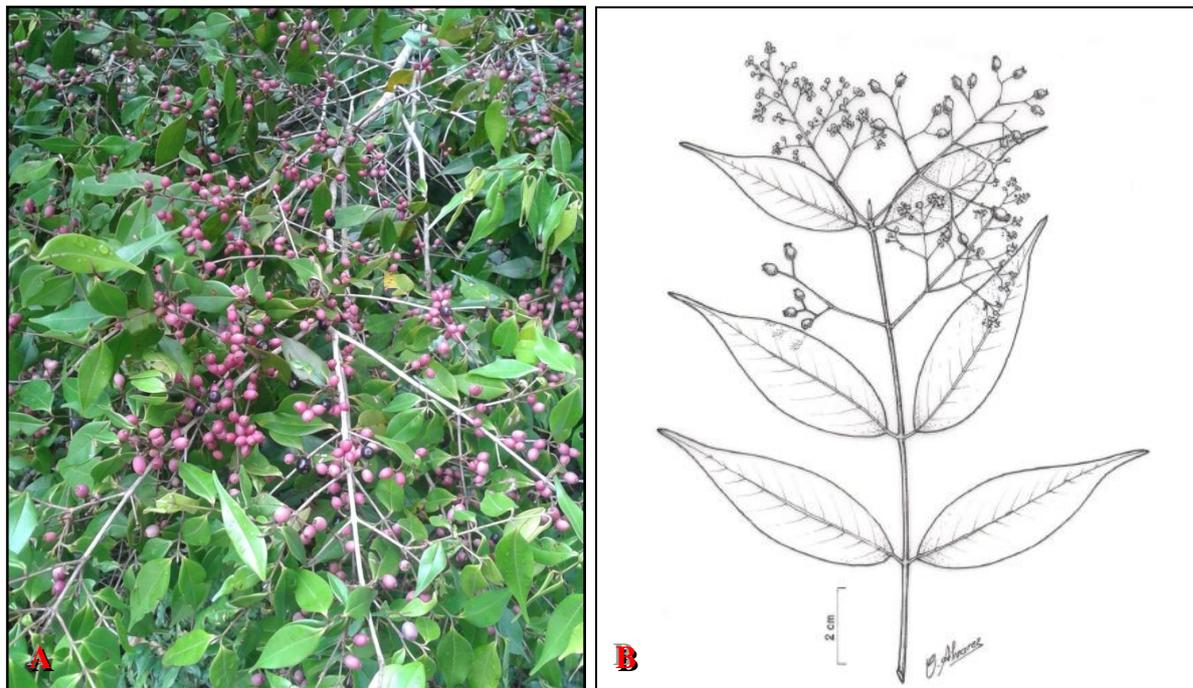


Figura 1: *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. A: Registro fotográfico do autor; B: Representação do hábito com inflorescência e fruto. Fonte: Silva, 2012.

A ocorrência da espécie se dá desde a região da Costa Rica até a parte tropical da América do Sul. (Govaerts, 2013). Conforme mostra a figura 2, no Brasil, ocorre nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco) e Centro-oeste (Mato Grosso), representadas pelas cores verde, laranja e amarelo, respectivamente. Está presente nos biomas Amazônia, Caatinga e Cerrado (Sobral *et al.*, 2013).

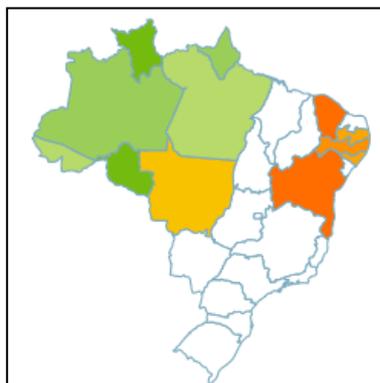


Figura 2: Distribuição geográfica de *M. sylvatica* no Brasil. Fonte: Sobral, 2013.

No estado do Pará, apresenta-se amplamente distribuída, estando presente nos municípios de Acará, Augusto Côrrea, Barcarena, Belém, Benevides, Bragança, Curuçá, Igarapé-açu, Itaituba, Jacundá, Magalhães Barata, Marabá, Melgaço, Moju, Monte Alegre, Oriximiná, Peixe-boi, Salvaterra, Santa Izabel, Santarém, Tucuruí, Vigia e Viseu. É encontrada em planícies de planalto, florestas, cerrado, savanas, florestas de várzea, capoeiras baixa de terra-firme e campinas de areia branca, geralmente em solos pobres em nutrientes e solos arenosos (Silva, 2012).

Na cidade de Belém-PA, a *M. sylvatica* é comercializada como pedra-ume-caá e as folhas são utilizadas na forma de chás, com indicações para o tratamento de diabetes, diarreia, afta, inflamação intestinal e hemorragia ou utilizada em forma de banhos de assento, por meio da maceração das folhas, para tratar inflamações uterinas (Silva, 2012).

A *M. sylvatica* é uma espécie produtora de óleo essencial, uma característica comum às espécies pertencentes à família Myrtaceae. Segundo o estudo de Zoghbi *et al.* (2002), os constituintes principais identificados em três amostras de óleo essencial das folhas de *M. sylvatica* coletadas no estado do Tocantins, foram selin-11-en-4- α -ol (24,7%), óxido de cariofileno (16,6%) e espatulenol (13,8%) (amostra 1); cis-calameneno (30,1%), espatulenol (18,7%) e α -calacoreno (11,5%) (amostra 2); espatulenol (40,2%) e β -bisaboleno (14,7%) (amostra 3).

Na pesquisa realizada por Botelho *et al.* (2010), com folhas coletadas no estado de Pernambuco, a composição química do óleo essencial de *M. sylvatica* apresentou os sesquiterpenos (91,0%) como classe química predominante, sendo os constituintes majoritários o β -cariofileno (12,4%), α -cadinol (10,51) e α -muuroleno (10,48%).

Silva (2012) realizou um estudo com quatro amostras de *M. sylvatica* coletadas no campus de pesquisas do Museu Paraense Emílio Goeldi, estado do Pará, e verificou que os óleos essenciais obtidos eram constituídos principalmente por sesquiterpenos hidrocarbonetos (45,8 – 88,9%), tendo como constituintes majoritários: β -Cariofileno (6,7 a 11,1%), germacreno D (6,1 a 8,8%), bicilogermacreno (0 a 6,1%) e espatulenol (3,7 a 9,4%). Apesar de as folhas dessa espécie serem utilizadas pela população predominantemente na forma de chás, não foram encontrados na literatura trabalhos a respeito da caracterização fitoquímica de seu extrato aquoso.

Quanto às atividades biológicas e farmacológicas da espécie encontradas na literatura, Lustosa *et al.* (2011) verificou a atividade fungitóxica do óleo essencial de *M.*

sylvatica no crescimento micelial de fitopatógenos de espécies florestais; Escher *et al.* (2011) verificou que o óleo essencial de *M. sylvatica* provocou inibição do crescimento de cepas de *Candida sp.*; Botelho *et al.* (2010) verificou a atividade acaricida do óleo essencial de *M. sylvatica*.

Batista e colaboradores (2010), realizando avaliação de toxicidade de *M. sylvatica* por meio do bioensaio com *Artemia salina*, verificaram que o seu extrato aquoso apresentou DL₅₀ de 213,79 µg/ml, sendo considerado moderadamente tóxico, enquanto o seu óleo essencial apresentou DL₅₀ de 38,1 µg/ml, ou seja, possui alta toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, sendo este um bom indicativo para possível atividade microbiológica e anticancerígena.

No estudo realizado por Aranha (2010), os resultados indicaram atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso de *M. sylvatica* administrado por via oral na dose de 180 mg/kg, sendo os mecanismos anti-inflamatórios e analgésicos provavelmente relacionados com a inibição da síntese ou liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas. Nesse mesmo estudo, verificou-se também que a aprendizagem e memória espacial de ratos não foram afetadas pela administração subcrônica do extrato aquoso de *M. sylvatica*, na dose de 360 mg/kg).

Não foram encontrados na literatura outros estudos a respeito da atividade farmacológica de *M. sylvatica*. Este fato demonstra claramente a necessidade da realização de pesquisas sobre a espécie, a fim de que suas propriedades farmacológicas sejam compreendidas e seus efeitos tóxicos determinados.

Para o estudo das propriedades antiedematogênica, antinociceptiva e dos efeitos sobre o comportamento animal (neurotoxicidade) de espécies vegetais faz-se necessária uma revisão sobre os temas inflamação, nocicepção e toxicidade de plantas medicinais, os quais serão abordados a seguir.

1.1.2 Inflamação

A inflamação é definida como “uma reação dos tecidos a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício”. A reação inflamatória é um dos componentes mais importantes da resposta imunitária, porém, apesar de fazer parte dos mecanismos de defesa contra vários tipos de agressões, em muitos casos pode também provocar danos no próprio organismo (Aller *et al.*, 2006; Brasileiro Filho, 2011). É uma reação complexa dos tecidos,

consistindo principalmente nas respostas dos vasos sanguíneos e dos leucócitos (Kumar *et al.*, 2010), um evento no qual as células e mediadores colaboram para neutralizar e eliminar os estímulos nocivos a fim de permitir a manutenção da homeostase (Alessandri *et al.*, 2013).

Essa reação é desencadeada por variados tipos de estímulos que podem provocar lesão celular, dentre eles estão: o trauma mecânico, a privação de oxigênio ou nutrientes, as alterações imunológicas ou genéticas, os agentes químicos, os micro-organismos, as temperaturas extremas e a radiação (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo da efetividade da reação inicial e da natureza do estímulo causador. A inflamação aguda é rápida e tem duração de horas ou até poucos dias, e apresenta como características principais a exsudação de líquido e proteínas do plasma (edema) e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) para o local da lesão (Kumar *et al.*, 2010; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Já a inflamação crônica, difere da inflamação aguda, tendo como características: longa duração, presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual (Kumar *et al.*, 2010). A resposta inflamatória inicial pode proteger o hospedeiro e ser autolimitada, progredindo para a resolução do problema. No entanto, se a inflamação aguda for desregulada, pode não haver resolução e sim evoluir para uma situação mais crônica, com danos para o indivíduo (Sousa *et al.*, 2013).

Como resultado da reação inflamatória, são evidenciados os sinais clínicos: dor, calor, rubor, edema e perda da função (Brasileiro Filho, 2011), também denominados de sinais flogísticos. A primeira etapa do processo inflamatório consiste em uma resposta vascular com aumento na permeabilidade da parede dos vasos. Há uma transitória vasoconstrição arteriolar promovida pela contração dos músculos lisos vasculares, porém subsequentemente, uma vasodilatação arteriolar conduz ao aumento do fluxo sanguíneo para a área danificada, resultando em hiperemia local. Nessa fase inicial, as alterações no endotélio vascular são facilmente detectáveis, com consequente exsudação de proteínas e fluido plasmático do sangue para o tecido (Alessandri *et al.*, 2013).

A próxima etapa da resposta inflamatória envolve a migração de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido-alvo, onde exercem sua função efetora. O extravasamento de leucócitos é orquestrado pela ação combinada de receptores de adesão celular e fatores quimiotáticos, envolvendo alterações morfológicas radicais, tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais. Constitui assim, um processo ativo para ambos os tipos de células e promove o fluxo rápido e eficiente de leucócitos para

focos inflamatórios sem, no entanto, comprometer a integridade da barreira endotelial (Barreiro e Sánchez-Madrid, 2009).

Este é um processo complexo mediado por uma variedade de moléculas de sinalização produzidas por leucócitos, bem como pela ativação de fatores que levam à formação de edema, como resultado de extravasamento de líquidos e proteínas e do acúmulo de leucócitos no local da inflamação (Babu *et al.*, 2009; Kvietys e Granger, 2012; Stables e Gilroy, 2011).

O estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório é de fundamental importância para se conhecer os alvos de intervenção farmacológica para o desenvolvimento de fármacos com potencial anti-inflamatório (Moraes, 2011). Tais mecanismos envolvem a vasodilatação com formação de edema, a ação dos leucócitos e a liberação de mediadores químicos, os quais serão abordados a seguir.

1.1.2.1 Vasodilatação e edema

O edema é o acúmulo de líquido no espaço intersticial (Coelho, 2004). É uma característica fundamental da inflamação aguda, causada pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento de exsudato (fluido rico em proteínas de alto peso molecular) dos vasos sanguíneos para o interstício. Ocorre como resultado das ações de mediadores como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas, a fim de facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao local da lesão (Aller *et al.*, 2006; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A avaliação do edema é uma medida eficaz e útil para a quantificação de inflamação cutânea induzida (Santos *et al.*, 2012). Essa avaliação pode ser realizada por meio do teste de edema de pata, o qual se baseia na mensuração do volume das patas traseiras de animais após a aplicação de um estímulo inflamatório, com o auxílio de um pletismômetro.

Uma das substâncias empregadas para induzir inflamação em animais de laboratório é a carragenina, um polissacarídeo sulfatado de elevado peso molecular (Baker *et al.*, 1986). A resposta inflamatória induzida por carragenina foi descrita em 1962 por Winter *et al.* (1962) na pata de ratos e em 1969 em camundongos (Levy,

1969). A partir de então, o teste de edema de pata induzido por carragenina tem sido amplamente utilizado para testar compostos anti-inflamatórios (Castardo *et al.*, 2008; Sadeghi *et al.*, 2011).

A resposta desse teste se divide em duas fases: a fase inicial, observada no período de uma a duas horas e meia após a aplicação do agente inflamatório, é relacionada com a liberação de histamina, serotonina, bradicinina, e prostaglandinas em menor quantidade, enquanto que a fase tardia é atribuída à infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e à continuidade da geração de prostaglandinas (Akkol *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Migração e função dos leucócitos

O início da resposta inflamatória se dá a partir da detecção de um dano tecidual por células sentinelas localizadas dentro do tecido afetado, tais como macrófagos, mastócitos e células endoteliais vasculares, as quais possuem receptores de reconhecimento em sua superfície capazes de reconhecer estruturas de espécies microbianas ou moléculas endógenas liberadas a partir de células danificadas. Esse tipo de estímulo induz essas células a secretarem citocinas e uma gama de diferentes quimiocinas. Em resposta à liberação destes mediadores, o endotélio vascular adjacente torna-se ativo (Dimasi *et al.*, 2013).

Após a ativação do endotélio por mediadores inflamatórios, uma série de moléculas de adesão promove a ligação reversível de leucócitos ao endotélio ativado. A aderência inicial é mediada por selectinas que facilitam a desaceleração dos leucócitos no endotélio (Dolgachev e Lukacs, 2010). Os leucócitos, uma vez aderidos ao endotélio, extravazam para o espaço intersticial, atravessando a parede vascular entre as células endoteliais, processo denominado diapedese leucocitária, e movimentam-se em direção ao agente quimiotático que o atrai (Faria *et al.*, 2010). Assim, a fase inicial da resposta inflamatória é caracterizada por uma rápida migração de leucócitos para o tecido afetado.

Durante a resposta inflamatória aguda, os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são os primeiros leucócitos a chegar aos locais de inflamação, a fim de eliminar patógenos microbianos ou remover os detritos celulares por fagocitose, além de estarem envolvidos também na cicatrização de feridas e na reparação tecidual (Pick *et al.*, 2013). Segundo Geering *et al.* (2013), na inflamação, eosinófilos e basófilos, além dos

neutrófilos, desempenham a tarefa de eliminar patógenos, além de contribuírem para a imunorregulação.

As pesquisas sobre inflamação demonstram que monócitos e macrófagos também possuem papel fundamental na inflamação, pela liberação de vários mediadores químicos, incluindo substâncias pró-inflamatórias, tais como: fatores de crescimento, lipídios bioativos, enzimas hidrolíticas, citocinas e óxido nítrico (NO) (Chapman *et al.*, 2013; Moraes, 2011; Nonato *et al.*, 2012).

No caso da aplicação intraplantar de carragenina, a resposta imunitária envolve a ativação de macrófagos, mastócitos e células endoteliais, o que resulta na liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias e mediadores (incluindo interleucinas e óxido nítrico). Os neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas a partir da circulação para a pata traseira inflamada e atingem níveis de pico de 1,5 a 3 h após a injeção da carragenina. O período de influxo de neutrófilos é seguido por um período de influxo de macrófagos, os quais iniciam a fase de resolução da resposta imune inata, através da fagocitose de neutrófilos que sofreram apoptose (Fecho *et al.*, 2007).

1.1.2.3 Mediadores inflamatórios

No local da inflamação, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e leucócitos recrutados do sangue produzem diferentes mediadores da inflamação (Aller *et al.*, 2006). A histamina e a serotonina são mediadores que já se encontram armazenadas nas células e quando são liberadas já estão ativas. A histamina encontra-se nos mastócitos, basófilos e nas plaquetas e é liberada por fatores como traumas, toxinas ou presença de alérgenos, agindo imediatamente e provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Já a serotonina é proveniente das plaquetas e possui o mesmo efeito da histamina (Faria *et al.*, 2010).

As citocinas são mediadores proteicos ou polipeptídicos sintetizados e liberados por células do sistema imunológico durante a inflamação, capazes de regular a ação das células inflamatórias e do sistema imunológico, exercendo efeitos complexos sobre leucócitos, células endoteliais vasculares, mastócitos, células tronco hematopoiéticas, controlando a proliferação e ativação dessas células. A superfamília das citocinas inclui as quimiocinas, as interferonas e as interleucinas (Rang *et al.* 2011).

Outros mediadores químicos da inflamação são os derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poli-insaturado de 20 átomos de carbono, cuja

cadeia possui quatro ligações duplas. Está presente na membrana plasmática das células, sendo de grande importância para a fluidez da membrana, e é liberado da membrana pela ação de fosfolipases. Após liberado, as duplas ligações deste fosfolípido são sítios comuns de atuação das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (Muniz, 2009). Essas enzimas são responsáveis pela síntese dos metabólitos do AA, também chamados de eicosanoides: as COXs sintetizam as prostaglandinas (PGs) e os tromboxanos (TXs), enquanto as LOXs produzem os leucotrienos LTs e as lipoxinas (LXs) (Pinheiro, 2011).

Segundo Stables e Gilroy (2011), as ciclooxigenases (COX) são enzimas responsáveis por reações complexas que transformam o ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs). Existem duas isoformas principais envolvidas no processo de conversão de AA: a COX-1 e a COX-2. Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa na maioria das células e tecidos, a COX-2 é geralmente induzida quando as células são submetidas a estímulos inflamatórios. Embora não exclusivamente, acredita-se que a COX-1 esteja envolvida em funções de manutenção celular necessárias para a atividade fisiológica normal, e que a COX-2 aja primariamente nos locais onde há inflamação.

As PGs desempenham um papel importante em condições fisiopatológicas, incluindo a resposta imunitária inflamatória e alérgica (Akkol *et al.*, 2012), promovendo a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e contribuindo para a dor e a febre (Recchiuti, 2013). Já os TXs são formados a partir de alguns tipos de PGs pela ação das COX, e juntamente com as PGs medeiam importantes ações da resposta inflamatória, como a vasoconstrição inicial, além de serem potentes fatores de agregação plaquetária (Pinheiro, 2011).

As reações promovidas pelas LOXs no metabolismo do AA determinam a formação de vários tipos de LTs. Alguns causam vasodilatação e extravazamento plasmático nas vênulas, e outros funcionam como potentes agentes quimiotáticos de leucócitos, principalmente neutrófilos (Pinheiro, 2011; Recchiuti, 2013). As ações pró-inflamatórias de vários tipos de PGs e LTs são contidas e reguladas pelas LXs, uma classe de eicosanoides oxidados que se ligam a receptores celulares e bloqueiam o influxo de neutrófilos, as quais são geradas pela ação combinada de leucócitos e plaquetas, também a partir da ação das enzimas LOX, ou ação conjunta das enzimas LOX e COX (Muniz, 2009; Pinheiro, 2011).

O óxido nítrico (NO) é um mediador secretado pelas células endoteliais e provoca o relaxamento do músculo liso subjacente, aumentando assim permeabilidade vascular (Corrêa *et al.*, 2008). Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos, exerce ação citotóxica contra micro-organismos (Coutinho *et al.*, 2009), aumenta a produção de prostaglandinas e é um potente vasodilatador (Rang *et al.*, 2011).

O Fator Ativador de Plaquetas (PAF) possui ação sobre uma variedade de células-alvo, sendo um importante mediador em fenômenos alérgicos e inflamatórios, é produzido por plaquetas e por células inflamatórias ativadas e produz efeitos como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia, além de ser uma substância quimiotáxica para neutrófilos e monócitos e ativar enzima fosfolipase A₂, iniciando a síntese dos eicosanoides (Rang *et al.*, 2011).

Além desses mediadores celulares, há ainda os que provêm do plasma sanguíneo, como as cininas, as quais são produzidas em uma forma inativa e ativadas por proteases plasmáticas. Dentre as cininas, a mais importante é a bradicinina, causadora de hiperemia e aumento da permeabilidade vascular, dez vezes mais ativa que a histamina, além de contribuir ativamente para a dor inflamatória (Faria *et al.*, 2010) por meio do estímulo de terminações nervosas da dor (Rang *et al.*, 2011).

1.1.2.4 Tratamento da inflamação

O tratamento clínico de doenças inflamatórias é baseado em terapias químicas não esteroidais ou esteroidais. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) reduzem a dor e a inflamação pelo bloqueio do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (COX), interferindo na produção de prostaglandina. Tendo em vista que as prostaglandinas são citoprotetoras, uma administração de AINEs em longo prazo pode ocasionar úlceras gastrointestinais, sangramentos e desordens renais devido à sua inibição não seletiva de ambas as isoformas da enzima COX, a constitutiva (COX-1) e a induzível (COX-2). Por outro lado, os medicamentos completamente seletivos de inibição da COX-2, apesar de apresentarem reduzida toxicidade gastrointestinal, têm sido associados a efeitos cardiovasculares adversos (Nonato *et al.* 2012; Santos *et al.*, 2012).

Já os anti-inflamatórios esteroidais, ou glicocorticoides ligam-se a receptores intracelulares e interagem com o DNA para modificar a transcrição gênica, induzindo

ou inibindo a síntese de proteínas. Sua ação anti-inflamatória se dá pela inibição da transcrição dos genes da COX-2, citocinas e interleucinas. Seus efeitos adversos decorrentes de alta dosagem ou administração prolongada são sérios, principalmente a supressão da resposta a infecções ou lesões (Rang *et al.*, 2011).

Diante disso, o uso de drogas esteroides como agentes anti-inflamatórios está se tornando muito controverso, em virtude de seus múltiplos efeitos colaterais. Por esse motivo, atualmente existe grande interesse no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios com menos efeitos colaterais baseados em produtos naturais (Nonato *et al.* 2012; Santos *et al.*, 2012).

Um exemplo disso é o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. É um produto oriundo de pesquisa nacional, encontrado nas formas farmacêuticas aerossol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Borraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno α -humuleno (Coutinho *et al.*, 2009).

Várias substâncias de origem vegetal, pertencentes a diferentes classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se as classes de terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides (Coutinho *et al.*, 2009).

1.1.3 Nocicepção

A nocicepção é um mecanismo protetor do organismo que ocorre sempre quando um tecido é lesionado, para que o indivíduo possa reagir de modo a remover a causa do estímulo doloroso (Guyton e Hall, 2006). A distinção entre os termos nocicepção e dor é importante. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, nocicepção é definido como “os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos”, enquanto que a dor é “uma experiência desagradável sensorial e emocional associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (Barrot, 2012; Garland, 2012).

São chamados de nociceptores os receptores que respondem a estímulos potencialmente lesivos, os quais se encontram amplamente distribuídos na pele, mucosas, membranas, fâscias profundas, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos, cujos campos de recepção podem ir desde pequenas regiões puntiformes até áreas que medem vários milímetros de diâmetro (Almeida *et al.*, 2004). Esses receptores

respondem diretamente a estímulos nocivos e indiretamente a outros através da ação de substâncias químicas liberadas pelas células dos tecidos lesionados (Kandel *et al.*, 2003). Os estímulos captados por eles são levados pelos nervos periféricos até a medula espinhal e desta até o encéfalo, onde ocorre a percepção (Bear *et al.*, 2008).

De forma mais detalhada, pode-se dizer que o estímulo da ativação dos nociceptores se propaga ao longo dos axônios dos nervos periféricos que terminam no corno dorsal da medula, local onde as mensagens são retransmitidas pela medula espinhal através do tracto espinotalâmico, até a saída no tálamo. O tálamo, por sua vez, funciona como a principal "estação de retransmissão" de informações sensoriais para vias nociceptivas que terminam em subdivisões distintas de núcleos talâmicos conhecidos como núcleo lateral ventral posterior e núcleo ventromedial. A partir desses núcleos, a informação nociceptiva é retransmitida para várias regiões, incluindo amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, gânglios da base e regiões do córtex cerebral. A ínsula e o córtex cingulado anterior são regiões do córtex cerebral constantemente ativadas após estímulos nocivos e essa ativação está associada à experiência subjetiva da dor (Garland, 2012).

A transdução dos estímulos dolorosos ocorre nas terminações nervosas livres das fibras A δ (pouco mielinizadas) e C (amielinizadas). (Bear *et al.*, 2008). A ativação aguda desses aferentes sensoriais de alto limiar, como no contato com uma superfície quente, uma picada de agulha ou uma incisão, provocam uma estimulação transitória da medula espinhal e do córtex e uma dor de rápida duração. Já em casos de lesão tecidual ou inflamação localizada, inicia um estado doloroso persistente caracterizado por ardência, sensação de pulsação e hiperalgesia provocado pelos efeitos das prostaglandinas, bradicininas e citocinas sobre essas terminações nervosas, reduzindo a intensidade de estímulo necessária para ativá-las (Brunton *et al.*, 2012).

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídios são liberados pelos terminais dos aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal, onde exercem um importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Dentre essas substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídios, incluindo as taquicininas (substância P e neurocininas), colecistocinina, somatostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina, encefalinas e endorfinas (Carvalho e Lemônica, 1998). A neuroquímica da nocicepção e modulação da dor centro-periferia é um mecanismo extremamente complexo (Garland, 2012).

O cérebro não recebe passivamente as informações nociceptivas advindas do corpo, mas em vez disso regula ativamente transmissão sensorial, exercendo influências sobre o corno dorsal da medula via projeções descendentes (Garland, 2012). Um circuito modulador endógeno descendente que conecta a substância cinzenta periaquedutal e o corno dorsal da medula funciona como ativador de conexões que promovem a facilitação ou inibição da nocicepção (Guginski, 2008). Assim, a sensação de dor pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibitórios da dor, principalmente por meio das vias descendentes de noradrenalina, serotonina e opioides endógenos, tais como β -endorfina e dinorfina (Yoshimura *et al.*, 2006).

1.1.3.1 Tratamento da dor

Um componente de terapia da dor é a utilização de drogas analgésicas, as quais interferem na produção e/ou na transmissão de impulsos nociceptivos no sistema nervoso, seja em nível periférico ou central (Stein, 2013).

Os analgésicos são substâncias capazes de suprimir a dor e amenizar as reações psíquicas e condutuais associadas, por meio de vários mecanismos. Um desses mecanismos é bloqueio na geração dos impulsos, proporcionado por analgésicos não narcóticos, como a aspirina, o salicilato de sódio e a fenilbutazona, os quais bloqueiam a ação da bradicinina no receptor, através da diminuição da produção desse agente algésico e de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico. Os analgésicos narcóticos (opiáceos) como a morfina, bloqueiam a transmissão sináptica nas vias centrais da dor. Já os analgésicos locais, tais como a novocaína, possuem como forma de ação a hiperpolarização da membrana no axônio, bloqueando a condução do potencial de ação gerado no nociceptor (Douglas, 2006).

O tratamento da dor continua sendo uma área muito ativa na pesquisa farmacológica porque compostos analgésicos utilizados clinicamente podem causar efeitos colaterais indesejados. O tratamento tradicional com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) é reconhecidamente associado a graves complicações gastrointestinais, como sangramento, lesões e úlceras. Já os analgésicos opiáceos possuem uso restrito em virtude dos efeitos de dependência e tolerância. Por isso, estudos são necessários para descobrir novas alternativas para o tratamento de dor. Nesse contexto, substâncias naturais obtidas a partir de plantas medicinais ganharam

importância no processo descoberta e desenvolvimento de novos fármacos analgésicos (Özkay e Can, 2013).

1.1.3.2 Testes nociceptivos

Os estudos experimentais de nocicepção são na maioria realizados em ratos ou camundongos, sendo sempre observadas as normas éticas para a investigação experimental em animais conscientes. Apesar de os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não terem capacidade de se comunicar verbalmente na ocorrência de dor, eles são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Essas respostas são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente analgésicas, o que permite inferir se um animal de experimentação está experimentando uma resposta álgica (Peraza *et al.*, 2007).

Os testes nociceptivos utilizam estímulos elétricos, térmicos, mecânicos ou químicos. Alguns deles contam a latência de aparecimento de um comportamento de evitação, como um reflexo de retirada da pata ou da cauda a partir de uma estimulação térmica, como os testes da placa quente e retirada de cauda. Outros ensaios, como o analgesímetro de Randall–Selitto realizam estimulação mecânica, com aumento graduação de pressão realizada por uma pinça sobre o animal testado. Por fim, alguns testes nociceptivos contam com a observação e pontuação de comportamentos específicos, como o teste de contorções abdominais, no qual os agentes irritantes são administrados por via intraperitoneal, induzindo um comportamento estereotipado caracterizado por contrações abdominais que são quantificadas; e o teste da formalina, um teste clássico no qual o agente químico é injetado na superfície plantar de uma das patas, resultando em reações como retirada da pata, lambidas, mordidas, ou agitações, que são quantificáveis (Barrot, 2012).

A nocicepção induzida por formalina está associada com lesão tecidual e acredita-se que seja a que mais se assemelha à dor clínica, em comparação com outros testes que empregam estímulos mecânicos ou térmicos. A injeção subcutânea de formalina na pata do rato induz uma resposta bifásica. A fase inicial é de curta duração e inicia imediatamente após a injeção, sendo caracterizada pela ativação das fibras C devido a estímulos periféricos. A fase final é um período mais longo e persistente, causado por inflamação do tecido local e também pelas mudanças funcionais no corno

dorsal da medula espinhal. Desta forma, substâncias que atuam como analgésicos centrais (opioides) inibem ambas as fases, enquanto drogas de ação periférica (AINEs) inibem apenas a segunda fase (Gorzalczany *et al.*, 2011).

1.1.4 Toxicidade de plantas medicinais

Um dos principais problemas relacionados à utilização das plantas medicinais é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos. Entretanto, o uso milenar de plantas medicinais revelou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, as pesquisas mostram que muitas dessas plantas possuem substâncias potencialmente tóxicas e por essa razão devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (Rodrigues, 2011). Por esse motivo, a eficácia e a toxicidade potencial de remédios empregados na medicina popular necessitam ser avaliadas cientificamente (Bussmann, 2011).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas pode-se citar: efeitos hepatotóxicos ocasionados por apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos; ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas; alguns tipos de dermatites causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e furanocumarinas. Além disso, diversas substâncias isoladas de plantas consideradas medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (Veiga Júnior *et al.*, 2005).

Efeitos adversos de produtos naturais podem variar desde sintomas gastrointestinais, processos alérgicos até o risco de óbito. Além disso, substâncias provenientes de plantas são agentes xenobióticos, podendo sofrer metabolismo ativador e assim os efeitos podem não se manifestar de forma imediata, intensificando as ações tóxicas mediante uso crônico, como por exemplo, comprometimento hepático e renal, alterações hematológicas, problemas cardiovasculares, efeitos carcinogênicos e complicações neurológicas (Araújo, 2013).

O Comitê Interinstitucional de Neurotoxicologia define neurotoxicidade como efeitos adversos sobre a estrutura ou função do Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Periférico (SNP), causados por agentes biológicos, químicos ou físicos, os quais podem ser permanentes ou reversíveis e resultar de ações diretas ou indiretas sobre o sistema nervoso (Slikker Jr e Bowyer, 2005).

A avaliação neurotóxica pode ser realizada tanto em testes *in vitro*, com o emprego de culturas de células neuronais de diferentes regiões do cérebro, como por experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes sensoriais, de função motora, neurocomportamentais e cognitivos, visto que as modificações de comportamento animal podem estar relacionadas com lesões neurológicas ou alterações patológicas e bioquímicas (Araújo, 2013).

Os testes de comportamento animal destinam-se à avaliação da neurotoxicidade de compostos em laboratório. Há um grande número de métodos disponíveis para o rastreamento de comportamento e caracterização dos efeitos neurotóxicos, sendo a avaliação da atividade motora bastante apropriada para a triagem inicial de neurotoxicidade. Embora os métodos de avaliação da atividade motora constituam uma abordagem racional de rastreamento de primeiro nível, há uma série de importantes funções, como a memória, a aprendizagem, a atenção, o comportamento social e a resposta sensorial que também são importantes nas metodologias de análises comportamentais (Kulig, 1996). Para avaliação dessas funções, vários tipos de testes podem ser realizados.

O teste do campo aberto é utilizado para verificar o nível de ansiedade dos animais em função do número de quadrantes percorridos e da quantidade de levantamentos (comportamento exploratório) e autolimpezas (Neumann *et al.*, 2011). O teste da barra giratória (rota-rod) é útil para mensurar a coordenação motora e modificações no tônus muscular dos animais após o tratamento farmacológico em função de seu tempo de permanência na barra (Gomes *et al.*, 2010). O teste do labirinto aquático de Morris foi projetado para aferir a aprendizagem e o desempenho da memória espacial, enquanto o labirinto em Y é útil para avaliar o comportamento exploratório e a memória não espacial (Jung *et al.*, 2008). O teste da caixa claro-escuro é uma ferramenta adequada para avaliar os efeitos ansiolíticos de drogas, com base na resposta inata de medo em situações aversivas (Carnevale *et al.*, 2011) e também serve para avaliação da memória dos animais testados quando aplicado um sistema de choque.

É importante ressaltar que as plantas medicinais, seus derivados e constituintes capazes de modificar o comportamento de animais podem ser úteis no tratamento de casos de ansiedade, depressão ou crises epiléticas. Medicamentos à base de plantas, cujo

potencial farmacológico é avaliado em modelos animais e neuroquímicos, podem se tornar novas opções terapêuticas na psiquiatria clínica (Araújo, 2013).

Os estudos sobre as atividades farmacológicas de plantas medicinais, em sua grande maioria, são realizados com administração oral de extratos de plantas. Neste estudo, além da administração por via oral, foi abordada também a administração por via tópica, além da administração por fonoforese. Por esse motivo, apresenta-se a seguir uma breve revisão sobre o tema.

1.1.5 Vias de administração de medicamentos

As principais vias de administração de medicamentos são: oral, sublingual ou bucal, parenteral, tópica, transdérmica, intraocular, intrarrespiratória, retal, intravaginal, intrauterina e uretral. A escolha da via ou sistemas de administração depende de vários fatores, entre eles, o efeito local ou sistêmico da droga, as propriedades farmacêuticas e a forma farmacêutica administrada e o tempo necessário para o início do tratamento (Silva, 2010).

A administração oral constitui a modalidade mais conveniente de administração de drogas. Os medicamentos administrados por essa via podem exercer um efeito local no trato gastrointestinal ou serem absorvidos pela mucosa e atingirem o sangue ou a linfa e agindo de forma sistêmica (Silva, 2010). Segundo Cabral (2002), a via oral também apresenta desvantagens, pois produz absorção variável da substância, movimenta as substâncias através do fígado, local onde um elaborado sistema enzimático pode inativá-las antes que elas cheguem à circulação sistêmica. Além disso, as medicações orais também podem irritar o trato gastrointestinal, descolorir os dentes e ter um sabor desagradável.

A via tópica é utilizada para administrar medicamentos através da pele ou da mucosa. Os medicamentos aplicados por essa via são facilmente aplicados, raramente provocam reações alérgicas e provocam menos reações adversas do que as substâncias administradas pelas vias sistêmicas, porém a absorção depende do nível de hidratação da pele (Cabral, 2002). As drogas aplicadas pela pele devem penetrar em suas camadas, para que o efeito terapêutico seja produzido, sendo que o estrato córneo (camada externa densa e queratinizada) é a principal barreira à absorção de drogas. A presença de uma rede vascular eficiente na derme permite que as drogas que atravessam o estrato córneo sejam imediatamente absorvidas, produzindo também efeitos sistêmicos (Silva,

2010). A introdução de drogas em tecidos moles através da pele intacta pode ser promovida pela aplicação de um aparelho produtor de ondas ultrassônicas, técnica esta denominada fonoforese ou sonoforese. Este é um recurso amplamente utilizado em alguns países como Estados Unidos e países do leste da Europa há muitos anos (Skauen e Zentner, 1983).

1.1.5.1 Ultrassom terapêutico e fonoforese

O ultrassom (US) terapêutico é um aparelho utilizado no campo da Fisioterapia que consiste basicamente em um transdutor vibratório produtor de ondas mecânicas que atravessam a pele, com fins terapêuticos. Essas ondas produzem uma micromassagem nos tecidos, promovendo efeitos locais, tais como: aumento da permeabilidade celular, incremento do metabolismo, vasodilatação e analgesia (Agne, 2005).

O US é uma modalidade de energia sonora longitudinal, de penetração profunda, que, ao ser transmitida aos tecidos biológicos, é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos. A transmissão ocorre pelas vibrações das moléculas do meio através do qual a onda se propaga. Este meio irradiado oscila ritmicamente com a frequência do gerador ultrassônico por efeito piezoelétrico, ao comprimir e expandir a matéria. Para que haja propagação dessas ondas ultrassônicas, é necessário que o meio tenha propriedades elásticas. O movimento de um corpo vibrando é transmitido às moléculas adjacentes, as quais, antes de retornarem à posição de equilíbrio, transmitem esse movimento para as moléculas que estão ao redor (Olsson *et al.*, 2008).

O uso do ultrassom para administrar compostos terapêuticos através da pele remonta à década de 1950, quando foram realizados os primeiros estudos de aplicações de ultrassom terapêutico para a aplicação local de corticosteroides (Polat, *et al.*, 2011). De acordo com Merini *et al.* (2014), o uso do ultrassom em fonoforese possui a capacidade de aumentar a concentração da droga no tecido a ser tratado, aumentando a permeabilidade da pele a moléculas de baixo ou alto pesos moleculares.

Os medicamentos utilizados na fonoforese são anestésicos e anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (Barnes, 2008), porém tem aumentado o interesse a respeito

do uso da fonoforese com extratos e óleos de plantas medicinais, sendo encontrados na literatura vários estudos dessa natureza.

Camargo (2006) relata que a fonoforese do extrato de *Zingiber officinale* promoveu redução significativa do edema de pata induzido por carragenina; de acordo com Muniz (2009), o ultrassom promoveu a facilitação e aceleração da penetração transcutânea do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, favorecendo o seu uso tópico, proporcionando um menor tempo de alcance do pico de ação farmacológica; Maia Filho *et al.*, (2010) verificou a eficácia da fonoforese de gel de *Aloe vera* na tendinite induzida em ratos; Ricoldy *et al.* (2010) verificou os efeitos benéficos da fonoforese do gel extraído da *Calendula officinallis* na recuperação de lesão muscular experimental em ratos; resultados encontrados por Merini *et al.* (2014) demonstram o efeito anti-inflamatório da fonoforese com gel de *Elaeoluma nuda* na artrite induzida em ratos.

Já o estudo de Alfredo *et al.* (2009) verificou que apesar de a *Arnica montana* se mostrar um eficaz anti-inflamatório em lesão muscular aguda quando em uso tópico, durante a aplicação da fonoforese, não foram observados efeitos significativos, podendo a cavitação estável promovida pelo US ter inibido a sua ação farmacológica e bloqueado sua ação terapêutica.

Dessa forma, percebe-se que a fonoforese pode ser uma grande ferramenta na aplicação tópica de plantas medicinais com efeito anti-inflamatório, porém mais estudos necessitam ser realizados para que seus mecanismos sejam elucidados, assim como, verificados quais os tipos de substâncias e quais espécies de plantas podem ser utilizadas nesse tipo de administração.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. sobre inflamação, dor e comportamento animal.

1.2.2 Objetivos Específicos

➤ Avaliar o efeito antiedematogênico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC administrados por via oral, via tópica e fonoforese.

➤ Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC.

➤ Avaliar os efeitos do extrato aquoso bruto das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. sobre o comportamento de ratos Wistar mediante administração durante 21 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Para a preparação do extrato aquoso bruto, foi utilizado o pó das folhas de *M. sylvatica* já disponível no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da UFOPA, o qual foi produzido por meio de desidratação das folhas em estufa a 40 °C seguida de trituração em moinho, e armazenado em embalagens plásticas devidamente lacradas e identificadas.

As folhas que deram origem ao pó foram coletadas no dia 28 de maio de 2009, correspondendo ao período chuvoso do ano. A planta foi coletada no município de Santarém – PA (latitude 02°32'08,9" S e longitude 54°54'23,9 O) em uma área caracterizada como região de savana, às margens da Rodovia PA-457, a qual liga a cidade Santarém à vila de Alter-do-Chão. A identificação da espécie ocorreu por método de comparação, com base nas amostras depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia em Manaus (INPA/AM). A espécie utilizada nesse estudo foi identificada como similar às exsiccatas de nº 163551 e 163770 do herbário do INPA/AM, procedente de Alter-do-Chão, Santarém - PA.

Uma nova coleta de material botânico foi realizada no dia 31 de março de 2013, período chuvoso do ano, no mesmo local, para a extração de óleo essencial das folhas da referida espécie.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO

O extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* foi preparado a partir do pó das folhas diluído em água destilada. Essa mistura foi mantida sobre uma placa quente a 70° C durante 2h e 30min. Após o resfriamento, o extrato foi filtrado em papel filtro Sartorius® (85 g/m², 0,19 mm) e congelado. Após 24h, o produto congelado foi colocado no liofilizador Liotop L101 - Liobras®, onde permaneceu durante sete dias. Após o processo de liofilização, o material desidratado foi pesado e acondicionado em recipientes hermeticamente fechados para posterior utilização nos ensaios biológicos.

2.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As folhas coletadas foram submetidas ao processo de secagem em estufa com recirculação de ar mantida na temperatura de 40 °C, até que o peso da amostra se tornasse constante, o que durou aproximadamente cinco dias. Posteriormente, as folhas secas foram reduzidas a fragmentos menores manualmente, inseridas no balão volumétrico, onde foi adicionada água destilada até a imersão completa das folhas. O óleo essencial das folhas *M. sylvatica* foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger durante o período de 3h. O óleo obtido foi desidratado com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) Merck Millipore® e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração.

2.4 PREPARAÇÃO DO GEL DO EXTRATO AQUOSO

O gel do extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* foi preparado com o extrato aquoso liofilizado dissolvido em gel de carbopol Mercur® na concentração de 20%.

2.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD foi utilizada para determinação de grupos de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso das folhas de *M. sylvatica*, utilizando-se placas de sílica (SiO₂) gel 60 F₂₅₄ como fase fixa e empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento, padrões e reveladores apropriados, conforme a metodologia proposta por Wagner e Bladt (1996), exposta na Tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas para caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *M. sylvatica*.

METABÓLITO	ELUENTE	REVELADOR	PADRÃO	COR
Terpenoides e ácidos graxos	Hex: AcOEt : Acform. 85:10:5	Vanilina sulfúrica	Timol	Cor de rosa
Cumarina glicosídea	AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O 67,5:7,5:17,5	KOH 5% UV 365nm	Esculina	Azul fluorescente
Flavonoides	AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O 67,5:7,5:17,5	NP PEG	Rutina	Laranja

Cumarinas simples	Tolueno: éter 50:50	KOH 5% UV 365nm	1,2- benzopirona	Verde fluorescente
Taninos hidrolisáveis	ButOH: HAc: H ₂ O 40:10:50	Cloreto férrico 1%	Ácido gálico	Azul escuro
Taninos condensados	ButOH: HAc: H ₂ O 40:10:50	Vanilina clorídrica 1%	Catequina	Vermelho

AcOEt = acetato de etila; Acform = ácido fórmico; Hex = hexano; ButOH = n-butanol; HAc: ácido acético; KOH = hidróxido de potássio.

2.6 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFOPA sob protocolo n ° 09008/2013, atendendo às Normas Internacionais de Ética em Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos adultos, com dois a três meses de idade, saudáveis e sedentários, pesando entre 250 e 300 g. Somente para o teste de atividade antinociceptiva com óleo essencial de *M. sylvatica* foram utilizados ratas Wistar fêmeas adultas com peso entre 150 e 200g. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará e ficaram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, com temperatura ambiente de 25 °C e fotoperíodo de 12h claro/escuro controlados, recebendo água e ração à vontade.

Doze horas antes da administração dos tratamentos para os testes farmacológicos, os animais foram privados de ração, para evitar qualquer interferência da comida na absorção dos compostos administrados, com exceção dos animais que participaram dos testes comportamentais com administração do extrato aquoso de *M. sylvatica*.

2.7 TESTES FARMACOLÓGICOS

2.7.1 Teste de atividade antiedematogênica

O teste de atividade antiedematogênica do extrato aquoso e do óleo essencial de *M. sylvatica* foi realizado em modelo de edema de pata induzido por carragenina adaptado de Winter *et al.* (1962).

Para o teste com o extrato aquoso bruto de *M. sylvatica*, os ratos foram divididos nos seguintes grupos (n=7):

- Grupo I (controle negativo) – água destilada (1 mL/kg);
- Grupo II (controle positivo) – Indometacina (10 mg/kg);
- Grupo III – extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* (90 mg/kg) (v.o.);
- Grupo IV – extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* (180 mg/kg) (v.o.);
- Grupo V – extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* (270 mg/kg) (v.o.);
- Grupo VI – gel do extrato aquoso bruto de *M. sylvatica* (20 µL) (tópico);
- Grupo VII – ultrassom;
- Grupo VIII – fonoforese (ultrassom + gel do extrato aquoso).

Para o teste com o óleo essencial de *M. sylvatica*, os ratos foram divididos nos seguintes grupos (n=6):

- Grupo I (controle negativo) – tween 80 a 0,5% em solução salina (1 mL/kg);
- Grupo II (controle positivo) – Indometacina (10 mg/kg);
- Grupo III – óleo essencial de *M. sylvatica* (50 mg/kg) (v.o.);
- Grupo IV – óleo essencial de *M. sylvatica* (100 mg/kg) (v.o.);
- Grupo V – óleo essencial de *M. sylvatica* (200 mg/kg) (v.o.);
- Grupo VI – óleo essencial de *M. sylvatica* (20 µL) (tópico);
- Grupo VII – ultrassom;
- Grupo VIII – fonoforese (ultrassom + óleo essencial).

Os tratamentos administrados por via oral foram aplicados por meio de uma cânula orogástrica, a qual foi acoplada a uma seringa. Para a administração oral dos tratamentos, o extrato aquoso liofilizado foi diluído em água destilada e o óleo essencial em tween 80 a 0,5% em solução salina (0,9%). Já os tratamentos por via tópica foram realizados com aplicação do gel de extrato aquoso a 20% ou óleo essencial puro sobre a região subplantar da pata posterior de direita dos animais com leve fricção durante 1min para facilitar a absorção das substâncias através da pele.

Nos animais expostos à fonoforese, foi aplicado o gel de extrato aquoso ou óleo essencial sobre a região subplantar da pata posterior de direita dos animais, associados ao aparelho de ultrassom Ibramed® com os seguintes parâmetros: transdutor de 10 mm, frequência de 1 MHz, modo pulsado, intensidade de 0,6 W/cm² e duração de 1 minuto. Estes parâmetros foram indicados como eficazes para redução de edema por Camargo

(2006), em um estudo de aplicação de fonoforese com extrato de *Zingiber officinale*. No grupo que recebeu somente ultrassom, foram utilizados os mesmos parâmetros do aparelho, sendo necessário o uso de gel de carbopol (neutro) para a condução das ondas ultrassônicas à pele do animal.

Uma hora após a administração dos tratamentos, cada animal recebeu, no tecido subcutâneo do coxim da pata posterior direita, uma injeção de 0,1 mL de carragenina Sigma® diluída a 1% (p/v) em solução salina (0,9%). O volume da pata foi mensurado por meio de um pletismômetro de pata para ratos EFF 304 Insight®, imediatamente após a aplicação da carragenina (correspondendo ao tempo zero) e nas horas seguintes até 4h após a aplicação da carragenina, com intervalo de uma hora entre as medições.



Figura 3: Teste de edema de pata induzido por carragenina. A: Pletismômetro digital Insight®; B: Imobilização do animal e inserção da pata no aparelho; C: Detalhe da inserção pata na coluna de líquido (solução de detergente líquido a 1%) do pletismômetro.

2.7.2 Teste de atividade antinociceptiva

A atividade antinociceptiva do extrato aquoso e do óleo essencial de *M. sylvatica* foi avaliada por meio do teste da formalina proposto por Dubuisson e Dennis (1977).

Para o teste com o extrato aquoso de *M. sylvatica*, os ratos foram divididos nos seguintes grupos (n=6):

- Grupo I (controle negativo) – água destilada (1 mL/kg);
- Grupo II (controle positivo) – Morfina (2,5 mg/kg) (i.p.);
- Grupo III – extrato aquoso de *M. sylvatica* (90 mg/kg) (v.o.);
- Grupo IV – extrato aquoso de *M. sylvatica* (180 mg/kg) (v.o.).
- Grupo V – extrato aquoso de *M. sylvatica* (270 mg/kg) (v.o.).

Para o teste com o óleo essencial de *M. sylvatica*, as ratas foram divididas nos seguintes grupos (n=6):

- Grupo I (controle negativo) – tween 80 a 0,5% em solução salina (1 mL/kg);
- Grupo II (controle positivo) – Morfina (2,5 mg/kg) (i.p.);
- Grupo III – óleo essencial de *M. sylvatica* (50 mg/kg) (v.o.);
- Grupo IV – óleo essencial de *M. sylvatica* (100 mg/kg) (v.o.);
- Grupo V – óleo essencial de *M. sylvatica* (200 mg/kg) (v.o.);

Uma hora após a administração dos tratamentos, foi realizada a injeção subcutânea de formalina (solução de formaldeído a 1% em solução salina 0,9%) na região plantar da pata posterior direita de todos os animais. Após a aplicação da formalina, os animais foram observados durante dois momentos: de 0 a 5 minutos (fase neurogênica) e de 25 a 30 minutos (fase inflamatória) para a contagem do tempo em segundos que os animais permaneciam lambendo ou mordendo a pata onde havia sido aplicado o agente químico irritante. Para uma observação mais eficiente, os animais foram colocados em uma caixa de vidro transparente e filmados durante os períodos, a fim de minimizar os riscos de erros na contagem do tempo.



Figura 4: Teste da formalina: animal lambendo a pata.

2.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Testes de comportamento animal foram realizados para avaliar a neurotoxicidade da espécie estudada, com administração do extrato aquoso bruto. Para a realização dos testes, os ratos foram divididos em quatro grupos (n=9), sendo um controle negativo e os demais grupos de tratamento com diferentes doses.

- Grupo I (controle negativo) – água destilada (1 mL/kg) (v.o.);
- Grupo II – extrato aquoso de *M. sylvatica* (90 mg/kg) (v.o.);
- Grupo III – extrato aquoso de *M. sylvatica* (180 mg/kg) (v.o.);
- Grupo IV – extrato aquoso de *M. sylvatica* (270 mg/kg) (v.o.).

Os animais receberam os respectivos tratamentos durante 28 dias e a partir do 21º dia de tratamento todos os grupos de animais passaram pelos cinco testes comportamentais descritos a seguir.

Tabela 1: Distribuição temporal dos testes comportamentais realizados.

21º dia	Labirinto em Y
22º dia	Campo aberto
23º e 24º dias	Caixa claro-escuro
25º e 26º dias	Labirinto aquático
27º e 28º dias	Barra giratória

2.8.1 Labirinto em Y

O labirinto que foi utilizado para a realização do teste consiste em um equipamento em madeira, na forma de Y com braços medindo 10 cm de largura, 34 cm de altura e 43 cm de comprimento, tendo um ângulo de 120° entre os mesmos. No teste, realizado conforme o proposto por Sarter *et al.* (1988), os animais foram colocados individualmente no labirinto por um período de oito minutos, tempo no qual, estes puderam se deslocar livremente entre os braços do labirinto. Registrou-se a sequência de entradas nos braços do labirinto, nomeados como A, B e C, durante o tempo estipulado. Entre os testes, todo o labirinto foi limpo com álcool a 5% em água destilada, a fim de remover os odores e resíduos que pudessem interferir na livre escolha dos animais pelos braços do labirinto.

As informações foram analisadas para determinar o número de entradas nos braços sem repetições, ou seja, o número de tríades em que todos três braços foram representados (ABC, CAB, BCA, CBA ou ACB), não sendo consideradas alternâncias as tríades como CAC. A porcentagem de alternância para cada rato foi definida como a razão entre o número real de alternâncias e o possível número (número total de entradas nos braços menos dois) multiplicado por 100, tal como demonstrado pela seguinte equação:

$$\% \text{ de alternância} = [(\text{número de alternâncias}) / (\text{total entradas nos braços} - 2)] \times 100$$



Figura 5: Teste do labirinto em Y.

2.8.2 Campo Aberto

O campo aberto (Broadhurst, 1957) consiste em uma arena circular de madeira pintada de branco, com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura. Duas linhas circulares concêntricas dividem o fundo dessa arena em duas partes (periférica e central), e segmentos de reta dividem essa arena em nove áreas, sendo oito quadrantes periféricos e quatro quadrantes centrais.

Para o teste, todos os animais foram colocados individualmente no centro da arena e puderam caminhar livremente, sendo observados e filmados durante o período de cinco minutos. Na análise posterior dos vídeos, foram contabilizados os seguintes parâmetros de cada animal:

- Número de quadrantes centrais percorridos;
- Número de quadrantes periféricos percorridos;
- Número de levantamentos do animal sobre as patas traseiras sem apoio nas paredes da arena;
- Tempo de imobilidade (total ausência de movimentos) em segundos;
- Número de autolimpezas;
- Número de bolos fecais.

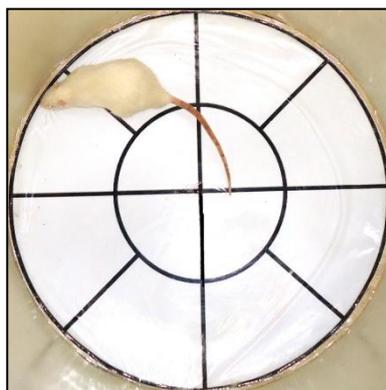


Figura 6: Teste do campo aberto.

2.8.3 Caixa claro-escuro

A caixa claro-escuro EP 158 Insight® utilizada consiste em uma caixa de acrílico medindo 46 x 27 x 30 cm, dividida em um compartimento claro (maior) e outro escuro (menor), com um pequeno espaço de passagem entre os dois compartimentos, barras de aço inoxidável no fundo e conectada a um equipamento eletrônico capaz de emitir choque elétrico. O teste foi realizado conforme o proposto por DeNoble *et al.* (1986), a fim de avaliar a memória aversiva, baseando-se na tendência natural dos ratos de ir para o compartimento escuro logo após ser colocado no compartimento claro.

No primeiro dia de teste, cada animal foi colocado individualmente no compartimento claro da caixa. No momento em que o rato entrava no compartimento escuro (passagem dos quatro membros pela divisória) foi acionado um choque de 1 mA durante dois segundos. A retenção do aprendizado foi testada após 24h, quando os animais foram colocados novamente no compartimento claro e foi registrado o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro.



Figura 7: Teste da caixa claro-escuro

2.8.4 Labirinto aquático

A memória e aprendizagem espacial dos animais foram testadas por meio do teste do labirinto aquático, proposto por Morris (1984). O labirinto aquático utilizado consiste em uma caixa d'água de 500 L, preenchida até 20 cm da borda com água mantida à temperatura de 25°C. A caixa foi dividida em quatro quadrantes imaginários, demarcados por quatro pontos: Norte (N), Sul (S), Leste (L) e Oeste (O), os quais serviram como ponto de partida para os animais durante o teste. Uma plataforma submersa medindo 10 cm x 10 cm foi escondida em um local fixo, um centímetro abaixo da superfície da água, na qual foi adicionada tinta branca atóxica para tornar a superfície opaca e impedir a visualização da plataforma. Próximo à caixa d'água, foi colocada uma lâmpada incandescente de 60 W, com a finalidade auxiliar na visualização do ambiente.

No primeiro dia do teste, foi realizado um treino com os animais, para que estes aprendessem a localizar a plataforma submersa. Dessa forma, cada animal foi colocado individualmente na caixa d'água, de frente para a borda do tanque, e teve a oportunidade de nadar livremente, observando os pontos de referência para procurar a plataforma durante 120 segundos, no máximo. Os animais que não encontraram a plataforma no tempo pré-estabelecido foram colocados manualmente sob a plataforma por 10 segundos para visualização do ambiente. Todos os animais foram submetidos ao treino quatro vezes, sendo um para cada ponto de partida (N, S, L e O).

No dia seguinte, 24h após o treino, foi realizado o teste, sendo registrado o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma em cada ponto de partida estabelecido.

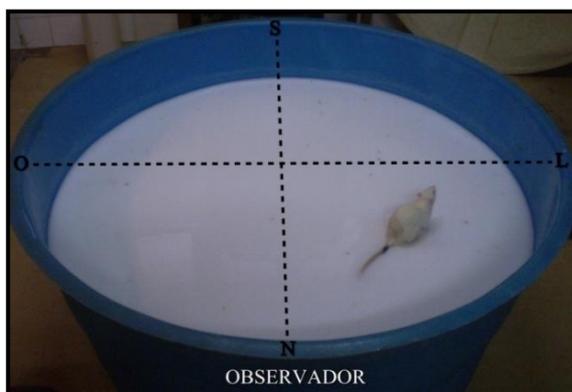


Figura 8: Teste do labirinto aquático
Foto: Elenn Aranha

2.8.5 Barra giratória – rota-rod

Proposto por Dunham e Miya (1957), o teste da barra giratória é útil na verificação da ação de agentes farmacológicos sobre a coordenação motora dos animais. O rota-rod é um aparelho motorizado constituído de uma barra giratória não escorregadia, dividida em quatro compartimentos iguais e com velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.). Neste estudo, foi utilizado o rota-rod para ratos EFF 411 Insight®, na velocidade de 10 rotações por minuto.

No primeiro dia de teste, para que ocorresse a habituação com o aparelho, foi realizado um treino com os animais, dividido em três séries de dois minutos de duração. No treino, quando os animais caíam, estes eram reconduzidos à barra quantas vezes fossem necessárias, dentro do tempo estipulado.

Após 24h os animais foram submetidos ao teste, e cada animal foi colocado novamente sobre a barra giratória, em três séries de 2min. Foi contabilizado o tempo de permanência de cada animal sobre a barra em segundos e o resultado foi obtido pela média de tempo, levando-se em consideração as três séries realizadas, sem reconduções à barra em caso de queda.



Figura 9: Teste da barra giratória.

2.9 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média para os respectivos experimentos e analisados, empregando-se o teste de Análise de Variância ANOVA *one way* e teste de Tukey *a posteriori*, considerando o valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância estatística.

REFERÊNCIAS

- AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia: teoria e prática**. Santa Maria: Orium, 2005.
- AKKOL, E. K.; ACIKARA, Ö. B.; SÜNTAR, I.; ERGENE, B., CITOGLU, G. S. Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera* species: In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 261–270, 2012.
- ALFREDO, P. P.; ANARUMA, C. A.; PIÃO, A. C. S.; JOÃO, S. M. A.; CASAROTTO, R. A. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. **Ultrasonics**, v. 49, p. 466–471, 2009.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225–234, 2006.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**. 3. ed. Salvador : EDUFBA, 2011.
- ALMEIDA, N.A.S. **Espécies de *Myrcia* (Myrtaceae) nativas da região de Santarém-Pará**. 2009. 73f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Pará – Campus de Santarém, Santarém, 2009.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 189–212, 2013.
- APRILE, F. M.; SIQUEIRA, G. W. **Etnoconhecimento e cultivo de plantas medicinais**. Curitiba, CRV, 2012.
- ARANHA, E.S.P. **Efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e toxicológico de *Myrcia sylvatica* D.C. - Myrtaceae**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências da Educação, Programa de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2010.
- ARAÚJO, E. J. F. **Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz**. 2013. 101 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- BABU, N. P.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebeck* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 356–360, 2009.
- BAKER, K. C.; NICKLIN, S.; MILLER, K. The role of carrageenan in complement activation. **Fd Chem. Toxic**, v. 24, n. 9, p. 891-895, 1986.

- BARBOSA, W. L. R. (org.) *et al.* **Etnofarmácia**: fitoterapia popular e ciência farmacêutica. Belém, NUMA/UFPA, 2009.
- BARREIRO, O.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Molecular Basis of Leukocyte–Endothelium Interactions During the Inflammatory Response. **Rev Esp Cardiol**, v. 62, n. 5, p. 552–562, 2009.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.
- BATISTA, N. Y.; PEDROSO, R. S.; ARANHA, E. S. P.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. **Avaliação da toxicidade do extrato aquoso e óleo essencial de *Myrcia sylvatica* D.C. frente ao bioensaio em *Artemia salina***. Resumo. Anais da 62a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2010.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o Sistema Nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008
- BOTELHO, Priscilla S.; MORAES, Marcílio M.; NEVES, Ilzenayde A.; NEVES, Roberta C. S.; CÂMARA, Cláudio A. G. **Composição química e atividade acaricida do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC**. Anais da 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. **Resolução RDC n. 14, de 31 de março de 2010**. Diário Oficial da União. Brasília, 2010.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo, Patologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psycho genetics. **Experiments in Personality**. Londres: Routledge and Paul, 1957.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BUSSMANN, R.W. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 121– 140, 2011.
- CABRAL, I. E. (rev. téc.). **Administração de medicamentos**. Rio de Janeiro: Reichmann & Afonso Editores, 2002.
- CAMARGO, L. C. S. **Efeito anti-inflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos**. 2006. Dissertação

(Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

CARNEVALE, G.; DI VIESTI, V.; ZAVATTI, M.; ZANOLI, P. Anxiolytic-like effect of *Griffonia simplicifolia* Baill. seed extract in rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 848–851, 2011.

CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. G. **Qualidade em plantas medicinais**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros). Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf. Acesso em: 21 out. 2012.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor: atualização terapêutica. **Rev Bras Anestesiol**, v. 48, n. 3, p. 221-241, 1998.

CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C. L.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405–411, 2008.

CERQUEIRA, M. D., SOUZA-NETA, L. C., GUEDES, M. L. S.; RIVELINO, R.; CRUZ, F. G. Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1421–1423, 2013.

CHAPMAN, K. E.; COUTINHO, A. E.; ZHANG, Z.; KIPARI, T.; SAVILL, J. S.; SECKLA, J. R. Changing glucocorticoid action: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, p. 82–92, 2013.

COELHO, E. B. Mecanismos de formação de edemas. **Medicina**, v. 37, p. 189-198, jul./dez. 2004.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 159-175, 2009.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (Supl.), p. 785-797, 2008.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F. COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim**, v. 3, n. 1, p. 241-256, 2009.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, 11: 47-52, 2004.

- DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKER, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.24, n.4, p.1123-1128, 1986.
- DIGNANI, D. F. ***Peperomia blanda* (Piperaceae):** avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante. 2009. 109 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- DIMASI, D. SUN, W. Y.; BONDER, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 1167–1175, 2013.
- DOLGACHEV, V.; LUKACS, N.W. Acute and Chronic Inflammation Induces Disease Pathogenesis. In: **Essential Concepts in Molecular Pathology**: Elsevier, 2010.
- DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicado às ciências médicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- 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**, v. 4, p. 161–174, 1977.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, 46: 208-209, 1957.
- DUTRA, S. *et al.*. **Controle integrado de plantas invasoras em pastagens cultivadas no município de Terra Alta, nordeste Paraense**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004.
- ESCHER, Silvia Katrine Silva; PONTES, Andresson Fernandes; QUEIROZ, Sândrea Ozane do Carmo. **Avaliação antifúngica do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* extraído no período chuvoso e seco sobre cepas patogênicas de *Candida sp.*** 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.
- ETHUR, L.Z. *et al.* Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí - RS. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.
- FARIA, J. L. *et al.* **Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- FECHO, K.; MANNING, E. L.; MAIXNER, W.; SCHMITT, C. P. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p. 68–78, 2007.
- GARLAND, E. L. Pain Processing in the Human Nervous System: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Prim Care Clin Office Pract**, v. 39, p. 561–571, 2012.

GEERING, B.; Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 8, aug., 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, abr. 2007.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 287-293, 2010.

GORZALCZANY, S.; MARRASSINI, C.; MIÑO, C. ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 733–738, 2011.

GOVAERTS, R. (2013). **World Checklist of selected plant species**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: http://apps.kew.org/wcsp/namedetail.do?name_id=131669. Acesso em 14. nov. 2013.

GRESSLER, E. , PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.29, n.4, p.509-530, out./dez. 2006

GUGINSKI, G. Dor: o que sabemos sobre ela? **Perspectivas online**, v. 2, n. 7, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* - Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v.30, p. 49-57, 2000.

JUNG, W. R., KIM, H. G., KIM, K.L. Ganglioside GQ1b improves spatial learning and memory of rats as measured by the Y-maze and the Morris water maze tests. **Neuroscience Letters**, v. 439, p. 220–225, 2008.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da neurociência**. 4. ed. Barueri: Manole, 2003.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 556–592, 2012.

KULIG, B. *et al.* Animal behavioral methods in neurotoxicity assessment: SGOMSEC joint report. **Environmental health perspectives**, v. 104, v. 2, p. 193-204, 1996.

KUMAR, V. *et al.* **Patologia Robbins e Cotran**: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

- LAMEIRA, O.A; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular.** Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2008.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49:508-536.
- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601–606, 1969.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.
- LUSTOSA, D. C.; BERNARDES, V. P.; VIEIRA, T. A.; ANDRADE, D. I. M. **Uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos de espécies florestais.** Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE – 12 a 16/12/2011
- MAIA FILHO, A. L. M.; VILLAVERDE, A. B.; MUNIN, E.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Comparative study of the topical application of *Aloe vera* gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 36, n. 10, p. 1682-1690, 2010.
- MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 2003.
- MERINI, L. R.; FURTADO, S. C.; OLIVEIRA, M. M. B.; CARNEIRO, A. L. B.; BOECHAT, A. L.; BARCELLOS, J. F. M. Attenuation of adjuvant-induced arthritis in rats by phonophoresis with an aqueous gel of the Amazonian plant *Elaeoluma nuda* (Sapotaceae). **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 231-235, 2014.
- MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. 1984. **Journal Neuroscience Methods**, 11: 47–60.
- MUNIZ, J. W. C. **Estudo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos.** 2009. 135 fls. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular – Universidade Federal do Pará: Belém, 2009.
- NAKAMURA, M. J. *et al.* Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170–1175, 2010.
- NEUMANN, I.D.; WEGENER, G.; HOMBERG, J.R.; COHEN, H.; SLATTERY, D.A.; ZOHAR, J.; OLIVIER, J.D.A.; MATHÉ, A.A. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1357-1375, 2011.
- NONATO, F. R.; SANTANA, D.G.; MELO, F. M.; SANTOS, G. G. L.; BRUSTOLIM, D.; CAMARGO, E. A.; SOUSA, D. P.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory properties of rose oxide. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 779–784, 2012.

OLSSON, D. C.; VILLAMIL, V. M. M.; PIPPI, N. L.; MAZZANTI, A.; TOGNOLI, G. K. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p.1199-1207, jul., 2008.

PERAZA, G.P. *et al.* O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittale**, Rio Grande, v. 19, n.1, p. 35-44, 2007.

PICK, R.; BRECHTEFELD, D.; WALZOG, B. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. **Molecular Immunology**, v. 55, p. 70– 75, 2013.

PINHEIRO, B. G. **Composição química e efeitos antinociceptivo e antiinflamatório em roedores do óleo essencial de *Peperomia serpens* (Sw) Loud.** 2011. 103 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, 2011.

POLAT, B. E.; HART, D.; LANGER, R.; BLANKSCHTEIN, D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. 330–348, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. HENDERSON, G. **RANG & DALE Farmacologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RECCHIUTI, A. Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 107, p. 64– 76, 2013.

RICOLDY, D. S.; BOTURA, A. C. A.; ODA, J. Y.; TAKEMURA, O. S. Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2010.

ROCHA, R. P.; MELO E. C.; RADÜNZ L. L. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: a review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 33, p. 7076-7084, 2011.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, v. 13, n. 3, 2011.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 396–401, 2011.

SANTOS, J. A.; ARRUDA, A.; SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C; KASSUYA, C. A. L; ARENA, A. C. Anti-inflammatory effects and acute toxicity of hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* roots in adult male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 802–805, 2012.

- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and antagonist β -carboline. **Psychopharmacology**, v. 94, p. 491–495, 1988.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2001.
- SHERWOOD, E.R.;TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, London, v. 18, n. 3, p. 385-405, sep. 2004.
- SILVA, F. K. S. **Sinopse e composição química dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae comercializadas como pedra-ume-caá em Belém-Pará**. 2012. 72 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural da Amazônia: Belém, 2012.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- SKAUEN, D. M.; ZENTNER, G. M. Phonophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, p. 235-245, 1983.
- SLIKKER JR, W.; BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 206, n. 2, p. 255-260, 2005.
- SMITH, N. *et al.* **Flowering plants of Neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19882>>. Acesso em: 14 Nov. 2013
- SOUSA, L. P.; ALESSANDRI, A. L.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 625–631, 2013.
- SOUZA , C. C.V.; SCUDELLER, V. V. Os quintais nas comunidades Julião e Agrovila Amazonino Mendes, baixo Rio Negro, Manaus-AM. In: SANTOS-SILVA, E. N.; CAVALCANTI, M. J.; SCUDELLER, V. V. (Org.). **BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central** - v. 3, Manaus, 2011.
- SOUZA FILHO, A.P.S. *et al.* Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta daninha**, v. 24, n. 4, Dec. 2006.
- STABLES, M. J., GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 35–51, 2011.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 179–187, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, Junho 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis – a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Springer: Berlim, 1996.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, 1962.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, p. 107-117, 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. Essential oils from three Myrcia species. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 18, p. 421–424, 2003.

3 CAPÍTULO I

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO EXTRATO AQUOSO BRUTO E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.¹

Marissol R. Almeida
Adrielle N. S. Bezerra
Soraia B. Santos
Wania C. R. Silva
Ana P. F. Assunção
Rosa H. V. Mourão
Ricardo B. Oliveira

¹ Artigo a ser traduzido e submetido para publicação na Revista “Journal of Medicinal Plant Research”

Avaliação da atividade antiedematogênica, antinociceptiva e efeitos comportamentais do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.

M. R. Almeida; A. N. S. Bezerra; S. B. Santos; W. C. R. Silva; A. P. F. Assunção; R.H.V. Mourão; R. B. Oliveira

Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil

RESUMO

O presente estudo expõe a avaliação do potencial antiedematogênico, antinociceptivo e os efeitos de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC sobre o comportamento animal em ratos wistar, por meio dos testes de edema de pata induzido por carragenina, formalina, campo aberto, labirinto em Y, caixa claro-escuro, labirinto aquático e barra giratória (rota-rod). Os resultados obtidos indicaram que o extrato aquoso de *M. sylvatica* reduziu significativamente o edema de pata nas doses orais de 90, 180 e 270 mg/kg, assim como na aplicação tópica e na aplicação por fonoforese (redução de até 66.9% do edema na dose de 270 mg/kg), demonstrou efeito antinociceptivo nas doses de 180 e 270 mg/kg nas duas fases do teste da formalina (inibição de até 60,2% da resposta nociceptiva na dose de 270 mg/kg) e também não apresentou efeito sobre o comportamento animal (neurotóxico) após administração durante 21 dias. A análise fitoquímica do extrato aquoso por cromatografia em camada delgada revelou a presença de flavonoides e taninos. O óleo essencial de *M. sylvatica* não mostrou efeito antiedematogênico em nenhuma das doses testadas (50, 100 e 200 mg/kg), porém revelou importante efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste aplicado, nas três doses utilizadas (inibição de até 98,8 % na dose de 50 mg/kg).

Palavras-chave: *Myrcia sylvatica*; edema; fonoforese; nocicepção; comportamento animal.

INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae é encontrada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com muitas espécies concentradas na região tropical da América e na Austrália (Smith *et al.*, 2004). Essa família é uma das mais importantes do Brasil, na qual se destacam os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthus*, com mais de uma centena de espécies, enquanto os demais gêneros possuem menos de 60 espécies brasileiras (Gressler *et al.*, 2006). Destes, *Eugenia* e *Myrcia* são os dois mais importantes, compreendendo cerca de 550 e 250 espécies, respectivamente (Nakamura *et al.*, 2010).

Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC. é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul, desde a Costa Rica até o Brasil, onde ocorre nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste

(Amorim e Alves, 2001; Sobral *et al.*, 2013). É mencionada na literatura com os nomes populares de “murtinha” (Dutra *et al.*, 2004) e “vassourinha” (Souza e Scudeller, 2011), nomes também empregados para denominar várias outras espécies de Myrtaceae.

Segundo Silva (2012), a *M. sylvatica* é comercializada na região metropolitana de Belém-PA com o nome popular “pedra-ume-caá”, no entanto, este nome também é atribuído a diversas espécies dos gêneros *Myrcia* e *Eugenia*. As espécies denominadas de pedra-ume-caá são conhecidas como insulina vegetal, por apresentar efeitos hipoglicemiantes, sendo utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diferentes enfermidades, tais como, diabetes, aftas, leucemia, ferimentos e doenças infecciosas.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade farmacológica de *M. sylvatica*, verificando os efeitos antiedematogênico e antinociceptivo do extrato aquoso bruto e do óleo essencial, assim como avaliar os efeitos da administração do extrato aquoso da referida espécie sobre o comportamento animal. Nos testes de atividade antiedematogênica, buscou-se avaliar os efeitos da administração pelas vias oral, tópica e por fonoforese, uma forma de administração de substâncias em tecidos moles através da pele intacta, promovida pela aplicação de um aparelho produtor de ondas ultrassônicas (Skauen e Zentner, 1983), também denominado de ultrassom terapêutico.

Apesar de a *M. sylvatica* ser bastante utilizada como planta medicinal, não foram encontrados na literatura científica outros estudos a respeito de suas atividades farmacológicas, o que revela a necessidade da realização de pesquisas sobre a espécie, a fim de que suas propriedades farmacológicas e seus efeitos tóxicos sejam determinados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processamento do material vegetal

Extrato aquoso (EA)

O material vegetal utilizado para a preparação do EA foi coletado em março de 2009, em Santarém, Pará, Brasil. As folhas de *M. sylvatica* foram mantidas em estufa a 40 °C durante 5 dias para secagem, e posteriormente trituradas até a formação de pó, o qual foi dissolvido em água destilada 1:6 (p/v). Essa solução foi concentrada sob aquecimento em placa quente a 70 °C (2h e 30min) sob agitação constante. Após esse processo, o EA foi filtrado utilizando-se papel filtro Sartorius® (85 g/m², 0,19 mm) e congelado. Após 24h, o produto congelado foi submetido ao processo de liofilização no liofilizador Liotop L101 - Liobras® e posteriormente foi armazenado em frasco âmbar até a realização dos testes.

Óleo essencial (OE)

Para a extração do OE, a *M. sylvatica* foi coletada no mês de março de 2013 em Santarém, Pará, Brasil. As folhas foram mantidas em estufa a 40 °C por 5 dias. O OE das folhas secas foi extraído pelo sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger, durante o período de 3h. O óleo essencial coletado foi desidratado com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) Merck Millipore® e mantido em frasco âmbar sob refrigeração até a realização dos testes.

Triagem fitoquímica

Foi realizada Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para verificar a presença dos grupos de metabólitos secundários (terpenos, ácidos graxos, cumarinas simples, cumarinas glicosídeas, taninos condensados, taninos hidrolisáveis e flavonoides) no EA das folhas de *M. sylvatica*, utilizando-se placas de sílica (SiO₂) gel 60 F₂₅₄ como fase fixa e diversos sistemas de eluentes, reveladores e padrões específicos, segundo a metodologia de Wagner e Bladt (1996).

Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (250-300 g). Somente para o teste de atividade antinociceptiva com OE foram utilizadas ratas Wistar fêmeas adultas (150–200g). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com temperatura ambiente de 23±2°C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração à vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFOPA sob protocolo nº 09008/2013 e todos os procedimentos obedeceram às Normas Internacionais de Ética em Experimentação Animal.

Atividade antiedematogênica

O teste de edema de para induzido por carragenina descrito por Winter *et al.* (1962) foi utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico do EA e do OE de *M. sylvatica*. Para o teste com EA os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=7): controle negativo: água destilada 1 mL/kg (oral); controle positivo: indometacina 10 mg/kg (oral); EA nas doses de 90, 180, 270 mg/kg (oral); EA 20 µL (tópico); ultrassom + gel condutor (1MHz; 0,6 W/cm², 1 min); fonoforese (ultrassom + extrato aquoso). Para o teste com OE os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6): controle negativo: tween 80 a 0,5% em solução salina

(oral); controle positivo: indometacina 10 mg/kg (oral); OE nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (oral) diluído em solução de tween 80; OE puro 20 µL (tópico); ultrassom + gel condutor (1MHz; 0.6 W/cm², 1 min); fonoforese (ultrassom + OE puro). Foi aplicada uma injeção subcutânea de carragenina Sigma® a 1% (0,1 mL na região plantar da pata posterior direita) em todos os animais 30min após a administração dos tratamentos. O volume da pata foi mensurado imediatamente após a aplicação da carragenina e após 1, 2, 3 e 4 h, utilizando-se o pletismômetro digital FF304 Insight®.

Atividade antinociceptiva

O procedimento realizado para avaliação de atividade antinociceptiva foi o teste da formalina proposto por Dubuisson e Dennis (1977). Para o teste com EA os animais foram divididos nos grupos (n=6): controle negativo: água destilada 1 mL/kg (oral); controle positivo: morfina 2,5 mg/kg (intraperitoneal); EA nas doses de 90, 180, 270 mg/kg (oral). No teste com OE os animais foram divididos nos grupos (n=6): controle negativo: tween 80 a 0,5% em solução salina; controle positivo: morfina 20 mg/kg; OE nas doses 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) diluído em solução de tween 80 a 0,5 %, todos administrados por via oral.

Uma hora após a administração dos tratamentos, foi injetado o volume de 20µL de formalina (formaldeído a 1% em solução salina 0,9%) foi aplicado no coxim plantar posterior direito dos ratos. Após a injeção de formalina, os animais foram individualmente colocados em uma caixa de vidro e filmados nos tempos de 0 a 5min (fase neurogênica) e de 25 a 30min (fase inflamatória). O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado em ambas as fases e considerado como indicativo de nocicepção.

Efeitos Comportamentais

Os ratos foram divididos em 4 grupos (n=9) e receberam os tratamentos por via oral: água destilada 1 mL/kg e EA nas doses 90, 180 e 270 mg/kg durante 21 dias. Após esse período foram realizados os testes descritos a seguir, a fim de verificar possíveis efeitos sobre comportamento e memória em decorrência da administração do EA de *M. sylvatica*.

Campo aberto

Para avaliar o comportamento exploratório e ansiedade dos ratos, foi aplicado o teste do campo aberto (Broadhurst, 1957). O campo aberto consistiu de uma arena circular com 60 cm de diâmetro, cujo piso era dividido em 12 quadrantes, sendo 4 centrais e 8 periféricos. Os animais foram colocados na arena durante 5min e com uma câmera digital foram registrados

todos os seus movimentos. Na análise dos vídeos foram verificados: número de quadrantes centrais e periféricos percorridos, número de levantamentos sobre as patas traseiras, número de bolos fecais, número de autolimpezas e tempo de imobilidade em segundos.

Labirinto em Y

O teste do labirinto em Y, proposto por Sarter *et al.* (1988), foi realizado a fim de avaliar a memória de curta duração dos ratos. O labirinto em forma de Y, confeccionado em madeira e pintado com tinta escura, possui três braços com ângulos de 120° entre eles, sendo 3 braços iguais com 43 cm de comprimento (denominados de A, B e C). Todos os braços possuem 10 cm de largura e paredes de 30 cm de altura. Durante o teste, cada rato foi colocado no mesmo ponto de partida (braço mais longo) deixando-o livre para caminhar no labirinto durante 8min. Foram registrados manualmente a sequência e o número de entradas em cada braço. O número de tríades em que todos três braços foram representados, por exemplo, ABC, CAB ou BCA, foi considerado como uma alternância para estimar a memória de curto prazo. Não foram consideradas alternâncias as tríades como CAC devido à repetição de braços.

Caixa claro-escuro

Este teste foi aplicado para avaliar a memória aversiva, baseado em DeNoble *et al.* (1986). A caixa é composta por um compartimento claro e outro escuro, com um pequeno espaço de passagem entre os dois e o fundo eletrificado. Ao ser colocado no compartimento claro, o rato possui a tendência natural de ir para o compartimento escuro, momento no qual foi acionado um choque de 1 mA por 2s. A retenção do aprendizado foi testada após 24h, quando os animais foram colocados novamente no compartimento claro e o tempo de latência para a entrada no lado escuro foi registrado.

Labirinto aquático de Morris

O teste do labirinto aquático desenvolvido por Morris (1984) é um instrumento utilizado para avaliar a memória e aprendizado espacial de ratos. O labirinto utilizado consistiu em uma caixa d'água de 500 L preenchida com água até 20 cm da borda e uma plataforma fixa (10 x 10 cm) localizada 1 cm abaixo da superfície. A água foi mantida na temperatura de aproximadamente 25 °C e nela foi adicionada tinta branca atóxica para impedir a visualização da plataforma. Próximo à caixa d'água foi colocada uma lâmpada (60W) para auxiliar a localização da plataforma. O teste foi realizado em 2 dias, sendo o 1º

um treino para que os animais aprendessem a localizar a plataforma. A caixa foi dividida em 4 quadrantes e cada animal foi colocado 4 vezes no labirinto, tomando como ponto de partida cada um dos quadrantes. Após ser colocado na água, o animal pôde nadar livremente durante 120 s ou até encontrar a plataforma e quando não a encontrava era colocado manualmente sobre a plataforma por 10 s para memorizar o ambiente. Após 24h do treino, foi realizado o mesmo procedimento, verificando-se o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma nos 4 pontos de partida.

Barra giratória (rota-rod)

Proposto por Dunham e Miya (1957), este teste é utilizado para detectar a ação de agentes farmacológicos sobre a coordenação motora dos animais. Foi utilizado o aparelho de rota-rod para ratos EFF 411 Insight®, na velocidade de 5 rotações por minuto. Primeiramente foi realizado um treino com os animais durante 2min para que aprendessem a caminhar sobre a barra giratória. No dia seguinte, foi realizado o teste, registrando o tempo de permanência do animal sobre o aparelho em 3 séries de 2min cada. A média das 3 séries foi considerada como o tempo de permanência do animal no aparelho expressa em segundos.

Análise estatística

Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão. Para a análise e comparação de dados foi aplicada Análise de Variância ANOVA one-way e teste Tukey *a posteriori*, considerando $p < 0,05$ como limite de significância estatística.

RESULTADOS

Triagem fitoquímica

A tabela 1 apresenta o perfil cromatográfico do EA de *M. sylvatica* via CCD frente aos padrões fitoquímicos comerciais timol, esculina, rutina, 1,2-benzopirona, catequina e ácido gálico.

Atividade antiedematogênica

A figura 1 mostra o efeito antiedematogênico do EA de *M. sylvatica*, tanto por via oral quanto tópica. Os resultados obtidos indicaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do edema de pata em comparação com o grupo controle negativo em todas as horas avaliadas. Todos os grupos de tratamento apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle negativo

(água) em todas as horas avaliadas. A tabela 2 apresenta os valores da inibição do edema em porcentagem para todos os grupos de tratamento do teste com EA.

A figura 2 mostra que o OE de *M. sylvatica* em todas as formas de administração (oral, tópica e fonoforese) não apresentou a atividade antiedematogênica em nenhuma das horas, uma vez não houve redução significativa do edema de pata em comparação com o grupo controle negativo (tween 80 0,5%). A droga padrão indometacina, conforme o esperado, reduziu o edema significativamente em todas as horas em ambos os testes. O ultrassom também reduziu o edema de forma significativa em todas as horas avaliadas.

Atividade antinociceptiva

Os resultados obtidos no teste da formalina indicaram que tanto o EA quanto o OE de *M. sylvatica* mostraram efeito antinociceptivo na 1ª e na 2ª fase do teste. Os grupos experimentais das doses 180 e 270 mg/kg (EA) e 50, 100 e 200 mg/kg (OE) apresentaram redução significativa da resposta nociceptiva em relação aos grupos controles negativos, conforme as figuras 3 e 4. As tabelas 3 e 4 apresentam os valores da inibição da resposta nociceptiva em porcentagem para todos os grupos de tratamento do teste com EA e OE, respectivamente.

Efeitos comportamentais

No teste do campo aberto (Fig. 5), não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos ratos, pois não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao grupo controle para nenhum dos parâmetros avaliados (números de quadrantes periféricos e centrais percorridos, autolimpezas, bolos fecais, levantamentos e tempo de imobilidade).

No teste do labirinto em Y (Fig. 6), não foi verificada alteração na memória de curta duração dos ratos, uma vez que não houve diferença significativa na porcentagem de sequências corretas em nenhum dos grupos comparado com o grupo controle.

No teste da caixa claro-escuro (Fig.7), verificou-se que a memória aversiva dos animais não foi afetada, pois não foi observado aumento significativo no número de entradas no compartimento escuro 24h após a realização do treino em comparação com o grupo controle. Observou-se que mais de 71% dos animais, em todos os grupos avaliados, não entraram novamente no compartimento escuro, contabilizando o tempo máximo de latência (180s) de permanência no compartimento claro.

No teste do labirinto aquático (Fig. 8), não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao tempo para encontrar a plataforma nos quatro quadrantes, indicando que não houve nenhuma alteração na memória espacial dos ratos testados.

Quanto ao teste da barra giratória (Fig. 9), os dados coletados demonstram que não houve efeitos sedativos ou interferência na coordenação motora dos animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle e os animais demonstraram capacidade semelhante de locomoção, equilíbrio e força em todos os grupos.

DISCUSSÃO

O teste de edema de pata induzido por carragenina é um teste adequado para avaliar drogas anti-inflamatórias e tem sido frequentemente usado para avaliar os efeitos antiedematogênicos de produtos naturais (Shah e Alagawadi, 2011). Este tipo de teste induz uma reação inflamatória em duas diferentes fases. A primeira fase ocorre entre 0 e 2,5 h após da injeção do agente flogístico, é atribuída à ação da histamina, serotonina e bradicinina sobre a permeabilidade vascular. O volume de edema atinge o seu pico cerca de 3 h pós-tratamento e, em seguida, começa a declinar. A fase final é resultante da produção de prostaglandinas nos tecidos (García *et al.*, 2004; Akkol *et al.*, 2012). O EA de *M. sylvatica*, tanto por via oral, quanto tópica e por fonoforese inibiu o edema desde a primeira hora, atuando tanto na primeira quanto na segunda fase, o que indica que componentes químicos presentes no EA de *M. sylvatica* podem inibir diferentes aspectos e mediadores químicos da inflamação (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas).

Segundo Merini *et al.* (2014), o uso do ultrassom em fonoforese aumenta a permeabilidade da pele a moléculas de baixo ou alto pesos moleculares, aumentando assim, a concentração da droga no tecido a ser tratado. Neste estudo, apesar de a fonoforese do gel de EA de *M. sylvatica* ter tido efeito significativo em relação ao grupo controle negativo, este efeito não foi superior ao do EA aplicado topicamente sem o uso do ultrassom, indicando que o efeito do extrato aquoso não foi potencializado pelo ultrassom com os parâmetros utilizados.

O OE de *M. sylvatica*, por sua vez, não apresentou atividade significativa nesse teste em nenhuma das formas de administração utilizadas. A fonoforese com OE não reduziu o edema em nenhuma das horas, sugerindo que o OE de *M. sylvatica*, além de não produzir efeito antiedematogênico aplicado por via tópica, não possibilitou a transmissão das ondas

ultrassônicas, uma vez que quando o foi utilizado somente o ultrassom com gel condutor próprio, foi observada a redução do edema.

O teste da formalina tem sido amplamente utilizado em roedores como modelo de dor aguda provocada por estímulo químico, a fim de identificar drogas com potencial atividade antinociceptiva (Grégoire *et al.*, 2012). A 1ª fase resulta da ativação de nociceptores periféricos, enquanto a 2ª fase é resultante do desenvolvimento de inflamação e sensibilização central (Han *et al.*, 2013). Substâncias que atuam como analgésicos centrais (opioides) inibem ambas as fases, enquanto drogas de ação periférica (AINEs) inibem apenas a segunda fase (Gorzalczany *et al.*, 2011). Vale ressaltar que o EA na dose de 270 mg/kg apresentou efeito superior à morfina na 1ª fase e efeito semelhante na 2ª fase, assim como o OE nas três doses utilizadas apresentou efeito semelhante à morfina na 1ª fase e superior na 2ª fase, chegando a inibir em quase 100% a resposta nociceptiva, um dado bastante relevante, tendo em vista que a morfina é uma substância opioide com efeito analgésico comprovado.

Assim, os resultados obtidos nesse modelo indicaram que tanto o EA quanto o OE de *M. sylvatica* possuem atividade antinociceptiva tanto de origem central quanto periférica, uma vez que inibiram a resposta nociceptiva em ambas as fases do teste, sugerindo ação das substâncias diretamente sobre receptores opioides centrais ou pelo estímulo à liberação de opioides endógenos. Para confirmação do envolvimento do sistema opioide, sugere-se a realização de novos testes com uso de naloxona, um antagonista opiáceo clássico, para verificar se há inibição do efeito antinociceptivo de *M. sylvatica*.

A composição química dos componentes não voláteis de espécies do gênero *Myrcia* é pouco conhecida (Cerqueira, 2013). Em estudos sobre espécies da família Myrtaceae já foram isolados metabólitos secundários dos tipos flavonoides (Nassar, 2006, Wollenweber *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2004) e taninos (Tanaka *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1997), o que corrobora com os resultados da CCD com EA de *M. sylvatica*.

Os flavonoides são compostos fenólicos sintetizados por diversos tipos de plantas. Ensaio biológicos que utilizam os compostos isolados revelam que os esse tipo de compostos exibe uma vasta gama de efeitos biológicos, dentre eles o efeito anti-inflamatório. Investigações bioquímicas sobre seus mecanismos de ação demonstraram que estes compostos inibem uma ampla variedade de sistemas enzimáticos. Certos flavonoides possuem capacidade de inibir a ciclooxigenase e a lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, o que pode contribuir para as suas propriedades anti-inflamatórias (Rotelli *et al.*, 2003).

Segundo Rocha *et al.* (2011), tanto flavonoides, quanto taninos são associados a diversos graus de atividades anti-inflamatórias e analgésicas. Porém, há poucos relatos sobre

o papel dos taninos nessas atividades (Hosseinzadeh *et al.*, 2011). Assim, as atividades farmacológicas verificadas no EA de *M. sylvatica* podem ser decorrentes da presença de flavonoides, de taninos ou de uma ação sinérgica entre esses compostos.

Quanto à composição do OE de *M. sylvatica*, o estudo feito por Zoghbi *et al.* (2003), a presença de sesquiterpenos, no total de 39 componentes voláteis. Já no estudo de Silva (2012) foram verificados 98 constituintes químicos, representados principalmente por sesquiterpenos, porém também foram identificados monoterpenos em menor quantidade. Nesses dois estudos, os constituintes majoritários variaram conforme o ponto de coleta, sendo o espatulenol encontrado em todas as amostras como um dos constituintes majoritários.

Estudos como o de Sulaiman *et al.* (2009) já demonstraram que alguns tipos de sesquiterpenos possuem atividade antinociceptiva, o que leva a crer que esses compostos presentes no OE de *M. sylvatica* podem ter sido responsáveis pelo efeito antinociceptivo tão acentuado verificado no teste da formalina. Quanto ao efeito antiedematogênico de *M. sylvatica*, sugere-se que seja decorrente da atividade dos compostos não voláteis presentes somente no EA.

Não foram encontrados outros estudos na literatura científica a respeito da toxicidade de *M. sylvatica*. Neste estudo, foram avaliados, por meio de testes comportamentais, possíveis efeitos no sistema nervoso provocados pela administração do EA de *M. sylvatica* durante 21 dias. De acordo com Kulig *et al.*, (1996), há diversos métodos comportamentais disponíveis para triagem e caracterização de efeitos neurotóxicos. Métodos observacionais padronizados e avaliação da atividade motora demonstram ser adequados para avaliação inicial de neurotoxicidade.

No teste do campo aberto, camundongos e ratos costumam andar próximo às paredes, um comportamento denominado tigmotatismo. O aumento do tempo gasto na parte central, ou da relação de locomoção central/locomoção total são indicações ansiólise. O efeito contrário, ou seja, uma diminuição dessas variáveis, está associado a efeitos ansiogênicos. O aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante, enquanto a diminuição da mobilidade e da movimentação vertical (levantamentos) estão relacionados à sedação (Prut e Belzung, 2003). O número de bolos fecais pode ser alterado por diferentes grupos de fármacos, tais como ansiolíticos, ansiogênicos, dentre outros, como espasmolíticos ou espasmogênicos (Oliveira *et al.*, 2008). Nenhum destes efeitos foi observado com a administração do extrato aquoso de *M. sylvatica*.

O teste do labirinto em Y avalia a alternância espontânea entre os braços do aparelho, considerada como um indicativo de memória de curto prazo, enquanto o teste do labirinto

aquático avalia a memória espacial em roedores, funções relacionadas à área do hipocampo (Park *et al.*, 2010). Os resultados destes testes demonstraram que não houve diferenças estatísticas entre os grupos testados. O comportamento de esQUIVA inibitória (memória aversiva) no teste da caixa claro-escuro também foi semelhante em todos os grupos testados. Segundo Izquierdo e Medina (1997), a formação da memória para esse tipo de comportamento é decorrente de uma série de eventos bioquímicos envolvendo as regiões do hipocampo, amígdala e córtex parietal. Assim, sugere-se que não houve alterações no funcionamento dessas áreas cerebrais, pois se verificou que não houve prejuízo das funções cerebrais de memória com a administração do EA de *M. sylvatica*.

O teste da barra giratória avalia a integridade da função motora dos animais, verificando efeitos como incoordenação e relaxamento muscular, os quais podem ser induzidos por drogas depressoras do sistema nervoso central (Oliveira *et al.*, 2008). Os resultados obtidos no teste indicaram que a administração do EA de *M. sylvatica* não provocou incoordenação motora nos animais. Assim, supõe-se um baixo potencial neurotóxico da espécie, levando-se em consideração que em nenhum dos testes comportamentais foi verificada alguma alteração indicativa de neurotoxicidade.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo, conclui-se que o extrato aquoso bruto e o óleo essencial das folhas de *M. sylvatica* possuem um potencial farmacológico importante. Vale ressaltar que o extrato aquoso de *M. sylvatica* apresentou potencial anti-inflamatório administrado tanto por via oral quanto por via tópica, o que poderia justificar a utilização popular das folhas dessa planta na forma de chás e de banhos de assento para tratar doenças inflamatórias. Verificou-se que tanto o extrato aquoso quanto o óleo essencial de *M. sylvatica* apresentam grande potencial analgésico. Diante disso, conclui-se que são necessários estudos químicos e farmacológicos que busquem isolar os compostos ativos responsáveis pelas ações farmacológicas verificadas e determinar o seu mecanismo de ação, assim como, estudos mais aprofundados sobre sua toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Oeste do Pará e à equipe do Laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LAbBBEx) por todo o apoio material e logístico para realização da pesquisa.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Akkol EK, Acikara OB, Süntar I, Burçin E, Çitoğlu GS (2012). Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera species*: In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects./ Journal of Ethnopharmacology. 140:261-270.
- Amorim BS, Alves M (2011). Flora of Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Myrtaceae. Rodriguésia, 62 (3):499-514.
- Broadhurst PL (1957). Determinants of emotionality in the rat. The British Journal of Psychology. 48:1-2.
- Cerqueira MD, Souza-Neta LC, Guedes MLS, Rivelino R, Cruz FG (2013). Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). Tetrahedron Letters. 54:1421-1423.
- Denoble VJ, Repetti SJ, Gelpke LW, Wood LM, Keim KL (1986). Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. Pharmacol Biochem Behav. 24(4):1123-1128.
- Dubuisson D, Dennis SG (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain. 4:161-174.
- Dunham NM, Miya TS (1957). A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. Journal of the American Pharmacists Association. 46:208-209.
- Dutra S *et al.* (2004). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 25. Embrapa.
- García MD, Fernández MA, Alvarez A, Saenz MT (2004). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). Journal of Ethnopharmacology. 91:69-73.
- Gorzalczany S, Marrassini C, Miño C, Acevedo C, Ferraro G (2011). Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. Journal of Ethnopharmacology. 134:733-738.
- Grégoire, S, Etienne M, Gaulmin M, Caussade F, Neuzeret D, Ardid D (2012). New method to discriminate sedative and analgesic effects of drugs in the automated formalin test in rats. Neuroscience Research. 72:194-198.

Hosseinzadeh H, Khoshdel M, Ghorbani M (2011). Antinociceptive, Anti-inflammatory Effects and Acute Toxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Myrtus communis* L. Aerial Parts in Mice. *J Acupunct Meridian Stud.* 4(4):242-247.

Izquierdo I, Medina JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory.* 68:285-316.

Kulig B, Alleva E, Bignami G, Cohn J, Cory-Slechta D, Landa V, O'Donoghue J, Peakall D (1996). Animal behavioral methods in neurotoxicity assessment: SGOMSEC joint report. *Environmental health perspectives.* 104(2):193-204.

Morris RGM (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11:47–60.

Nakamura MJ, Monteiro SS, Bizarri CHB, Siani AC, Ramos MFS (2010). Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology.* 38:1170–1175.

Nassar MI (2006). Flavonoid triglycosides from the seeds of *Syzygium aromaticum*. *Carbohydrate Research.* 341(1):160-163.

Oliveira RB, Nascimento MVM, Valadares MCJ, Paula R, Costa EA, Cunha LC (2008). Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 44(3):485-491.

Park SJ, Kim DH, Lee IK, Jung WY, Park DH, Kim JM, Lee KR, Lee KT, Shin CY, Cheong JH, Ko KH, Ryu JH (2010). The ameliorating effect of the extract of the flower of *Prunella vulgaris* var. lilacina on drug-induced memory impairments in mice. *Food and Chemical Toxicology.* 48:1671–1676.

Prut L, Belzung C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology.* 463: 3–33.

Rocha CQ, Vilela FC, Cavalcante GP, Santa-Cecília FV, Santos-e-Silva L, Santos MH, Giusti-Paiva A (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology.* 133:396–401.

Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN (1988). Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and antagonist β -carboline. *Psychopharmacology.* 94:491–495.

Shah AS, Alagawadi KR (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Thespesia populnea* Soland ex. Correa seed extracts and its fractions in animal models. *Journal of Ethnopharmacology.* 137: 1504– 1509.

Silva, FKS (2012). Sinopse e composição química dos óleos essenciais de espécies de *Myrtaceae* comercializadas como pedra-ume-caá em Belém-Pará. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal Rural da Amazônia.

Skauen DM, Zentner GM (1983). Phonophoresis. *International Journal of Pharmaceutics*. 20:235-245.

Smith N *et al.* (2004). *Flowering plants of Neotropics*. Princeton: Princeton University Press.

Sobral M, Proença C, Souza M, Mazine F, Lucas E (2013). *Myrtaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19882>)

Sulaiman MR, Perimal EK, Zakaria ZA, Mokhtar F, Akhtar MN, Lajis NH, Israf DA (2009). Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. *Fitoterapia*. 80:230–232.

Tanaka T, Orii Y, Nonaka G, Nishioka I, Kouno I (1996). Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry*. 43(6):1345-1348.

Wagner H, Blatt S (1996). *Plant Drug Analysis – a thin layer chromatography atlas*. 2.ed. Springer: Berlin.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962). Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 111: 544–547.

Wollenweber E, Wehde R, Dörr M, Lang G, Stevens JF (2000). [C-Methyl- flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae](#). *Phytochemistry*. 55(8):965-970.

Yang L, Lee C, Yen K (2000). [Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells](#). *Cancer Letters*. 157(1):65-75.

Ye C, Lu Y, Wei D (2004). Flavonoids [from *Cleistocalyx operculatus*](#). *Phytochemistry*. 65(4):445-447.

Zoghbi MGB, Andrade EHA, Silva MHL, Carreira LMM, Maia JGS (2003). Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and Fragrance Journal*. 18:421–424.

Tab. 1. Resultado da CCD realizada com EA de *M. sylvatica*.

METABÓLITO	RESULTADO
Terpenoides e ácidos graxos	Negativo
Cumarinas glicosídeas	Negativo
Flavonoides	Positivo
Cumarinas simples	Negativo
Taninos hidrolisáveis	Positivo
Taninos condensados	Positivo

Tab. 2. Porcentagem de inibição do edema no teste de edema de pata induzido por carragenina a 1% realizado com EA de *M. sylvatica*.

	1ª h	2ª h	3ª h	4ª h
Indometacina	81.9%	82.3%	76.5%	85.3%
EA 90	43.7%	31.0%	43.0%	44.2%
EA180	42.9%	28.5%	42.8%	37.3%
EA 270	66.9%	59.9%	53.8%	59.7%
EA tópico	69.7%	44.3%	45.2%	38.9%
Fonoforese	50.0%	42.9%	50.8%	47.3%
Ultrassom	48.8%	32.3%	36.9%	42.6%

Tab. 3. Porcentagem de inibição da resposta nociceptiva no teste da formalina realizado com EA de *M. sylvatica*.

	1ª fase	2ª fase
Morfina	27.1%	71.8%
EA 90	25.2%	23.2%
EA180	31.1%	56.6%
EA 270	60.2%	45.4%

Tab. 4. Porcentagem de inibição da resposta nociceptiva no teste da formalina realizado com OE de *M. sylvatica*.

	1ª fase	2ª fase
Morfina	24.3%	49.4%
OE 50	24.7%	98.8%
OE 100	37.8%	98.0%
OE 200	30.3%	97.3%

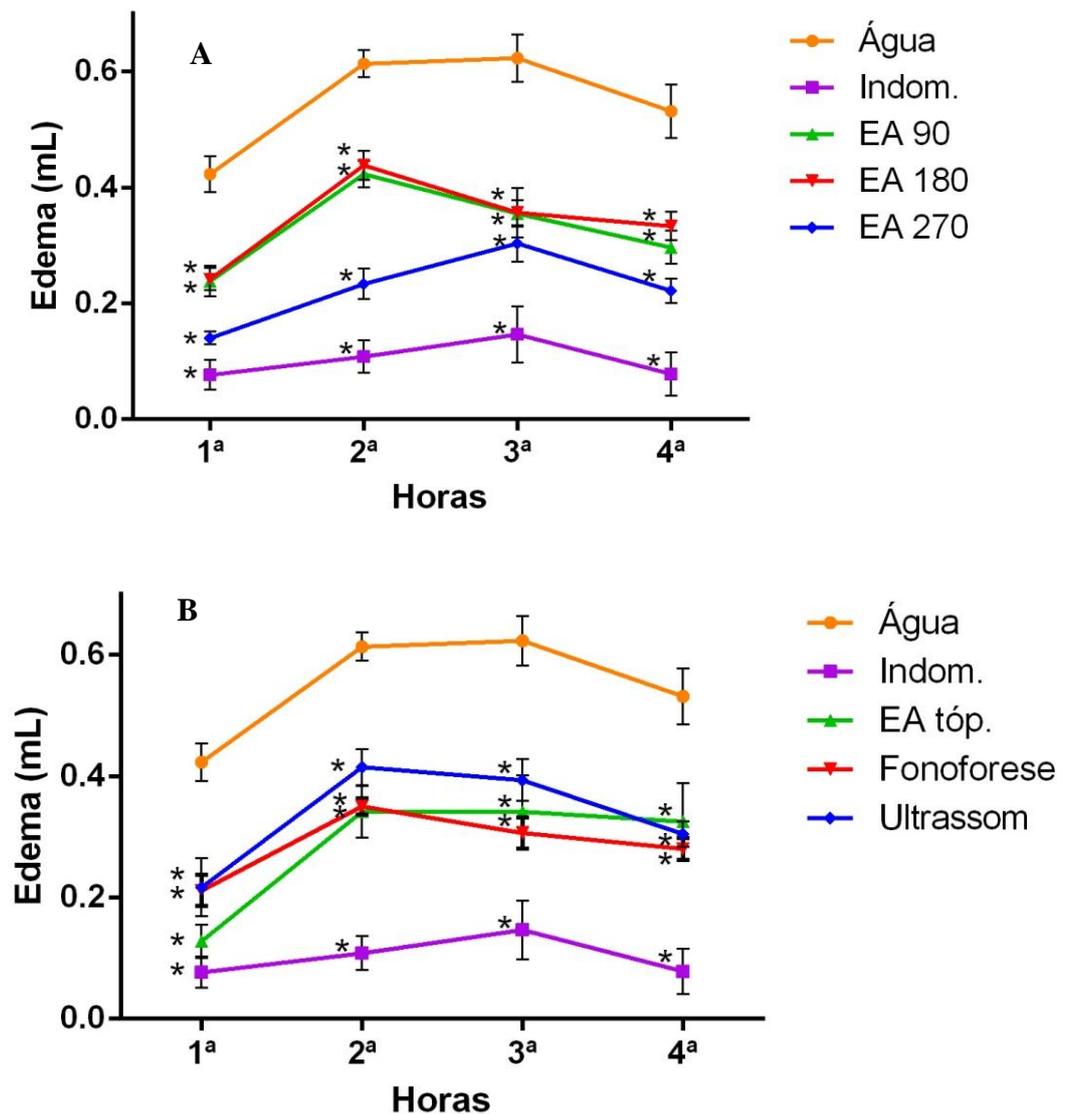


Fig. 1. Efeito do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre o edema da pata induzido por carragenina em ratos. Os animais receberam aplicação de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar 1h após a administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo), indometacina 10 mg/kg (controle positivo), EA via oral (90, 180, 270 mg/kg), EA via tópica (20 μ l), fonoforese e ultrassom. Os valores representam a média \pm erro padrão.* Diferença estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) no teste de ANOVA seguido de teste de Tukey ($n=7$). A: grupos de administração por via oral e controles negativo e positivo; B: grupos de administração por via tópica e controles negativo e positivo.

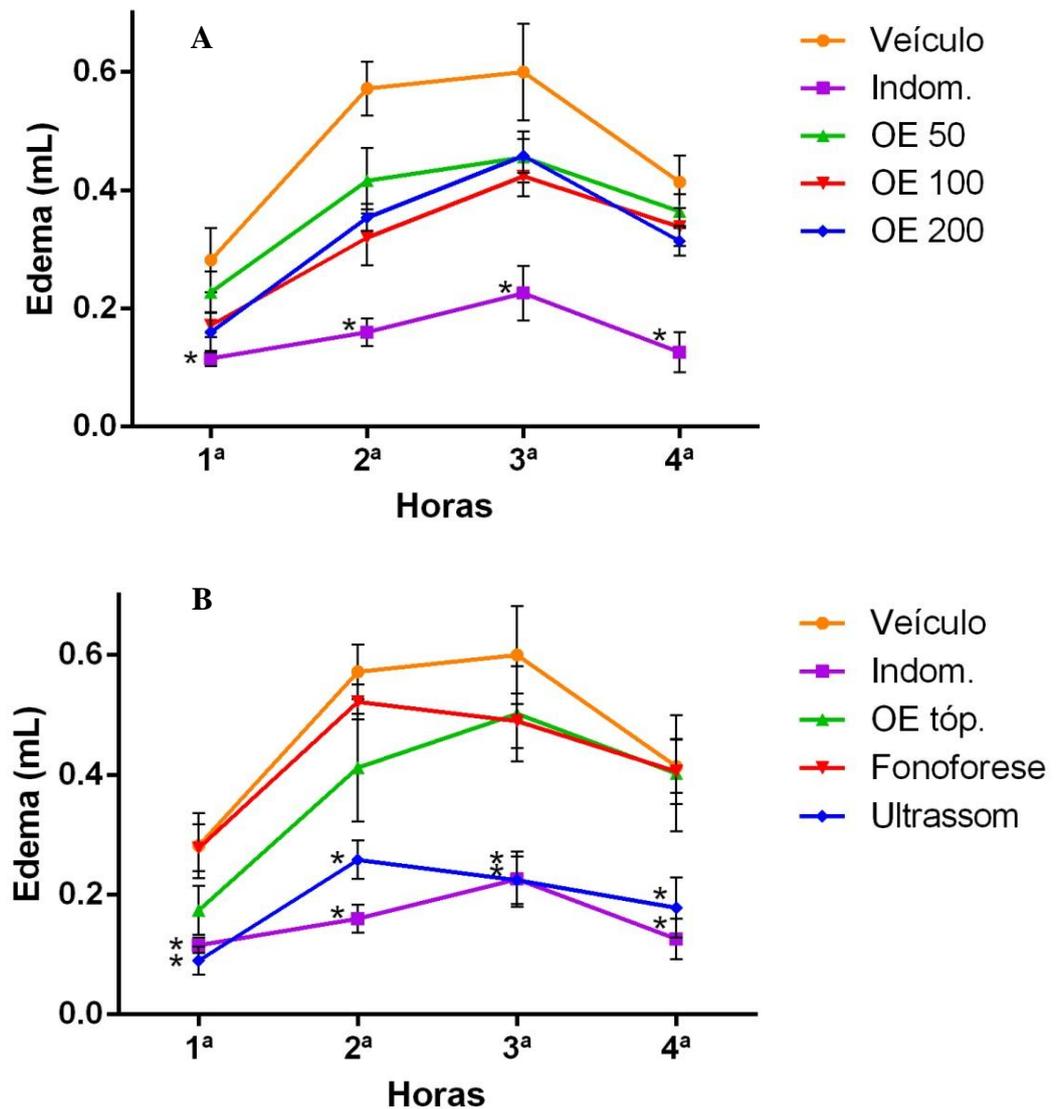


Fig. 2. Efeito do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* sobre o edema da pata induzido por carragenina em ratos. Os animais receberam aplicação de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar 1h após a administração dos tratamentos: tween 80 a 0,5% 1ml/kg (controle negativo), indometacina 10 mg/kg (controle positivo), OE via oral (50, 100, 200 mg/kg), OE via tópica (20µl), fonoforese e ultrassom. Os valores representam a média \pm erro padrão.* Diferença estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) no teste de ANOVA seguido de teste de Tukey ($n=6$). A: grupos de administração por via oral e controles negativo e positivo; B: grupos de administração por via tópica e controles negativo e positivo.

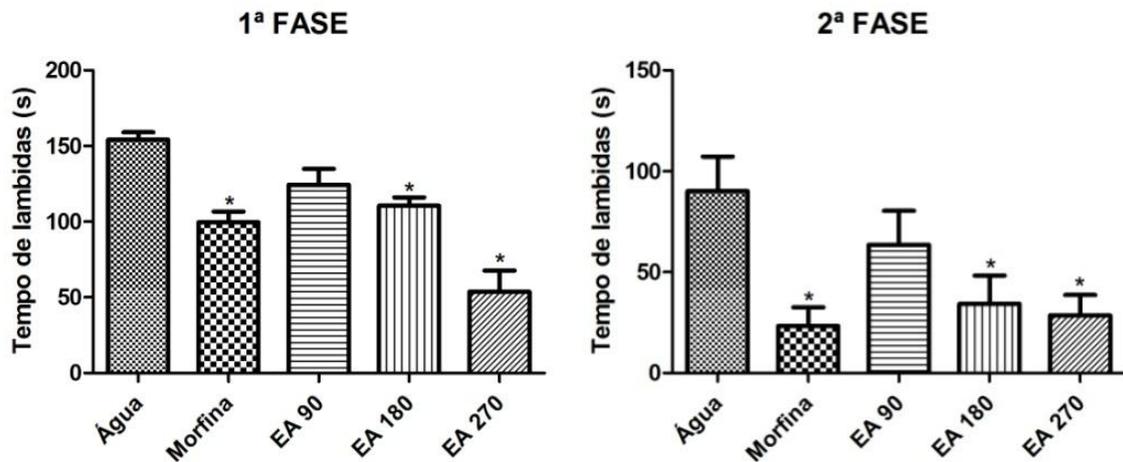


Fig. 3. Efeito do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre a nocicepção no teste da formalina em ratos. Os animais receberam aplicação de 0,2 mL de formalina na região subplantar 1h após a administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo), morfina 2,5 mg/kg intraperitoneal (controle positivo), EA via oral (90, 180 e 270 mg/kg) e foram observados em duas fases: 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (25-30 min) após a injeção de formalina. Os valores representam a média \pm erro padrão.* Diferença estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) no teste de ANOVA seguido de teste de Tukey (n=6).

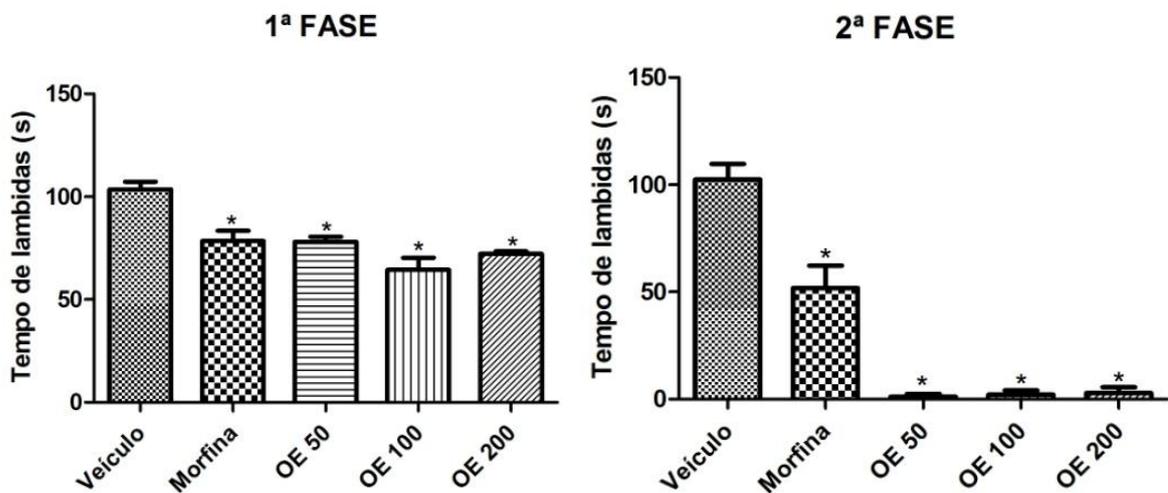


Fig. 4. Efeito do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* sobre a nocicepção no teste da formalina em ratos. Os animais receberam aplicação de 0,2 mL de formalina na região subplantar 1h após a administração dos tratamentos: tween 80 0,5% 1ml/kg (controle negativo), morfina 20 mg/kg (controle positivo), OE (50, 100 e 200 mg/kg) e foram observados em duas fases: 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (25-30 min) após a injeção de formalina. Os valores representam a média \pm erro padrão.* Diferença estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) no teste de ANOVA seguido de teste de Tukey (n=6).

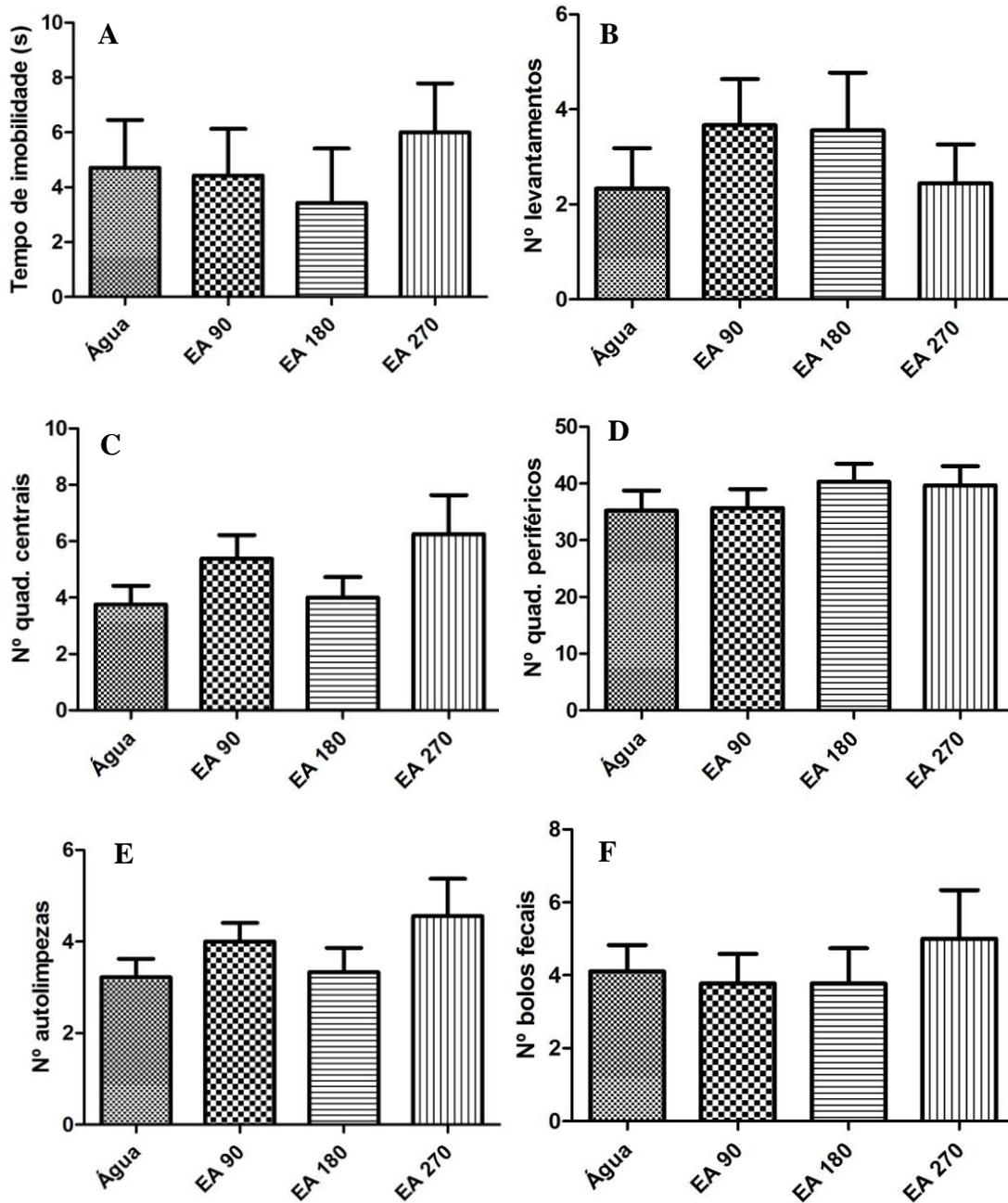


Fig. 3. Efeito da administração do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre o comportamento de ratos nos parâmetros avaliados no teste do campo aberto. A: tempo de imobilidade; B: nº de levantamentos; C: nº de quadrantes centrais percorridos; D: nº de quadrantes periféricos percorridos; E: nº de autolimpezas; F: nº de bolos fecais. Os animais receberam administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo) e EA (90, 180 e 270 mg/kg) durante 21 dias antes da realização do teste. Os valores representam a média \pm erro padrão.

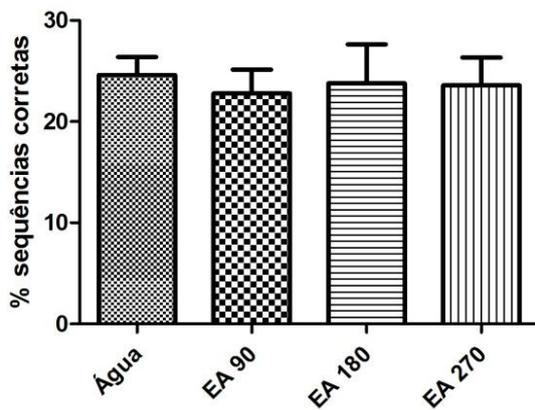


Fig. 6. Efeito da administração do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre a porcentagem de sequências corretas no teste do labirinto em Y. Os animais receberam administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo) e EA (90, 180 e 270 mg/kg) durante 21 dias antes da realização do teste. Os valores representam a média \pm erro padrão.

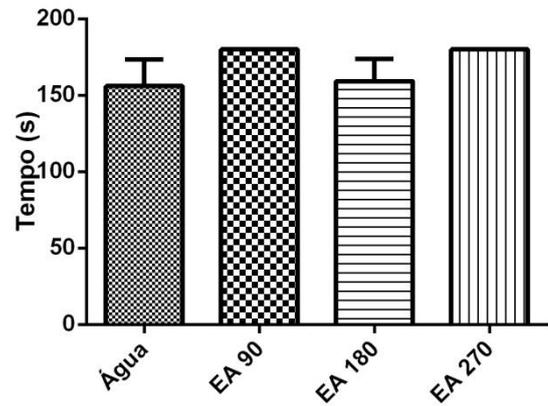


Fig. 7. Efeito da administração do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre o tempo de latência para entrada no ambiente escuro no teste da caixa claro-escuro. Os animais receberam administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo) e EA (90, 180 e 270 mg/kg) durante 21 dias antes da realização do teste. Os valores representam a média \pm erro padrão.

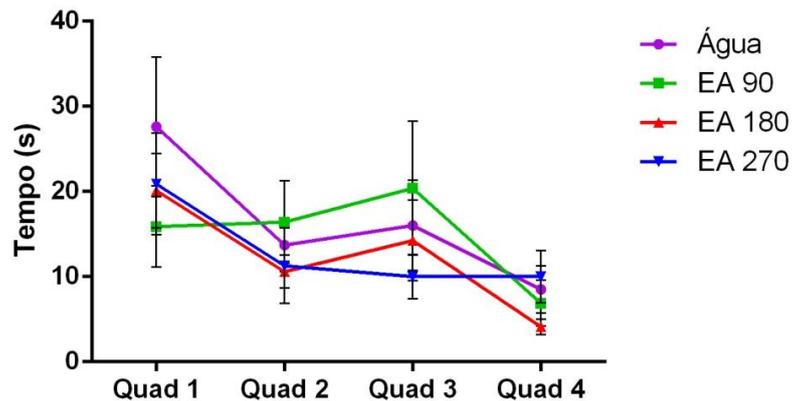


Fig. 8. Efeito da administração do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre o tempo para encontrar a plataforma submersa no teste do labirinto aquático. Os animais receberam administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo) e EA (90, 180 e 270 mg/kg) durante 21 dias antes da realização do teste. Os valores representam a média \pm erro padrão.

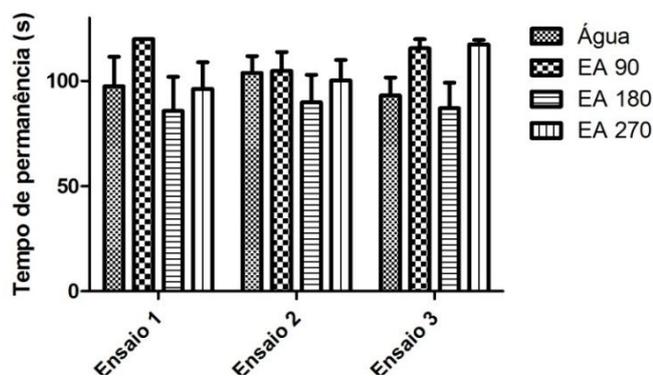


Fig. 9. Efeito da administração do extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* sobre o tempo de permanência na barra giratória. Os animais receberam administração dos tratamentos: água 1ml/kg (controle negativo) e EA (90, 180 e 270 mg/kg) durante 21 dias antes da realização do teste. Os valores representam a média \pm erro padrão.

4 SÍNTESE INTEGRADORA

A pesquisa apresentada nesta dissertação constitui um passo inicial para o estudo dos efeitos farmacológicos de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. Verificou-se que essa planta possui um potencial anti-inflamatório e analgésico, devido aos efeitos antiedematogênico e antinociceptivo verificados no extrato aquoso bruto e efeito antinociceptivo verificado no óleo essencial. Sugere-se a realização de novos experimentos, em diferentes modelos de investigação da inflamação e da nocicepção, a fim de confirmar os efeitos verificados, além de estudos que visem isolar os compostos químicos responsáveis por tais efeitos.

Verificou-se também que o extrato aquoso de *M. sylvatica* não apresentou potencial neurotóxico devido não causar alterações comportamentais nos testes realizados, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre sua toxicidade, assim como estudos sobre a toxicidade do óleo essencial da espécie.

Por fim, acredita-se que os resultados contidos neste trabalho são de grande relevância, pois servirão como base para futuras pesquisas, contribuindo para o conhecimento sobre a eficácia e segurança no uso medicinal de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. na Amazônia.

ANEXOS

ANEXO A: Normas da Revista “Journal of Medicinal Plant Research”

Journal of Medicinal Plants Research (ISSN 1996-0875) is an open access journal that provides rapid publication (weekly) of articles in all areas of Medicinal Plants research, Ethnopharmacology, Fitoterapia, Phytomedicine etc. The Journal welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and scientific excellence.

The **cover letter** should include the corresponding author's full address and telephone/fax numbers and should be in an e-mail message sent to the Editor, with the file, whose name should begin with the first author's surname, as an attachment.

Regular articles

All portions of the manuscript must be typed **double-spaced** and all pages numbered starting from the title page.

The **Title** should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote.

The **Abstract** should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The Abstract should be 100 to 200 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 **key words** that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard **Abbreviations** should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined.

The **Introduction** should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The **Discussion** should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The **Acknowledgments** of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or Powerpoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

References: In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Abayomi (2000), Agindotan et al. (2003), (Kelebeni, 1983), (Usman and Smith, 1992), (Chege, 1998; Chukwura, 1987a,b; Tijani, 1993,1995), (Kumasi et al., 2001)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., A. Kingori, University of Nairobi, Kenya, personal communication). Journal names are abbreviated according to Chemical Abstracts. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

Examples:

Ogunseitan OA (1998). Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:695–702.

Gueye M, Ndoye I, Dianda M, Danso SKA, Dreyfus B (1997). Active N₂ fixation in several *Faidherbia albida* provenances. *Ar. Soil Res. Rehabil.* 11:63-70.

Charnley AK (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer CJ, Prior C (eds) *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin.* Oxford: CAB International, pp 181-190.

Mundree SG, Farrant JM (2000). Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In Cherry et al. (eds) *Plant tolerance to abiotic stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 201-222.

Babalola OO (2002). Interactions between *Striga hermonthica* (Del.) Benth. and fluorescent rhizosphere bacteria Of *Zea mays*, L. and *Sorghum bicolor* L. Moench for *Striga* suicidal germination In *Vigna unguiculata* . PhD dissertation, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

Copyright: Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

Article Processing Charge: Authors are charged a \$600 handling fee. Handling fee is accepted only after a manuscript has been reviewed and accepted for publication.

ANEXO B: Autorização do comitê de ética para uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UFOPA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e efeitos toxicológicos do extrato aquoso e do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC", protocolado sob o número Nº 09008/2013, utilizando 35 (trinta e cinco) camundongos heterogênicos e 96 (noventa e seis) ratos heterogênicos, sob a responsabilidade do professor Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.



Santarém, 19 de dezembro de 2013.

Robson K. Lima
PRESIDENTE CEUA - UFOPA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA

Robson K. Lima
 Professor UFOPA
 SAPP: 114288

CEUA/UFOPA Instituída pela portaria nº 15 de 11 de janeiro de 2013 e credenciada junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Deferimento publicado no Diário oficial da União Nº 187, 26 de setembro de 2013. CIAEP: 01.0065.2013