



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

AMINTAS FIGUEIRÊDO LIRA

**TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO E ÓLEO
ESSENCIAL DA *Hyptis pectinata* (L.) POIT
(SAMBACAITA), EM MODELO MURINO DE ARTRITE
INDUZIDA POR CRISTAIS DE URATO DE SÓDIO.**

**ARACAJU – SE
2006**

AMINTAS FIGUEIRÊDO LIRA

**TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO E ÓLEO
ESSENCIAL DA *Hyptis pectinata* L. POIT (SAMBACAITA),
EM MODELO MURINO DE ARTRITE INDUZIDA POR
CRISTAIS DE URATO DE SÓDIO.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Federal de Sergipe para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Estudos Clínicos e
Laboratoriais em Saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÂNGELO ROBERTO ANTONIOLLI

**ARACAJU – SE
2006**

Lira, Amintas Figueirêdo

Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do extrato aquoso e óleo essencial do *Hyptis pectinata* L. (sambacaita), em modelo murino de artrite induzida por cristais de urato de sódio.

/ Amintas Figueirêdo Lira.-- Aracaju, 2006

68 f.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Roberto Antonioli

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. *Hyptis pectinata* L. 2. Toxicidade aguda 3. Antinocicepção 4. artrite gotosa I. Título

AMINTAS FIGUEIRÊDO LIRA

TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO
EXTRATO AQUOSO E ÓLEO ESSENCIAL DA *Hyptis pectinata* L. POIT
(SAMBACAITA), EM MODELO MURINO DE ARTRITE INDUZIDA POR
CRISTAIS DE URATO DE SÓDIO.

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Federal de Sergipe,
para obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde

Área de Concentração: Estudos Clínicos e
Laboratoriais em Saúde

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. ÂNGELO ROBERTO ANTONIOLLI

1º Examinador: Prof. Dr. LAURO XAVIER FILHO

2º Examinador: Prof. Dr. MURILO MARCHIORO

A meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades que tem me proporcionado e pelos milagres realizados.

Ao Prof. Dr. Ângelo Antonioli pela orientação, confiança e incentivo.

Ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, pela oportunidade de realizar este curso.

À Prof.^a Dra Flávia Teixeira, por ter cedido o Laboratório de Fisiologia Comportamental para a execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Adauto Ribeiro, do Departamento de Biologia, pela identificação botânica da planta.

Aos Profs. Drs. Arie e Fátima Blank e Polyana Ehlert, do Departamento de Agronomia, pela contribuição técnica e instrumental na extração do óleo essencial.

Ao Prof. Dr. Péricles Alves, do Departamento de Química, responsável pela análise química do óleo essencial.

À Prof.^a Dra. Maria da Paz, pelo auxílio na triagem fitoquímica do extrato aquoso.

À Prof.^a Jeane Vilar, do Departamento de Biologia, pela orientação na determinação da DL₅₀.

Aos Profs. Drs. Murilo Marchioro, Rosilene Marçal, Josemar Batista, Vívian Andrade, Ricardo Fakouri, Sócrates Cavalcanti, Rogéria Nunes e Marcio Roberto, pelo apoio e contribuições científicas compartilhadas durante este período de convivência.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do Laboratório de Farmacologia, pela colaboração prestada.

Aos funcionários D. Edína, Seu Oswaldo e D. Jane, pela colaboração e atenção .

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes/MEC), pela concessão de Bolsa durante a realização do curso.

Aos colegas do curso de Mestrado em Ciências da Saúde: Venâncio, Edna, Silvia, Sheila, Silvan e Cleonice, pelo companheirismo e incentivo .

À minha madrinha Maria, à minha família e aos amigos pelo carinho e incentivo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Depois de algum tempo você aprende que não importa onde já chegou,
mas aonde está indo."*

(W. Shakespeare)

RESUMO

A *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae), vulgarmente conhecida como sambacaitá, é um exemplo de planta comumente utilizada na medicina popular; diversos efeitos biológicos estão associados aos seus extratos, tais como analgésico, antiinflamatório e antimicrobiano. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm avaliado estes efeitos promovidos pelo extrato aquoso e óleo essencial das folhas da planta, cujas composições químicas, constituem os seus compostos solúveis em água e os seus compostos voláteis respectivamente. Este trabalho objetivou dar continuidade a esses estudos, determinando os constituintes químicos e a toxicidade aguda da amostra de extrato aquoso e óleo essencial utilizados, para estudar o efeito antinociceptivo (analgésico) dos extratos citados, em uma condição inflamatória articular aguda, similar a um ataque de artrite aguda como o ocorrido na gota. Os estudos fitoquímicos do extrato aquoso identificaram a presença de alcalóides, taninos e flavonóides. A análise dos constituintes do óleo essencial se deu por cromatografia gasosa e espectrômetro de massa, revelando como principais constituintes: β -cariofileno e germacreno-D. A avaliação da toxicidade aguda foi representada pela determinação da DL_{50} , em camundongos swiss, obtida pelo método dos probitos; não foi possível mensurar a DL_{50} do extrato aquoso, devido a sua baixa toxicidade, já o óleo essencial, obteve uma DL_{50} de 1,1 g/kg. O efeito antinociceptivo foi estudado usando o modelo de artrite induzida por cristais de urato de sódio, em ratos wistar, proposto por Coderre e Wall. O extrato aquoso apresentou efeito antinociceptivo significativo na dose de 50 mg/Kg, o qual foi revertido pelo antagonista opióide, naloxona (5mg/kg). O óleo essencial não apresentou efeito antinociceptivo nas doses testadas. Os resultados mostraram que o extrato aquoso possui baixa toxicidade e apresenta atividade antinociceptiva numa condição reumática, semelhante à artrite gotosa; enquanto o óleo essencial apresenta toxicidade média e não apresenta atividade antinociceptiva na condição reumática proposta.

Palavras-chave: *Hyptis pectinata* L. Poit.; toxicidade aguda; antinocicepção; artrite gotosa.

ABSTRACT

Hyptis pectinata L. Poit. (Lamiaceae), widely known as Sambacaitá, is an example of a plant commonly used in folk Medicine; various biological effects are associated with its extracts, such as: analgesic, anti-inflammatory, and anti-microbial. Many studies “in vivo” and “in vitro” has assessed the effects promoted by the aqueous extract and essential oil of the leaves of the plant, whose chemical composition constitute their water soluble compounds and their volatile compounds, respectively. This study aimed at keeping on these studies, determining the chemical constituents and the acute toxicity of the sample of the aqueous extract and essential oil used to study the analgesic effect of these extracts in an acute articular inflammatory condition, similar to an episode of acute arthritis as in Gout. The phyto-chemical studies of aqueous extract identified the presence of alkaloid, tannin and flavonoid. The analysis of the constituents of the essential oil was made by gas chromatography and mass spectrometer, showing as main constituents: β - cariofilene and Germacrene-D. The evaluation of acute toxicity was represented by the establishment of DL_{50} in Swiss mice, obtained by the probits method, it was not possible to measure the DL_{50} of the aqueous extract due to its low toxicity, as for the essential oil, it was obtained a 1.1 g/kg DL_{50} . The analgesic effect was studied using the sodium urate crystals induced arthritis model, in Wistar mice, as proposed by Coderre and Wall; the aqueous extract presented expressive analgesic effect with the 50 mg/kg doses, which was reverted by the opioid antagonist, naloxone (5 mg/kg). The essential oil did not present analgesic effect with the tested doses. The results showed that the aqueous extract has low toxicity and it presents analgesic effect in a rheumatic condition, similar to Gout arthritis, while the essential oil presents medium toxicity and it does not show analgesic effect in the proposed rheumatic condition.

Key words: *Hyptis pectinata* L. Poit; acute toxicity; antinociception; gout arthritis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
° C	Grau Celsius
CEPA	Comitê de Ética para Experimentação com Animais
CG	Cromatografia Gasosa
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
DL ₅₀	Dose Letal média
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E.A.	Extrato Aquoso
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FNT	Fator de Necrose Tumoral
g	grama
GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico
GTP	Guanosina Trifosfato
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IL	Interleucina

kg	Quilograma
M	Molar
MS	Espectometria de Massa
mg	miligrama
ml	mililitro
Na ⁺	Íon Sódio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de Sódio
O ₂	Oxigênio
OE	Óleo Essencial
PPG	Propilenoglicol
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico
v.o.	via oral

LISTAS DE FIGURAS

Figura 01 – Rotas simplificadas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário ...	20
Figura 02 – <i>Hyptis pectinata</i> L.....	22
Figura 03 – Origem dos átomos do anel purínico na via <i>de novo</i> para síntese de nucleotídeos em células de mamíferos	28
Figura 04 – Exemplo do metabolismo das purinas	29
Figura 05 – Representação gráfica da DL ₅₀	43
Figura 06 – Cromatograma da corrente iônica total.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Eventos mais importantes na historia do estudo da Gota.....	27
Tabela 02 - Dados do efeito tóxico agudo do O.E. da <i>H. pectinata</i> L.....	42
Tabela 03 - Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso da <i>H. pectinata</i> L.....	43
Tabela 04 - Constituintes do óleo essencial de <i>H. pectinata</i> , com presença na amostra < 1%.....	45
Tabela 05 - Efeito do veículo PPG e das drogas-padrão Colchicina, Indometacina e Morfina, no tempo de latência ao calor em ratos.....	46
Tabela 06 - Efeito do E.A. de <i>H. pectinata</i> no tempo de latência ao calor em ratos.....	46
Tabela 07 - Efeito do O.E. de <i>H. pectinata</i> no tempo de latência ao calor em ratos	47
Tabela 08 - Quantis Simples da Distribuição Normal.Frações próprias, com denominadores até 30, e o afastamento normal correspondente..	67
Tabela 09 - Probitos - Coeficientes de ponderação e valores probíticos para serem utilizados em ajustes finos	68

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1 Introdução	16
1.1 Plantas Medicinais.....	16
1.2 Metabolismo Secundário das Plantas.....	18
1.3 Hyptis pectinata (L.) Poit.....	21
1.4 Gota	26
1.4.1 Metabolismo das Purinas	27
1.4.2 Influencia Fisiológica das Moléculas de Urato	29
1.4.3 Epidemiologia	30
1.4.4 Processo Inflamatório na Artrite Gotosa	30
2 Justificativa.....	34
3 Objetivos	35
Geral	35
Específicos	35
4 Metodologia	36
4.1 Material Botânico	36
4.2 Preparação do Extrato Aquoso	36
4.3 Extração do Óleo Essencial	36

4.4 Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso.....	37
4.5 Análise e Identificação dos Componentes do Óleo Essencial.....	37
4.6 Animais	37
4.7 Determinação da DL ₅₀ do Extrato Aquoso e do Óleo Essencial de <i>Hyptis pectinata</i> L.	38
4.8 Produção dos Cristais de Urato de Sódio	38
4.9 Injeção dos Cristais de Urato de Sódio	39
4.10 Grupos Experimentais.....	39
4.11 Modelo de Antinocicepção, em condição artrítica, Induzida por Cristais de Urato de Sódio (Coderre & Wall, 1986).....	40
4.12 Eutanásia dos Animais	41
4.13 Análise Estatística	41
5 Resultados	42
5.1 Rendimento do Óleo Essencial e Extrato Aquoso obtidos	42
5.2 Determinação da DL ₅₀	42
Extrato Aquoso	42
Óleo Essencial	42
5.3 Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso	43
5.4 Análise e Identificação dos Componentes do Óleo Essencial	44
5.5 Efeito Antinociceptivo	45
Controles.....	45
Extrato Aquoso.....	46
Óleo Essencial.....	47
6 Discussão	48
7 Conclusão	52

8 Referencial Teórico	53
9 Anexos	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

O homem sempre buscou no reino vegetal recursos para sua eterna luta contra sofrimento (dor / morte) em busca do bem estar (prazer / vida); essa busca se deu pela observação atenta e permanente da natureza e das manifestações em si próprio ou em animais das propriedades dos vegetais, produzindo uma soma de conhecimentos que apesar de empíricos vinham a atender muitas das suas necessidades mais básicas.

Esse conhecimento passado de forma oral e gestual (“por ouvir – falar e ver – fazer”) de geração em geração, não ocorreu de maneira imutável como um patrimônio intelectual, mas como um produto histórico capaz de ser reconstruído e modificado (CUNHA, 1999; LAPLANTINE e RABEYRON, 1989 e BOMFIM, 2001). Este “produto” que pode ser denominado de conhecimento popular, medicina tradicional, medicina popular, entre outros é definido por OLIVEIRA (1984) como um conjunto de práticas, sejam elas comprovadas cientificamente ou não, utilizadas por um grande número de pessoas que em diferentes circunstâncias e diferentes concepções, opiniões e valores tornaram-na uma alternativa para o alívio e a cura de seus males e angústias.

Com o advento da síntese artificial de fármacos, ao longo da primeira metade do século XX, o conhecimento acerca das plantas medicinais, bem como, os produtos derivados destas, passaram a ocupar um papel secundário na terapêutica, pois as substâncias sintéticas tinham uma estrutura química conhecida, o que permitia uma avaliação mais precisa de suas atividades farmacológicas. Ainda assim, a principal fonte de matrizes para essas moléculas continuou a ser os vegetais, e a indicação para a pesquisa de possíveis moléculas bioativas em uma planta, a sabedoria popular (MARTINS et al, 1998). Sabedoria essa que pode levar à

descoberta de novas moléculas, podendo vir a dar origem a novos produtos ou medicamentos, que venham a trazer benefícios contra enfermidades que os avanços científicos, ocorridos até então, não foram capazes de sanar.

O Brasil se encontra em posição privilegiada, pois possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta; conseqüentemente quanto maior a diversidade de espécies vegetais, maiores as possibilidades de serem encontradas moléculas biologicamente ativas com potencial de virem a se tornar produtos economicamente viáveis que atendam demandas da indústria química e farmacêutica (NODARI e GUERRA, 2000).

Essa enorme variedade de possibilidades oferecida de maneira relativamente fácil pela biodiversidade é matéria-prima para a produção de fitomedicamentos, também conhecidos como fitoterápicos, definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da Resolução de Diretoria Colegiada, de 16 de março de 2004 (RDC nº 48) como medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A ANVISA não considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

Nas últimas décadas, houve um aumento expressivo no mercado mundial de fitoterápicos, que é estimado em mais de US\$ 20 bilhões anuais. Somente na Europa, atinge cerca de US\$ 7 bilhões ao ano, sendo que a Alemanha é responsável por cerca de 50% desse total. Segundo estimativa feita pela empresa de consultoria *PhytoPharm Consulting* em Berlim, até o ano de 2007 a fitoterapia deve movimentar cerca de US\$ 47 bilhões anualmente (SIANI, 2003). No Brasil, o mercado de fitoterápicos atingiu em 2001, 5,9% do mercado de medicamentos, cerca de US\$ 270 milhões, maior portanto, que a comercialização de medicamentos genéricos, que correspondeu a 5% do mercado no mesmo período, cerca de US\$ 226 milhões. (CALIXTO, 2003).

Esse maior interesse pelas propriedades medicinais das plantas tem permitido, também, o surgimento de linhas de pesquisas em centros do mundo todo, pois ainda há muito a ser pesquisado, estima-se que apenas 1 a 3% das plantas conhecidas teve suas propriedades medicinais pesquisadas (ELISABETSKY, 2000). Segundo VERPOORTE (1998) apenas 10% da biodiversidade mundial foi estudada, tendo sido obtido aproximadamente 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores e de microrganismos, que apesar de isolados e caracterizados, ainda não foram avaliados biologicamente, em muitos casos, não se conhecendo nem mesmo sua atividade na própria espécie.

A região Nordeste do Brasil, como o resto do país, apresenta uma grande diversidade de espécies nativas que são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e que são de uso comum na medicina popular. Nesta região vários grupos de pesquisa na área de produtos naturais, destinados a estudar as propriedades destas plantas têm surgido e crescido, como o da Universidade Federal de Sergipe, que tem feito estudos pioneiros com várias espécies endêmicas da região, largamente usadas pela população. Dentre essas espécies, destaca-se pela sua freqüente utilização em chás, decocções e infusões como analgésico e antiinflamatório natural, a espécie nativa *Hyptis pectinata* L. Poit. , vulgarmente conhecida como sambacaitá ou canudinho.

1.2 Metabolismo Secundário das Plantas

As propriedades terapêuticas atribuídas às plantas tidas como medicinais são conferidas por princípios ativos, que são compostos químicos ou grupos de compostos químicos, normalmente sintetizados pelas plantas para atender suas necessidades particulares.

Os compostos químicos presentes no organismo vivo são sintetizados e degradados por inúmeras reações, que visam manter o funcionamento harmonioso do organismo consigo mesmo e com o meio onde está inserido. A esse complexo sistema de reações químicas denomina-se metabolismo. Todos os organismos possuem caminhos metabólicos semelhantes de produção de compostos essenciais

à sobrevivência, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados (polissacarídeos, proteínas, lipídeos, RNA, DNA etc). Esses compostos são denominados metabólitos primários. Por outro lado, as plantas produzem ampla diversidade de compostos orgânicos que não têm função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Essas substâncias são conhecidas como produtos secundários ou metabólitos secundários, que têm função ligada à ecologia da planta, isto é, ao relacionamento da planta com o meio ambiente, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens na sua sobrevivência e perpetuação da espécie, em seu ecossistema. A riqueza de metabólitos secundários em plantas é, pelo menos parcialmente explicável no simples fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais (KAYS, 1991; RHODES, 1994).

Segundo MARTINS e colaboradores (1998), os metabólitos secundários são expressões da individualidade química dos indivíduos e diferem de espécie em espécie, qualitativa e quantitativamente, sendo produzidos em pequenas quantidades. O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza, segundo RHODES (1994), é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos e microrganismos conduzem à síntese de metabólitos secundários, principalmente, com funções de defesa ou atração.

De acordo com CROTEAU (2000), os metabólitos secundários podem ser divididos, segundo suas origens biossintéticas, em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenóides são sintetizados a partir do Acetil Coenzima A (Acetil-CoA), via rota do ácido mevalônico. Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas via rota do ácido chiquímico ou ácido malônato/acetato. Os compostos nitrogenados, como alcalóides, são sintetizados a partir de aminoácidos (SANTOS, 2000). Uma forma simplificada das rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário podem ser vistas na figura 1.

As qualidades atribuídas a estes metabólitos ao longo do tempo, em particular às medicinais, vêm sendo referendadas por pesquisas científicas, tornando-se cada vez maior o interesse em se entender e controlar estes processos de síntese de metabólitos secundários, tanto por parte da comunidade científica, quanto por parte da indústria (SILVA e CASALI, 2000).

O metabolismo do Acetil-CoA gera um grupo estruturalmente diversificado de metabólitos secundários, os terpenóides, que representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos, e são os principais constituintes dos óleos essenciais, que contam ainda com a presença de fenilpropanóides, compostos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (MANN, 1987).

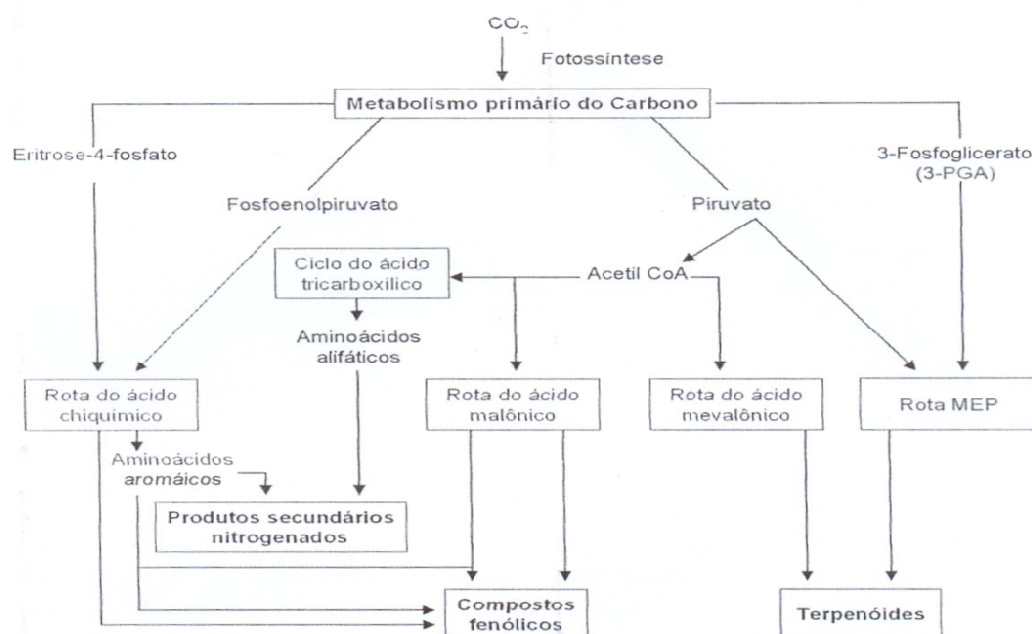


Figura 1: Rotas simplificadas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário. Fonte: TAIZ E ZIEGER (2004).

Os óleos essenciais são em geral misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e geralmente odoríferas, com aroma agradável e intenso, o que lhes rendem também a denominação de essências. São também conhecidos como óleos etéreos, do latim *aetheroleum*, por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter. Apesar de serem conhecidos como “óleos” pela sua aparência oleosa à temperatura ambiente, não possuem relação com os óleos

fixos obtidos de sementes. São abundantes em angiospermas e dicotiledôneas e, dependendo da família, podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tal como pelos glandulares localizados na superfície das folhas, como ocorre na *H. pectinata*, bem como em todas as Lamiaceae (SIMÕES e SPTIZER, 2000).

O conhecimento acerca dos óleos essenciais de plantas data de séculos antes da era cristã. As referências históricas de obtenção e utilização desses óleos estão ligadas, originalmente, aos países orientais, com destaque para o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia. A evolução de conhecimentos técnicos sobre óleos essenciais deu-se em meados do século XVIII, quando se iniciaram os estudos para suas caracterizações químicas. Atualmente muitas plantas são usadas economicamente para a produção de óleo essencial, desde plantas de pequeno porte como hortelã, até plantas arbóreas como o eucalipto (VITTI e BRITO, 2003 apud VIEIRA, 2004).

1.3 *Hyptis pectinata* (L.) Poit.

A *Hyptis pectinata* (L.) Poit., representada na figura 2, é uma planta arbustiva, pertencente à família Lamiaceae, uma vasta família botânica com cerca de 250 gêneros, dos quais o segundo maior é o *Hyptis* Jacq. com cerca de 400 espécies, muitas delas de grande importância econômica e etnofarmacológica, cujos conhecimentos são transmitidos através de gerações até os dias de hoje. (FALCÃO e MENEZES, 2003)

A *Hyptis pectinata* é uma planta hermafrodita, anual reproduzida por sementes, com ciclo de 120 dias; caules quadrangulares eretos, estriados longitudinalmente, ramificados na parte superior com ramos ascendentes, terminados em inflorescências de aspecto aglomerado compostas por flores pequenas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas. Folhas opostas em pares cruzados, curto-pecioladas, de limbo ovalado-lanceolado, com base levemente cordada e ápice agudo, com margem crenado denteada, coloração verde, densa pilosidade branca em ambas as faces e glândulas produtoras de compostos voláteis aromáticos. (KISSMAN e GROTH, 1995).

Apresenta uma distribuição pantropical, ocorrendo na América, desde os EUA, nos estados do Hawaii e Califórnia, até a região sul do Brasil (EUA, 2005 e KISSMAN e GROTH, 1995); bem como na África, tanto em países ao oeste do continente, como Costa do Marfim, quanto em países mais ao centro do continente como Camarões e Tanzânia. Na Ásia está presente sobretudo na Índia. Na Oceania está presente no norte da Austrália, Nova Zelândia e em várias outras ilhas banhadas pelo Pacífico, como as Ilhas Fiji (MALAN et al., 1988; TCHOUMBOUGNANG et al., 2005; PIETSMANN et al, 1998)



Figura 2: *Hyptis pectinata* L.

Por ser uma erva resistente, de rápido e fácil desenvolvimento, com produção de grande número de descendentes e preferência por solos leves e trabalhados, típicos de plantações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998), é considerada em alguns países onde é encontrada, como os EUA e Austrália, uma erva daninha (CSURHES e EDWARDS, 1998) . Entretanto, na grande maioria dos

lugares onde ocorrem, suas folhas são tidas como um poderoso e tradicional recurso terapêutico. No México, por exemplo, seu uso remete às civilizações pré-colombianas e ainda hoje é usada pela população, sobretudo do meio rural, contra doenças dos tratos respiratório e gastrintestinal, febres, infecções, dores musculares e reumatismo (PEREDA-MIRANDA, 1993); na Guiana Francesa é usada contra a malária (VIGNERON et al, 2005).

Independente da distância geográfica, as indicações populares de uso da *H. pectinata* tendem a se repetir, ainda que a forma de utilização mude. No México, as folhas da planta são utilizadas sob a forma de inalação contra rinofaringite e outros males respiratórios como na Costa do Marfim, onde além desta modalidade também é utilizado o sumo, obtido das folhas prensadas, levemente aquecido; como gotas nasais, para o mesmo fim (MALAN et al, 1988).

No Brasil, a *Hyptis pectinata* é muito valorizada por suas propriedades antiinflamatória e anti-séptica; sua principal forma de utilização popular é a ingestão de chás (infusões e decocções), para as mais diversas indicações- problemas gástricos ou respiratórios, câncer, infecções, febre- mas também é muito usada sob a forma de bochechos, contra afecções da cavidade oral, e emplastro, contra doenças de pele (CARVALHO, 1999).

Com base nas diversas atividades medicinais atribuídas a *Hyptis pectinata* pela cultura popular em vários países, pesquisadores em diferentes partes do mundo começaram a estudar suas propriedades terapêuticas bem como sua composição química. Os primeiros estudos a esse respeito foram realizados por MALAN e colaboradores (1988), que avaliaram as propriedades antibacteriana e antimicótica do seu óleo essencial, de espécimes coletados na Costa do Marfim (MALAN et al, 1986 apud MALAN et al, 1988) e depois investigaram os seus constituintes químicos, identificando 33 compostos, dentre os quais os principais foram: *p*-cimenene (33.7%), timol (26.0%), gama-terpineno (8.9%), alfa-thujeno (6.5%) e mycrene (5.0%). Isto permitiu justificar pela presença do timol as propriedades anti-sépticas apresentadas pelo óleo essencial. No entanto, em estudos posteriores realizados por PIETSCHMANN e colaboradores (1998) com espécimes nativos da Índia os principais constituintes encontrados foram: sabineno (27.8%), beta-

cariofileno (17.2%), beta-pineno (6.7%) e terpinoleno (6.0%); enquanto que os principais constituintes do trabalho anterior apresentaram valores insignificantes ou até mesmo não apareceram como o timol. Um outro trabalho, semelhante a esse, realizado na República de Camarões por TCHOUMBOUGNANG e colaboradores (2005), com espécimes locais, teve resultado mais próximo do ultimo trabalho, apresentando germacrene D (28.0%) e beta-caiofileno (22.1%), como principais componentes e de novo não apresentando timol na sua composição.

A própria atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Hyptis pectinata* não está obrigatoriamente associada à presença do timol, conhecido por suas atividades antimicrobianas, pois em trabalho recente onde foi analisada a sua atividade antibacteriana frente a várias cepas de *Streptococcus mutans*, bactéria responsável pela cárie, os principais constituintes identificados no óleo essencial utilizado foram cariofileno (18,34 %) e óxido de cariofileno (18,0 %), sem nem mesmo traços de timol e, no entanto, os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo (clorexidina), apartir da dose de 400mg/mL. Neste mesmo trabalho foi também analisado o hidrolato obtido apartir da extração do óleo essencial, o qual não apresentou nenhuma atividade antibacteriana (NASCIMENTO, 2005).

Outros estudos químicos, desta vez sobre o extrato metanólico da *H. pectinata*, permitiram a identificação e avaliação farmacológica de novos compostos orgânicos identificados como pironas, o primeiro deles foi o hyptolide, que apresentou modesta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e nenhuma atividade contra as amostras de bactérias gram-negativas ou *Candida albicans* (ROJAS et al,1992). Em seguida, o mesmo grupo isolou mais três novos compostos orgânicos (5,6-dihidro- α -pironas), batizados como pectiolídeos A, B e C, dos quais o A foi o que apresentou melhor atividade citotóxica, contra várias linhagens de células neoplásicas e melhor atividade contra bactérias gram-positivas; nenhum deles apresentou atividade contra bactérias gram-negativas ou *Candida albicans* (PEREDA-MIRANDA et al,1993). Um outro grupo isolou do extrato diclorometânico da *H. pectinata* mais três α -pironas e um furanona, denominados respectivamente como pectiolídeos D, E, F e G (BOALINO et al, 2003). O grupo original isolou do extrato clorofórmico mais uma pirona, denominada H, a qual não

apresentou atividade citotóxica, mas teve significativa atividade antimicrobiana contra duas linhagens de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes a vários antibióticos (FRAGOSO-SERRANO et al, 2005).

A partir do conhecimento popular várias outras atividades farmacológicas da *H. pectinata* foram pesquisadas e comprovadas. No sistema digestivo de ratos wistar, o extrato aquoso reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por indometacina ou etanol, além de também reduzir o esvaziamento gástrico, efeito esse relacionado com o sistema opióide (FREIRE et al. 2000); o extrato apresentou ainda redução da motilidade gastrintestinal, justificando o uso popular contra diarreia. A avaliação da atividade do extrato no segmento isolado de duodeno de ratos sugeriu que essa propriedade não tem relação com o sistema opióide, e sim com receptores muscarínicos, sobre os quais compostos químicos presentes no extrato exerceriam uma ação antagonista não competitiva (SILVA, 2004). O óleo essencial da *H. pectinata* também apresentou significativa atividade gastroprotetora, no modelo de úlcera induzida por etanol a 70 % em camundongos swiss (SOUZA e BATISTA, 2005).

Sobre o tecido hepático de ratos wistar, o extrato aquoso de sambacaitá apresentou funções hepatoprotetora - observada pela redução dos índices de fosfatase alcalina e do aspartato aminotransferase de animais submetidos à operação simulada e hepatectomia parcial respectivamente – e hepatoregeneradora, demonstrada por marcador imunohistoquímico sensível à proliferação celular (MELO et al. 2001; SILVA et al. 2002). Entretanto, esse mesmo extrato reduziu a fosforilação oxidativa dos hepatócitos, mesmo não produzindo lesão interna na membrana mitocondrial dos mesmos, através de mecanismos moleculares ainda não explicados (MELO et al., 2005; MELO et al., 2005). Associada à terapia laser o extrato aquoso da *H. pectinata* apresentou um aumento na sua atividade hepatoregeneradora e na capacidade de reduzir a respiração mitocondrial (MELO et al, 2005).

O extrato aquoso e óleo essencial da *H. pectinata* apresentou efeito antinociceptivo demonstrado pelos modelos de nocicepção em camundongos: contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%; placa quente e, apenas para

o extrato, formalina, nos quais foi sugerido que esse efeito se deu por ação central e periférica do extrato. Nestes mesmos trabalhos também foi avaliado o efeito anti-edematogênico de ambos, em modelos de edema de pata, em ratos, induzidos por carragenina e, apenas para o extrato aquoso, ácido araquidônico, através dos quais foi sugerido um efeito inibitório das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, para o extrato aquoso e, efeito inibitório da via da ciclooxigenase para o óleo essencial (BISPO, et al., 2001; BLANK, 2005).

1.4 Gota

A gota corresponde a um conjunto heterogêneo de patologias causadas, principalmente por um aumento nos níveis séricos de urato de sódio, até ou além do seu limite fisiológico de solubilidade ($\approx > 7\text{mg} / \text{dl}$), denominado hiperuricemia; em decorrência do aumento da produção endógena de ácido úrico, que é o seu precursor (TERKELTAUB, 2003). A artrite gotosa que é a principal e a mais conhecida dessas patologias foi que deu o nome à manifestação deste distúrbio metabólico, pois, gota vem do latim *guta*, para designar a sensação de "gotas de veneno" pingando sobre a articulação, analogia determinada pela intensidade da dor sofrida pelos pacientes (SEEGMILLER, 1965). Conhecida no passado como doença de reis e sábios, sua história remota ao Egito antigo, onde foram achadas múmias com tofos gotosos, uma das principais manifestações crônicas da gota, que consiste de um depósito de cristais de urato de sódio no tecido conjuntivo subcutâneo, em articulações distais ou na cartilagem auricular, delimitado por uma cápsula fibrosa, constituída por células de reação inflamatória de corpo estranho, na parte mais externa e tecido fibroso denso na mais interna (KELLEY et al, 1997). Entretanto, os conhecimentos a seu respeito evoluíram muito no decorrer dos séculos, como vemos na tabela 1.

Tabela 1 - Eventos mais importantes na história do estudo da Gota

Data	Evento	Autor(es)
1º séc. d.C.	Identificação dos gotosos como indivíduos da elite social (acesso feito a alimento e à bebida)	Celsus
1º séc. d.C.	Natureza familiar da doença	Seneca
5º séc. d.C.	Primeira descrição conhecida (Aforismos)	Hipócrates
3º séc. d.C.	Descrição do Tofo Gotoso	Galeno

13º séc.	Origem do termo gota	de Vielehardoiun
1679	Identificação de cristais no tofo gotoso	van Leeuwenhoek
1683	Descrição moderna dos sintomas	Sydenham
1797	Identificação do urato como grande constituinte do Tofo Gotoso	Wollaston e Scheele
1814	Especificidade da Colchicina no combate à gota	Want
1848	Relacionou a gota a um erro inato do metabolismo (Hiperuricemia)	Garrot

Fonte: KELLEY et al, 1997; HALL et al, 1967

1.4.1 Metabolismo das Purinas

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas nos humanos; estas, junto com as pirimidinas são as conhecidas bases nitrogenadas que combinadas com uma pentose e um ou mais grupamento fosfato compõem os nucleotídeos (moléculas que desempenham importantes papéis biológicos em todos os seres vivos). Os nucleotídeos são as unidades monoméricas dos ácidos nucléicos; são também fonte de energia química para as reações metabólicas e doadores de grupamentos fosfóricos para outros nucleotídeos (GTP e ADP), são mediadores em processos fisiológicos (AMPc, GMPc e ADP), componentes de coenzimas envolvidas em muitas vias metabólicas (NAD, FAD e CoA), entre outras tantas atividades de relevante importância biológica (CARVER e WALKER, 1995).

Todas as enzimas envolvidas na síntese e degradação das purinas estão no citoplasma. As purinas podem ser formadas pela via de síntese “de novo”- os átomos que as irão formar são originados de aminoácidos, bicarbonatos (derivados de tetrahidrofolato) e CO₂ (Figura 3), ou pela via de recuperação, na qual são sintetizadas a partir de partes de purinas, liberadas pela hidrólise de ácidos nucléicos e nucleotídeos, fornecidos pelo turnover endógeno e pela dieta. Em ambas as vias de síntese, as moléculas de purinas são montadas diretamente ligadas a uma molécula de pentose (RUDOLPH, 1994).

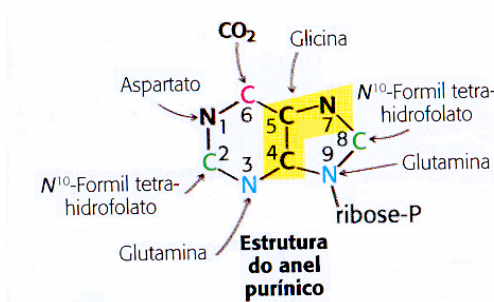


Figura 3 : Origem dos átomos do anel purínico na via *de novo* para síntese de nucleotídeos em células de mamíferos (BERG et al, 2004; CARVER e WALKER, 1995).

Os nucleotídeos de uma célula no organismo sofrem contínua renovação. Eles são degradados, bem como os nucleotídeos obtidos através da dieta, por hidrólise a nucleosídeos pela ação das nucleotidasas. Os nucleosídeos por sua vez são clivados a bases livres e pentoses ligadas a um grupamento fosfato por nucleosídeos fosforilases. Algumas das bases são reutilizadas, formando nucleotídeos por vias de recuperação, outras são degradadas a produtos que são excretados. O AMP, por exemplo, é degradado à base livre hipoxantina por desaminação e clivagem hidrolítica da ligação glicosídica. A xantina oxidase, uma flavoproteína contendo ferro e molibdênio, oxida a hipoxantina a xantina e então a ácido úrico. O oxigênio molecular, o oxidante em ambas as reações, é reduzido a H_2O_2 , que é decomposto em H_2O e O_2 , pela catalase. Todo esse processo que tem como produto final o ácido úrico ocorre no fígado (BERG et al, 2004).

Por ser um ácido fraco (pK_a 5,8), a molécula de ácido úrico em presença do pH fisiológico tende a ser ionizada, perdendo um próton, tornando-se íon urato. Todo esse mecanismo é demonstrado na figura 4. Livre no organismo, os íons uratos ligam-se a cátions, principalmente Na^+ , que além de ser muito reativo é o íon em maior quantidade no organismo, formando urato de sódio. O organismo humano não é capaz de metabolizar o urato, que é eliminado pelo intestino e rins (LEHNINGER, 2002).

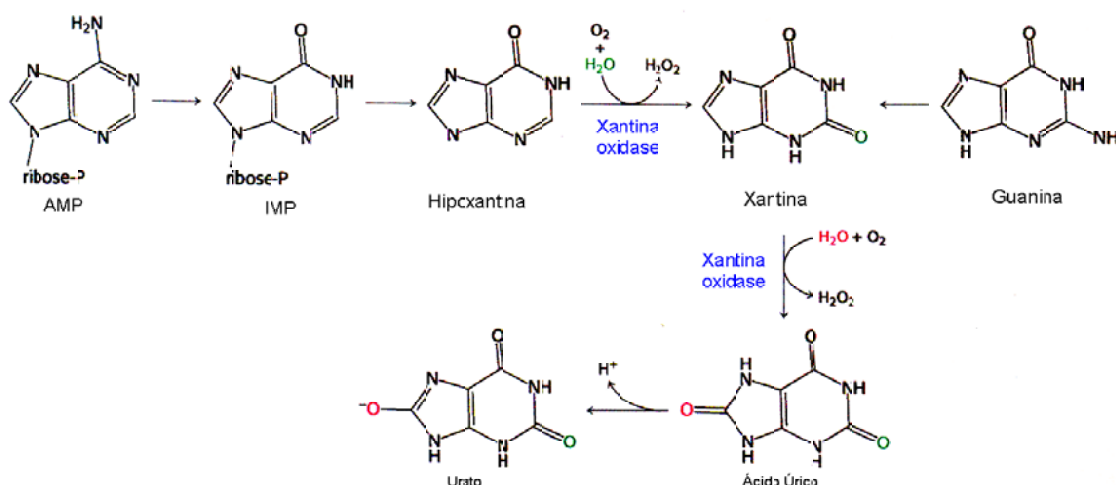


Figura 4: Exemplo do metabolismo das purinas (BERG et al, 2004).

1.4.2 Influência Fisiológica das Moléculas de Urato

Em outras espécies animais há a presença de uma enzima chamada uricase que degrada o ácido úrico em allopurinol, um composto mais solúvel, que não oferece risco de deposição nos tecidos. Nos humanos o gene da uricase é bloqueado por duas mutações que introduzem stop codons prematuros, impedindo a manifestação do mesmo (WU et al, 1992). Especula-se que isto seja uma estratégia evolutiva para aumentar a expectativa de vida da espécie humana já que o urato apresenta um efeito antioxidante no sangue, removendo radicais livres de forma tão eficaz quanto o ácido ascórbico, com a vantagem de se encontrar em um volume até seis vezes maior que este (CHOI et al, 2005). Embora os uratos possam estar envolvidos em atividades bioprotetoras, a hiperuricemia está intimamente ligada a risco de doenças cardiovasculares (VASUDEVAN e BALLANTYNE, 2005) e supressão dos níveis basais de insulina (ROCIC et al, 2005).

1.4.3 Epidemiologia

Apesar de apresentar-se em menos de 1% da população ocidental (SAAG e MILKYS, 2005), a incidência pode chegar a mais de 18% em alguns grupos

populacionais particulares, como acontece em algumas regiões de países asiáticos localizados no Pacífico Sul como China e Filipinas (MILKUSLS et al, 2003). Estudos epidemiológicos têm demonstrado a gota como uma consequência da interação de fatores genéticos e ambientais, como alimentação rica em proteínas, consumo excessivo de álcool, obesidade e uso a longo prazo de diuréticos (WORTMANN, 2002). Um exemplo disso é um estudo realizado com emigrantes filipinos nos EUA, por fatores genéticos e ambientais – dieta tradicional rica em frutos do mar - esses indivíduos apresentam altos índices de hiperuricemia e gota. Quando em contato com os hábitos alimentares ocidentais seus níveis de urato de sódio aumentam ainda mais, aumentando os riscos de desenvolverem gota (LUK e SIMKIN, 2005).

1.4.4 Processo Inflamatório na Artrite Gotosa

A crise aguda de gota costuma apresentar-se inicialmente de forma monoarticular, extremamente dolorosa, em casos raros esses ataques iniciais podem ser poliarticulares ou até mesmo pouco dolorosos. A articulação que costuma ser mais atingida em um primeiro ataque é a metatarsofalangeana (podagra), além dela outras articulações também muito atingidas são os tornozelos, joelhos, cotovelos, punhos e as articulações dos dedos. Essa preferência por articulações periféricas estaria relacionada, em parte, com as temperaturas mais baixas encontradas ali, em relação a outras partes do corpo (SEDA, 1982).

O limite de solubilidade do urato de sódio a uma temperatura de 37° C é de 6,5 mg%. Ao longo das articulações periféricas com a diminuição da temperatura, o limite de solubilidade tende a diminuir; a temperatura média de um tornozelo, por exemplo, é de 29°C e o seu limite de solubilidade para o urato é de aproximadamente 4,5 mg%. Outro fator que contribui para o depósito de cristais de urato nas articulações é a difusão mais rápida da água, pela membrana sinovial, quando comparada ao urato de sódio, provocando transitoriamente concentrações altas do cristal. Isso justificaria o fato do horário de maior incidência dos ataques de gota serem de madrugada, pois com o corpo em repouso a sua temperatura diminui e a difusão de água pela membrana sinovial é ainda maior favorecendo a precipitação dos cristais e o consequente processo inflamatório (SKARE, 1999).

Na cavidade sinovial o cristal de urato de sódio vai interagir com os fagócitos mononucleares de duas “maneiras”: da forma convencional com opsonização e fagocitose do antígeno, seguido de fusão lisosomal, explosão respiratória e liberação de mediadores inflamatórios; ou através de uma particular propriedade do cristal de urato de interagir diretamente com lipídios e proteínas da membrana celular através de ligações cruzadas com glicoproteínas na superfície de fagócitos. Esta interação ocorre através de diferentes vias de transdução de sinal como proteína G, fosfolipases C e D, proteínas tirosino quinases, entre outras. Essas duas vias vão permitir a expressão dos genes e respectiva liberação das citocinas: IL-1, IL-6, IL-8 e FNT- α , das proteínas S100A8 e S100A9 e, também da enzima constitutiva (ciclooxygenase-2), pelos monócitos, que vão ativar as células endoteliais vasculares e recrutar neutrófilos para o local da inflamação (POULIOT et al, 1998; RYCKMAN et al, 2004; CHOI et al, 2005).

Os monócitos têm um papel imprescindível no desencadeamento do ataque agudo da gota, junto com os mastócitos eles preparam o caminho para o infiltrado neutrofílico, dando segmento a inflamação, assim como vai estar envolvido também na conclusão do processo inflamatório agudo (PASCUAL et al, 1999). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que monócitos (células fagocitárias mononucleares jovens) são mais sensíveis a estímulos pró-inflamatórios, respondendo vigorosamente ao desenrolar natural da fagocitose com a liberação de seus mediadores inflamatórios, enquanto os macrófagos (células fagocitárias mononucleares maduras), mesmo fagocitando cristais de urato de sódio, falham na liberação destes mediadores, não desencadeando a ativação do endotélio vascular nem a migração de neutrófilos, apresentando uma atividade “não inflamatória” que determina o final do ataque agudo da gota, preservando o estado assintomático característico da gota intercrítica (YAGNIK et al, 2000; LANDIS et al, 2002).

Estes são períodos quiescentes entre episódios de artrite aguda que podem durar de meses a anos, apesar de haver cristais de urato de sódio no líquido sinovial das cavidades articulares. Com a evolução da doença, particularmente em pacientes não tratados adequadamente, estes períodos tendem a diminuir progressivamente até se instalar um quadro crônico (WOOLF, 1998).

O sistema complemento, normalmente inativo em articulações hígidas, é significativamente ativo em articulações gotosas pela ativação direta das suas duas vias, clássica e alternativa, pelos cristais de urato de sódio, sem que haja a formação de um complexo antígeno – anticorpo, que é o desencadeador natural da via clássica (GICLAS, 1979).

Os fragmentos menores resultantes da clivagem do complemento, C3a e C5a, são denominados de anafilatoxinas e desempenham vários papéis de relevante importância biológica. Junto com a IL-1, eles vão ativar os mastócitos tissulares, provocando sua desgranulação e conseqüente liberação de mediadores biológicos em particular a histamina, a qual vai ativar as células endoteliais vasculares através de receptores específicos (H_1), promovendo vasodilatação (SCHIITZ et al, 2002; DALBETH e HASKARD, 2005). As anafilotoxinas vão também induzir a contração da musculatura lisa dos vasos resultando num influxo plasmático para dentro do tecido, facilitando a diapedese dos neutrófilos, sobre os quais elas vão também exercer quimioatração (GOLDSBY, 2002). Outros fragmentos do complemento, que não anafilotoxinas, também participam da inflamação gotosa. Estudos em animais demonstraram que o C5b-9, fragmento final do complexo de ataque à membrana (CAM), última via final do complemento, apresenta uma resposta maior à presença dos cristais de urato de sódio no recrutamento de neutrófilos que as anafilotoxinas (TRAMONTININI, 2004).

As células endoteliais ativadas, principalmente, pela IL-1 (α ou β) e FNT- α , vão expressar em sua superfície moléculas de adesão celular como E-selectina, molécula de adesão intercelular- 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), nas quais os neutrófilos vão se ligando durante o processo de marginação da parede vascular, atraídos pelo gradiente de agentes quimiotáticos, até realizar a diapedese (HASKARD e LANDIS, 2002).

No interior da cavidade sinovial os neutrófilos vão seguir o gradiente de concentração de agentes quimiotáticos como C5a, leucotrieno B₄, IL-1 e IL-8, até entrar em contato com os cristais de urato de sódio e fagocitá-los (SPRINGER, 1994). No processo de fagocitose, eles vão ser estimulados a liberar as proteínas S100A8 e S100A9, que são produzidas no citoplasma e que vão ter importante

função na amplificação do processo inflamatório agindo como fatores quimiotáticos para neutrófilos (ROULEAU et al, 2003).

A natureza auto-limitante do ataque agudo da gota ocorre através de alguns mecanismos, como a diferenciação dos monócitos em macrófagos, já mencionado, a apoptose dos neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório e o envolvimento dos cristais por lipoproteínas (apolipoproteínas B e E), que tem sua produção pelos macrófagos induzida pelos próprios cristais, os quais quando fagocitados envolvidos por estas, inibem a desgranulação do neutrófilo, evitando a liberação de mediadores quimiotáticos (TEKELTAUB ET AL, 1984).

2. JUSTIFICATIVA

A *Hyptis pectinata* L. Poit. (sambacaitá) é uma planta a qual é atribuída um amplo espectro de atividades terapêuticas, assegurado pelo seu largo uso popular, através das mais variadas formas de utilização, sendo duas das principais: o chá e a

inalação; as quais servem de indicação para a obtenção do Extrato Aquoso Bruto e do Óleo Essencial. Neles os princípios ativos das duas formas de administração citadas são respectivamente encontrados de forma mais abundante; na primeira, os compostos que se apresentam solúveis em água e na segunda, apenas compostos voláteis; ambos já tiveram várias das propriedades atribuídas à planta analisada e, na maioria das vezes, comprovadas em modelos *in vitro* e *in vivo*, entre elas a analgésica, a qual este trabalho se propõe a analisar em uma condição mais específica. Um modelo de artrite induzida por cristais de urato de sódio em ratos simulando uma condição artrítica gotosa, visto que a propriedade analgésica do sambacaitá costuma ser utilizada popularmente em doenças reumáticas. A pesquisa de novas alternativas terapêuticas para artrite gotosa, como também para outras doenças reumáticas contribui para o alcance de novos agentes terapêuticos que com o uso prolongado, devido ao caráter crônico das doenças, apresentem menos distúrbios e reações adversas que os tratamentos comumente utilizados como referências terapêuticas.

3. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a toxicidade aguda e a propriedade antinociceptiva do extrato aquoso e do óleo essencial de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Sambacaitá) em modelo de artrite induzida por cristais de urato de sódio em articulação tíbio-tarsal (tornozelo) de ratos wistar.

Específicos:

- Determinar a dose letal do extrato aquoso e óleo essencial de *Hyptis pectinata* utilizados na pesquisa;
- Identificar através de triagem fitoquímica as principais classes de compostos orgânicos presentes no extrato aquoso utilizado;
- Identificar os constituintes do óleo essencial utilizado através de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG/EM);
- Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso e do óleo essencial da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Sambacaitá).

4. METODOLOGIA

4.1 Material Botânico

Os espécimes de *Hyptis pectinata* foram coletados dentro do período de floração, em maio de 2005, na Fazenda Santa Clara, no povoado Miranda no município de Capela – SE. A identificação da planta foi feita pelo Prof. Dr. Adalto Ribeiro, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, por comparação com exsicata depositada no Herbário desta mesma instituição, sob o número ASE 2626.

4.2 Preparação do Extrato Aquoso

As folhas foram secas em estufa com renovação e circulação de ar MA037 Marconi (Piracicaba SP, Brasil) a 40° C por 96 horas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Fisiologia. Em seguida foram trituradas até a obtenção de um pó de textura fina ao qual foi adicionado 100g em 1L de água destilada a 100° C. Esta solução ficou em infusão, tampada com vidro de relógio, sendo agitada esporadicamente com bastão de vidro, até chegar a uma temperatura em torno de 60° C. A solução foi filtrada a vácuo e liofilizada em equipamento Benchtop da Virtis (Warminster PA, EUA) no Laboratório de Fitoquímica, obtendo-se 9,71g de um pó fino, seco e altamente higroscópico, que foi conservado em frascos de vidro âmbar estéreis a aproximadamente 5° C em geladeira comum, no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Fisiologia.

4.3 Extração do Óleo Essencial

Um montante de 6.604g de folhas frescas foi submetido à técnica de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger para obtenção do óleo essencial (GUENTHER, 1972 apud BLANK, 2005) no Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Engenharia Agrônômica. Os 9,2mL de óleo essencial obtidos foram estocados em frascos de vidro âmbar estéreis a aproximadamente -4° C em freezer comum, no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Fisiologia.

4.4 Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso

Alguns grupos metabólitos presentes no Extrato Aquoso de *H. pectinata* (L.) Poit foram determinados, qualitativamente, em testes de triagem fitoquímica segundo os protocolos propostos por Matos (MATOS, 1997).

4.5 Análise e Identificação dos Componentes do Óleo Essencial

Amostras do óleo essencial foram analisadas utilizando-se cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu QP5050A interfaceada com espectrômetro de massa (CG/EM) dotado de coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm) conectado em um detector operando em impacto eletrônico a 70V; gás de arraste Hélio (fluxo 1 mL/min) e programação: 80° C (1min), 3° C/min, 180° C (0 min), 10° C/min, 300° C (3 min), tipo de injeção split 1: 100 (Shimadzu do Brasil, São Paulo SP). Os cálculos dos índices de retenção foram feitos através da co-injeção de n-alcanos. A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada baseada nos índices de retenção (ADAMS, 1995) e pela comparação do espectro de massa com o banco de dados das bibliotecas NIST21 e NIST107. A concentração dos constituintes foi calculada a partir da área de pico do CG e arranjada em ordem de eluição.

4.6 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, entre 20 e 30 g e ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar de ambos os sexos entre 200 e 280 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os camundongos e os ratos foram trazidos para o Biotério do Departamento de Fisiologia, com no mínimo dois dias de antecedência aos experimentos onde foram mantidos em caixas plásticas (33 x 40 x 17 cm) com tampa de arame, contendo 6 animais respectivamente por caixa, água e comida (ração Purina®) foram fornecidas, “*ad libitum*”. Quando submetidos a administração por via oral os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 6 horas antes dos experimentos. Na execução dos experimentos foram observadas as normas éticas de manipulação dos animais. O Comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Sergipe (CEPA UFS) apreciou e aprovou os procedimentos metodológicos realizados neste trabalho, vide anexo 1.

4.7 Determinação da DL₅₀ do Extrato Aquoso e do Óleo Essencial de *Hyptis pectinata* (L.) Poit.

A avaliação da toxicidade aguda se deu pela determinação da dose letal, para 50 % dos indivíduos de um grupo (DL₅₀), expresso em g/kg, e foi realizada pelo método de Probit; que é um método de análise estatística, utilizado para expressar a incidência de uma resposta, em fenômenos biológicos que só admitem duas possibilidades de expressão, neste caso, animal vivo ou morto (BIER, 1984).

Foram utilizados grupos de camundongos de ambos os sexos (n=6: 3 machos e 3 fêmeas) que receberam por via oral as substâncias avaliadas e os respectivos controles (veículos de administração das substâncias). Em seguida, estes tiveram o número de óbitos contabilizados por um período de 48 horas.

Inicialmente, o O.E. e o E.A. foram administrados em grupos distintos, na maior dose utilizada no modelo (5 g/Kg). A ausência de óbitos em algum grupo encerra a avaliação de toxicidade da sua respectiva substância, pois indica um valor de DL₅₀ bem acima de 5 g/Kg, significando uma toxicidade extremamente baixa, por isso de baixa significância, não sendo avaliada por esse modelo.

Foi então realizada a administração das doses 1 e 3 g/Kg, e conforme os resultados destas junto com a primeira, foram escolhidas duas doses intermediárias próximas à provável DL₅₀, para completar as cinco doses necessárias para a execução dos cálculos. Em posse do número de óbitos foram feitas as determinações.

4.8 Produção dos Cristais de Urato de Sódio

Os cristais de urato de sódio monohidratado foram preparados segundo o método proposto por Seegmiller e colaboradores em 1962 (CODERRE e WALL, 1986): dois gramas de ácido úrico foram dissolvidos em 400ml de água destilada fervida, contendo 12 mL de solução de NaOH a 1 M. O pH final da solução foi

ajustado a 7.2, verificado por um pHmetro portátil, usando solução de HCl a 10% para ajustar o pH. Após se encontrar a temperatura ambiente à solução foi estocada por 12 horas a uma temperatura próxima aos 5° C, em geladeira comum no Laboratório de Farmacologia. O precipitado obtido foi filtrado da solução e colocado em um becker que permaneceu por três dias num aparelho concentrador da Labconco (Kansas City MI, EUA) do Laboratório de Química Farmacêutica, para retirar o resto da umidade do urato, este foi então acondicionado em frasco estéril de vidro âmbar e guardado em um dessecador, sendo manipulado apenas na preparação da solução a ser administrada nos animais.

4.9 Injeção dos Cristais de Urato de Sódio

Os cristais foram preparados em uma solução de tweem 80 a 10% em solução salina na concentração de 0,5 mg/mL. Desta solução, foi injetado com agulha e seringa de insulina um volume de 0,05mL na articulação tíbio-tarsal da pata direita dos ratos em experimentação. Cada animal recebeu 0,025 mg de urato de sódio (CODERRE e WALL, 1986).

4.10 Grupos Experimentais

O trabalho foi realizado com doze grupos de ratos (n=6), cujo tratamento recebido está descrito a seguir:

- » Três grupos receberam o E. A. da *H. pectinata* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, por via oral, uma hora antes do experimento.
- » O grupo controle do E.A. recebeu solução salina, que foi o seu veículo de administração, por via oral, uma hora antes do experimento.
- » Três grupos receberam o O.E. da *H. pectinata*, nas respectivas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, por via subcutânea, meia hora antes do experimento.
- » O grupo controle do O.E. recebeu uma solução de Propilenoglicol + Água destilada (em partes iguais), que foi o seu veículo de administração, por via subcutânea, meia hora antes do experimento.

Outros dois grupos receberam drogas padrões:

» O primeiro grupo recebeu Colchicina (2 mg/Kg), por via intraperitoneal, quatro horas antes do experimento.

» O segundo grupo recebeu Morfina (5mg/kg) por via subcutânea meia hora antes do experimento.

A avaliação de uma possível ação antinociceptiva pela via opióide se deu pelo uso da Naloxona, que é um antagonista opióides.

» O grupo E.A. 50 mg/kg, por ter demonstrado melhor efeito antinociceptivo, foi repetido, sendo submetido quinze minutos antes do experimento à administração de Naloxona (2,5 mg/kg), por via subcutânea.

» O grupo controle da eficácia da Naloxona foi tratado com Morfina da mesma forma que o segundo grupo de droga padrão. Sendo em seguida tratado com Naloxona, da mesma forma citada no grupo anterior.

4.11 Modelo de Antinocicepção, em Condição Artrítica, Induzida por Cristais de Urato de Sódio (CODERRE & WALL, 1986).

Antes da realização do experimento, os animais foram submetidos a três treinos, em dias sucessivos e anteriores ao do experimento, que consistiu em colocá-los sobre o suporte para se habituarem ao local do experimento. No primeiro treino, os animais ficaram inicialmente livres para explorar a superfície, no segundo e terceiro foram imobilizados com auxílio de uma flanela, na posição experimental, havendo simulação do experimento com a água em temperatura ambiente; tais treinos promoveram a ambientação dos animais ao local e às condições do experimento, evitando assim que, os animais, sofram estresse na hora do experimento.

Após vinte e quatro horas da aplicação da solução de urato de sódio, os ratos foram colocados sobre uma superfície de madeira (32 x 17 cm), forrada com papel adesivo branco para facilitar a limpeza, tendo dois orifícios de 2 cm de diâmetro nas laterais da superfície; ela estava acoplada sobre um banho quente com temperatura constante de $50 \pm 1^\circ \text{C}$. Na referida superfície, eles ficaram imobilizados, de forma calma, com ajuda de uma flanela, em posição que suas patas posteriores ficassem entre os orifícios. As patas foram delicadamente mergulhadas

na água, um de cada vez, primeira a direita e depois a esquerda e, o tempo de latência para a retirada de cada uma destas da água foi medido em segundos com um cronômetro, obedecendo um tempo de corte de doze segundos. Entre cada animal a superfície era limpa com álcool a 30 % e a cada dois animais a temperatura era reavaliada com a ajuda de um termômetro.

Os tempos de latência obtidos de cada uma das patas traseiras, de cada animal, foram subtraídos entre si; a pata direita pela pata esquerda e, o valor obtido desta subtração usado como parâmetro estatístico, simbolizado pela letra grega delta (Δ).

$$\text{T. de latência pata direita} - \text{T. de latência pata esquerda} = \text{Delta } (\Delta)$$

4.12 Eutanásia dos Animais

Após o experimento de nocicepção, os animais foram eutanasiados por inalação de dose excessiva de éter, dentro de um frasco de vidro de proporções adequadas para os animais. A confirmação da morte do animal se deu pela ausência de reflexo palpebral e principalmente por ausência de atividade cardíaca.

4.13 Análise Estatística

Os dados experimentais foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M.). A Significância foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) de uma via e *post hoc* Tukey. Foram considerados os valores de $p < 0,05$ como significativos. Foi utilizada a estatística paramétrica, visto que o Teste de Kolmogorov-Sminov caracterizou os dados obtidos como normais (distribuição gaussiana). Estes procedimentos foram realizados no programa GraphPad Prism 4.0 (cortesia do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Sergipe).

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento do Óleo Essencial e Extrato Aquoso obtidos

O extrato aquoso bruto apresentou um rendimento de 9,71% e o óleo essencial um rendimento de 0,14 %.

5.2 Determinação da DL₅₀.

Extrato Aquoso:

Não foi observado nenhum óbito até 48 horas após a administração oral do extrato na maior dose (5 g/Kg), não sendo assim possível determinar a DL₅₀. A solução salina foi o veículo utilizado para a administração do extrato aquoso, como esperado apresentou-se inerte, vide tabela 2.

Óleo Essencial:

O óleo apresentou uma toxicidade crescente conforme o aumento da dose utilizada: 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 5,0 g/kg . O veículo utilizado para a administração, PPG, não apresentou efeito tóxico. Os dados obtidos estão dispostos na tabela abaixo; .

Tabela 2 – Dados do efeito tóxico agudo do O.E. da *H. pectinata* L.

Grupo	1,0 g/Kg	1,5 g/Kg	2,0 g/Kg	3,0 g/Kg	5,0 g/Kg	PPG
Animais	6	6	6	6	6	6
Óbitos	2	4	5	5	6	0
Percentagem de óbitos (%)	33,33	66,66	83,33	83,33	100	0

A determinação da toxicidade aguda do O.E. de *H. pectinata* L. foi 1,1 g/kg, de animal e é representada graficamente na figura 5 .

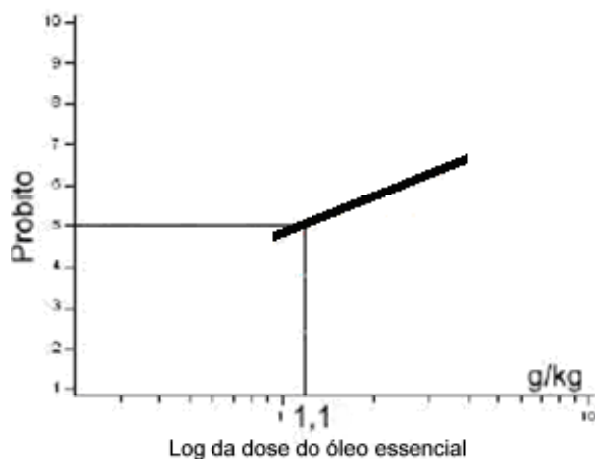


Figura 5: Representação gráfica da DL₅₀. Produzida com o Software Origin 7.5

5.3 Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso

Nos testes preliminares de fitoquímica as principais classes de metabólitos detectados foram alcalóides, taninos e flavonóides, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 3 - Triagem Fitoquímica do Extrato Aquoso.

Grupos Químicos	Reagentes Aplicados	Resultados
Alcalóides	Dragendorff	++
	Marques	+
	Mayer	-
	Wagues	+
Esteróides e/ou Terpenóides	Lieberman-Buchard	-
Taninos	Cloreto férrico 2%	+++
Flavonóides	HC/NH ₃	+++
Saponinas	Água destilada	-
	Lieberman-Buchard	-

* (-) Reação negativa, (+) Reação fracamente positiva, (++) Reação positiva, (+++) Reação fortemente positiva.

5.4 Análise e Identificação dos Componentes do Óleo Essencial

A concentração dos constituintes foi calculada a partir da área de pico do CG/MS e arranjado em ordem de eluição, conforme a figura 6.

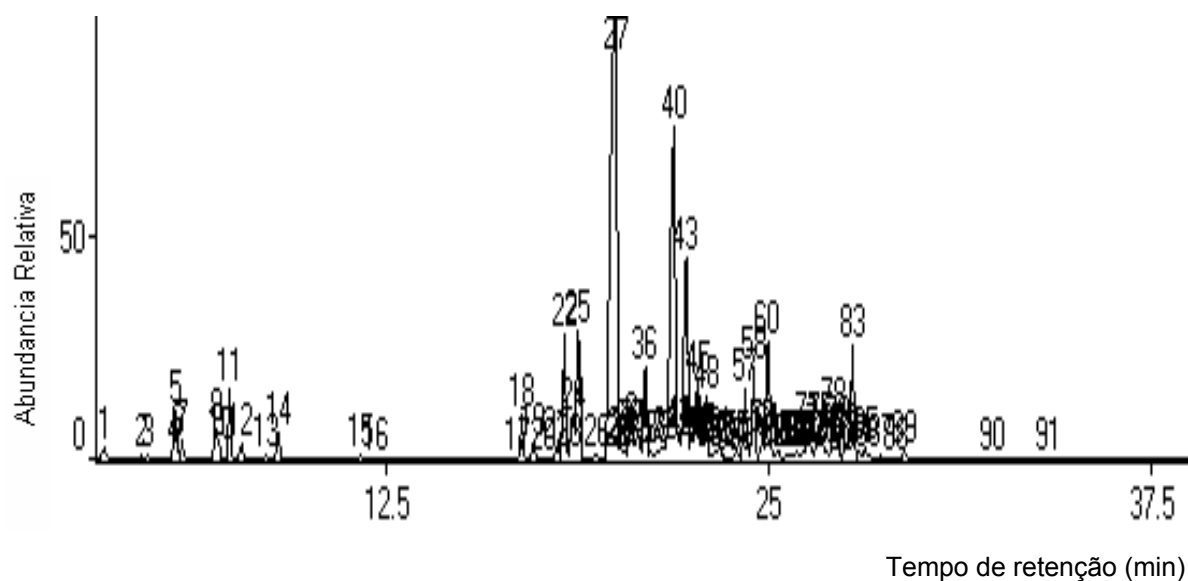


Figura 6: Cromatograma da corrente iônica total

Os constituintes detectados em maior quantidade foram β -cariofileno e germacreno-D, os quais representam 46,12% do total da amostra; os componentes restantes apresentaram menores porcentagens na amostra analisada. Os componentes estão dispostos na tabela abaixo por ordem de eluição, tendo sido desconsiderados aqueles que apresentaram porcentagem menor que 1%, para evitar interferências do aparelho. Dos noventa e um itens listados, quinze deles apresentaram esta condição, destes, onze foram identificados.

Tabela 4 - Constituintes do óleo essencial de *H. pectinata*, com presença na amostra < 1%.

Pico	TR (min)	Composto	(%)	IRR exp.*	IRR lit.**
11	7.375	(Z)- β -Ocimeno	1.06	1043	1040
22	18.292	α -Copaeno	2.90	1375	1376
25	18.725	Não identificado	3.37	1389	---
27	19.817	β -Cariofileno	29.28	1421	1418
36	20.942	α -Humuleno	2.26	1455	1454
40	21.817	Germacreno D	16.84	1482	1480
43	22.275	Biciclogermacreno	6.54	1496	1494
45	22.642	Germacreno A	2.42	1508	1503
48	22.950	δ -Cadineno	1.52	1517	1524
57	24.217	Germacreno B	1.89	1559	1556
58	24.500	Não identificado	2.34	1568	---
60	24.942	Oxido de cariofileno	3.18	1582	1581
75	26.725	epi- α -Cadinol	1.05	1641	1640
78	27.100	Não identificado	1.19	1654	---
83	27.708	Não identificado	3.16	1674	---

* Índice de retenção relativo aplicando a equação de VAN DEN DOOL, H. e KRATZ, P.D. (1963) ** Índice de retenção da literatura (ADAMS, 1995)

5.5 Efeito Antinociceptivo

Controles:

O grupo que recebeu o veículo propilenoglicol (PPG) não apresentou diferença significativa contra o grupo salina ($q_{0,05(1);4,29} = 2,911$; $p > 0,05$), bem como, o grupo tratado com colchicina (2mg/kg) ($q_{0,05(1);4,29} = 1,772$; $p > 0,05$). Já o grupo que recebeu morfina (10 mg/kg) apresentou a redução significativa na média do delta do tempo em relação ao grupo salina ($q_{0,05(1);4,29} = 7,772$; $p < 0,001$). O grupo que

recebeu morfina + naloxona (5mg/kg), também apresentou uma redução significativa da média do delta ($q_{0,05(1);4,29} = 5,43$; $p < 0,01$), e não apresentou reversão significativa do efeito do grupo morfina ($q_{0,05(1);4,29} = 2,342$; $p > 0,05$).

Tabela 5 – Efeito do veículo PPG e das drogas-padrão Colchicina e Morfina, no tempo de latência ao calor em ratos

Tratamento dose (mg/kg)	ΔT Média $\pm$ EPM	Redução do ΔT (%)
Controle (Salina)	4,85 $\pm$ 0,62	-
PPG	2,99 $\pm$ 0,66	38,35
Colchicina 2	3,72 $\pm$ 0,85	23,29
Morfina 10	-0,1 $\pm$ 0,57 ^a	102,06
Morfina 10 + Naloxona 5	1,38 $\pm$ 0,45 ^b	71,54

ANOVA: [$F_{0,05(1); 4,29} = 9,382$; $p < 0,0001$]; ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$; n=6. Teste de Tukey.

Extrato Aquoso:

Foi detectada redução significativa na média do delta apenas no grupo experimental E.A. 50 ($q_{0,05(1);4,29} = 7,329$; $p < 0,001$), que teve um efeito altamente significativo. Esse efeito foi revertido significativamente quando tratado com o antagonista opióide Naloxona (5mg/kg) ($q_{0,05(1);4,29} = 1,158$; $p > 0,05$). Demonstrou-se ainda, uma diferença significativa quando comparando os grupos E.A.50 e E.A.50 + Naloxona ($q_{0,05(1);4,29} = 6,17$; $p < 0,01$).

Tabela 6 – Efeito do E.A. de *H. pectinata* no tempo de latência ao calor em ratos

Tratamento / dose (mg/kg)	Média $\pm$ EPM	Redução do ΔT (%)
Controle (Salina)	4,85 $\pm$ 0,62	-
E.A. 50	0,07 $\pm$ 0,59 ^a	98,55
E.A. 50 + Naloxona 5	4,09 $\pm$ 0,83	15,7
E.A. 100	3,93 $\pm$ 0,68	18,96
E.A. 200	3,17 $\pm$ 0,45	34,63

ANOVA: [$F_{0,05(1); 4,29} = 8,139$; $p = 0,0002$]; ^a $p < 0,001$; n=6. Teste de Tukey.

Óleo Essencial:

Não foram detectadas reduções significativas nas médias dos deltas. A única alteração significativa observada foi a do grupo experimental O.E. 100, que apresentou aumento significativo da sua média para acima da média do controle ($q_{0,05(1);3,23} = 4,79$; $p < 0,05$).

Tabela 7 – Efeito do O.E. de *H. pectinata* no tempo de latência ao calor em ratos

Tratamento / dose (mg/kg)	Média $\pm$ EPM	Redução do ΔT (%)
Controle (PPG)	2,99 $\pm$ 0,66	-
O.E. 50	1,1 $\pm$ 0,4	63,21
O.E. 100	5,3 $\pm$ 0,56 ^c	-77,25
O.E. 200	2,22 $\pm$ 0,27	25,75

ANOVA: [$F_{0,05(1); 3,23} = 12,62$; $p < 0,0001$]; ^c $p < 0,05$; $n=6$. Teste de Tukey.

6. Discussão

No estudo de toxicidade aguda, o extrato aquoso da *H. pectinata* não levou a óbito nenhum dos camundongos que receberam a solução do extrato na dose de 5 g/kg (v.o.), não sendo possível determinar a sua DL_{50} . Segundo DIETRICH (1983), uma droga que não apresente letalidade a animais de laboratório na dose de 5 g/kg, possui baixa toxicidade. Esse dado confirma a baixa toxicidade do extrato aquoso da *H. pectinata* já relatado por BISPO e col. (2001); corroborando com o conhecimento popular que não atribui qualquer efeito tóxico ao chá de sambacaitá.

O óleo essencial da *H. pectinata*, ao contrário do seu extrato aquoso, apresentou efeito tóxico. A partir da percentagem de óbitos provocados pelo óleo essencial nas três doses inicialmente utilizadas (1 g/kg: 33,33% de mortos, 3 g/kg: 83,33% e 5 g/kg: 100%), foram escolhidas outras duas doses para completar o número de doses necessárias para o cálculo da DL_{50} , através do método dos probitos. A provável localização da DL_{50} entre as doses 1 e 3 g/kg levou à escolha das doses 1,5 e 2 g/kg. A DL_{50} estimada pelo método dos probitos foi de 1,1 g/ kg.

Não foi objetivo do trabalho estudar a *causa mortis* dos animais, nem avaliar as alterações comportamentais ocorridas após a administração do óleo essencial; no entanto, chamou a atenção logo após a administração deste, um quadro de letargia na maioria dos camundongos, seguido de perda de reflexo postural e perda da consciência, seguindo-se na dose mais alta por apnéia e morte em um período inferior a uma hora após a administração; sugerindo um efeito depressor do óleo essencial.

A triagem fitoquímica do extrato aquoso revelou a presença de alcalóides, taninos e flavonóides. Não foi revelada a presença de saponinas, nem de esteróides e/ou terpenóides, no caso dos terpenóides, por serem extremamente voláteis o próprio processo de obtenção do extrato aquoso pode ter influenciado a sua ausência na amostra.

Para a análise da composição química do óleo essencial, os seus constituintes foram separados no cromatógrafo a gás (CG) e, em seguida, o espectrômetro de massa (MS) informou a estrutura de cada um dos componentes. Foram obtidos noventa e um constituintes isolados, destes, apenas quinze apresentaram concentração acima de 1% na amostra, os que se encontraram abaixo desta percentagem foram descartados para evitar que possíveis ruídos do aparelho fossem tratados como constituintes químicos.

Para a identificação dos componentes do óleo essencial foram necessários os índices de retenção fornecidos pelo cromatógrafo a gás, e os padrões de espectro de compostos isolados dos bancos de dados do espectrômetro de massa, o cruzamento entre esses dados forneceu a identificação dos compostos químicos. A ausência de um padrão correspondente a um determinado composto prejudicou a identificação do mesmo. Quatro dos quinze constituintes relatados não foram identificados, pela ausência de seus respectivos padrões nos bancos de dados do espectrômetro de massa.

Os constituintes identificados em maior quantidade foram o β -cariofileno e o germacreno-D, eles apresentaram percentagem de 29.28% e 16.84%, respectivamente. O β -cariofileno, é um sesquiterpeno que faz parte do mecanismo de defesa nas plantas, apresenta efeito repelente contra insetos e antifúngico (CAI, 2002). Em estudos *in vivo* e *in vitro* demonstrou atividade analgésica local (GHELARDINI, 2001), e também alérgica (SKÖLD, 2006). O germacreno-D, outro sesquiterpeno, é um poderoso feromônio que exerce quimioatração a várias classes de insetos (MOZURAITIS, 2002).

Para a análise dos dados do estudo antinociceptivo foi utilizada análise estatística paramétrica, por se tratar de uma pesquisa quantitativa e por ter variáveis não-ordinais. Os dados obtidos obedeceram à distribuição gaussiana, sendo submetidos, em seguida, ao Teste de Kolmogorov-Smirnov (Teste da Normalidade) e ao pós-Teste de Tukey. O Teste de Tukey é a alternativa mais indicada nos estudos em que há a comparação com um grupo controle, para os efeitos de um dado experimento (BARROS e REIS, 2003).

Na avaliação do efeito antinociceptivo dos controles, o propilenoglicol não apresentou efeito antinociceptivo, como já era esperado, isso permitiu o uso dele como veículo para a administração do óleo essencial e conseqüentemente como controle negativo do mesmo.

A colchicina não apresentou efeito antinociceptivo. Relatos na literatura a respeito do emprego da colchicina em modelos de artrite, induzida por cristais de urato de sódio, em humanos e animais, demonstraram essa ausência de antinocicepção, indicando que a ação analgésico não ocorre quando ela é administrada como pré-tratamento de um quadro de artrite ainda não totalmente estabelecido, mas apenas como tratamento da artrite já estabelecida (CODERRE e WALL, 1987).

Em uma condição clínica, a ação analgésica da colchicina se dá de forma indireta, pela redução do processo inflamatório. Ela se liga à tubulina, principal proteína que constitui o citoesqueleto celular, promovendo a sua despolimerização, impedindo assim, a diapedese de leucócitos para o foco inflamatório articular e periarticular (CANNELLA et al, 2005). Com isso, diminui a liberação pelos leucócitos de prostaglandinas no local da inflamação. As prostaglandinas in loco agem sobre receptores para bradicinina, nas terminações nervosas, sensibilizando-os para potencializar a ação da própria bradicinina. (RANG et al, 2001).

A morfina diminuiu significativamente o delta do tempo de retirada de pata, do grupo em que foi administrada, indicando um efeito antinociceptivo central, o qual não foi revertido significativamente pela naloxona.

O extrato aquoso demonstrou uma significativa resposta antinociceptiva na dose de 50 mg/kg de animal, apresentando uma redução no delta do tempo de latência, em relação ao controle, de 98,55% ($p < 0,001$). Esse efeito foi revertido significativamente quando animais tratados com esta mesma dose do extrato aquoso foram pós-tratados com um antagonista opióide (naloxona), sugerindo uma possível via de ação através de receptores opióides, de um ou mais constituintes do extrato aquoso.

O óleo essencial da *H. pectinata* não apresentou efeito antinociceptivo em nenhuma das doses utilizadas, apesar de estudos anteriores indicarem esse efeito nos modelos: contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6 %, e hot plate (BLANK,2005).

Este trabalho contribui para a compreensão dos efeitos do óleo essencial e extrato aquoso da *Hyptis pectinata* L. e sugere a necessidade de se obter novos conhecimentos em estudos complementares futuros para o uso seguro como fitoterápico. Contudo, outros estudos complementares deverão ser realizados para melhor elucidação dos mecanismos de ação das substâncias que compõem o óleo essencial e extrato aquoso da planta em estudo.

7. CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos na presente investigação, foi possível concluir que:

- As principais classes de metabólitos identificados na amostra de extrato aquoso foram alcalóides, taninos, e flavonóides;
- Os principais constituintes químicos identificados na amostra do óleo essencial foram β -cariofileno e germacreno-D, ambos de estrutura terpênica;
- O extrato aquoso da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. apresentou baixa toxicidade, na administração por via oral, não sendo possível determinar sua DL₅₀;
- O Óleo essencial da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. apresentou alta toxicidade quando administrado por via oral. DL₅₀ 1,1 g/Kg;
- O extrato aquoso da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. apresentou efeito antinociceptivo central no modelo utilizado;
- O óleo essencial da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. não apresentou efeito antinociceptivo no modelo proposto;
- A ação do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* (L.) Poit. sugere envolver a participação de receptores opióides.

8. REFERENCIAL TEÓRICO

ADAMS, R. P. **Identification of the essencial oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Alured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois USA. 1995.

BARROS, M. G.V.; REIS, R. S. **Análise de dados em atividade física e Saúde: demonstração da utilização do SPSS**. Midiograf, Curitiba-PR. 2003.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**, 5 ° ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 2004.

BIER, O. **Microbiologia e Imunológica**. Ed. Melhoramentos, São Paulo.1984.

BISPO MD, MOURAO RH, FRANZOTTI EM, BOMFIM KB, ARRIGONI-BLANK MF, MORENO MP, MARCHIORO M, ANTONIOLLI AR. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of Hyptis pectinata leaves in experimental animals. **The journal of Ethnopharmacology**; v. 76, n. 1, p. 81-6. 2001.

BLANK, M. F. A. **Estudos agrônômicos, químico do óleo essencial, anti-edematogênico, antinociceptivo e perfil isoenzimático de Hyptis pectinata L. POIT**. Tese apresentada ao Programa em química e biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas. Maceió-AL. 2005

BOALINO, D.M.; CONNOLLY, J. D.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. F. Alpha-pyrones and a 2(5H)-furanone from Hyptis pectinata. **Phytochemistry**; v. 64 n. 7, p.1303-7. 2003

BOMFIM, K. B. R. **Farmacologia de plantas medicinais analgésicas de uso popular da caatinga. Poço Redondo / SE**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, da Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão - SE . 2001

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 48 de 16.03.2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 18.03.2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 05.10.2005

CAI, Y.; JIA, J.W.; CROCK, J.; LIN, Z.X.; CHEN, X.Y.; CROTEAU, R. A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**; v. 61, n. 5, p. 523-9. 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**; v. 55, n. 3 p. 37-39. São Paulo . 2003.

CANELLA, A. C.; MIKULS, T. R. Understanding Treatments for gout. **The American Journal of Managed Care**; v. 11, s. 15, p. S451-8. 2005

CARVALHO, I.B.M. de. **O uso popular de plantas medicinais da caatinga do povoado de Curitiba: município de Canindé do São Francisco, Sergipe**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, da Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão - SE . 1999

CARVER J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **Nutricional Biochemistry**; v. 6, p. 58-72. 1995

CHOI, H. K.; MOUNT, D. B.; REGINATO, A. M. Pathogenesis of Gout. **Annals of Internal Medicine**; v. 143, n.7 p. 499-516. 2005.

CODERRE, T.J.; WALL, P.D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain**; v. 28, n. 3, p. 379-93. 1986.

CODERRE, T.J.; WALL, P.D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents. **Pharmacology Biochemistry & Behaviour**; v. 29, p. 461-6. 1987

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In : BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CSURHES, S.; EDWARDS, R. **Potential Environmental Weeds in Australia. National (Weeds Program) Queensland**. Department of Natural Resources, January 1998 - Australian Government Department of the Environment and Heritage. Disponível em: <<http://www.deh.gov.au/biodiversity/invasive/publications/weeds-potential/appendix-c-h.html>> Acesso em: 20.11.2004.

CUNHA, M. C. Populações tradicionais e a convenção da diversidade biológica.

Estudos Avançados, v.13, n.36, p.147 – 163, 1999

DALBETH, N.;HASKARD,D.O. Mechanisms of inflammation in gout. **Rheumatology**; v. 44, p. 1090-96, 2005.

DIETRICH, L. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 54, p. 275–287, 1983

DOHRELY, M.; WHICHER J. T.; DIEPPER, P. A. Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate monohydrate crystals and other inflammatory particles. **Annals Rheumatic Diseases**; 42: 285-291, 1983

ELISABETSKY, E. Etnofarmacológica como ferramenta de busca de novas substâncias ativas in SIMÕES, C. M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed. Ed. UFSC. Florianópolis-SC. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre-RS. 2000.

EUA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Natural resources conservation service**. Disponível em: <
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=HYPE3>> Acessado em 11.11.2005.

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

FRAGOSO-SERRANO M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from Hyptis pectinata. **Planta Medica**; v. 71, n. 3, p.278-80. 2005.

FREIRE, T. N. ; COELHO, R. M. ; ANTONIOLLI, A. R. ; BATISTA, J. S. ; SILVA, O. C. Atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de Hyptis pectinata (Lamiaceae). In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000, Recife, 2000.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**. 56(5-7), 387-389.2001.

GICLAS, P. C.; GINSBERG, M. H.; COOPER, N.R. Immunoglobulin G independent activation of the classical complement pathway by monosodium urate crystals. **The Journal of Clinical Investigation**; v. 63, p. 759-68, 1979.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby imunologia** 4º ed. Ed. Revinter, Rio de Janeiro. 2002.

HALL, A. P.; DAWBER, P. E.; McNAMARA, P. M. Epidemiology of gout and hyperuricemia. A long-term population study. **American Journal Medecine**; v. 42, p. 27-37, 1967.

HASKARD, D. O.; LANDIS, R. C. Interactions between leucocytes and endothelial cells in gout: lessons from a self-limiting inflammatory response. **Arthritis Reserch**; v. 4, s. 3, p. S91-S97, 2002.

KAYS, S.S.J. **Postharvest physiology of perishable plants products**. New York, EUA. Ed. Van Nostrand Reinhold, 1991.

KELLEY, W.; WORTMANN, R. Gouty and Hyperuricemia in KELLEY, W et al **Textbook of Rheumatology**. Cap. 80, 5º ed. Philadelphia, EUA. 1997.

KISSMAN, K; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo III. Ed. BASF, São Bernardo do Campo, SP. 1995.

LANDIS, R. C.; YAGNIC, D. R.; MARSHAL, D. Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. **Arthritis & Rheumis**. V. 46, p. 3026-33. 2002.

LAPLANTINE, F; RABEYRON, P.L. **Medicinas Paralelas**, São Paulo, Ed. Brasiliense, 1989.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica** 3ª ed. Ed. Sarvier, São Paulo. 2002

LOPES, R. C.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, v. 1 n. 3, p. 433-37, 2003.

LUK, A. J.; SIMKIN. P. A. Epidemiology of hiperuricemia and gout. **The American Journal of Managed Care**, v. 11, n. 15, p. 435-442. 2005.

MALAN K, PELISSIER Y, MARION C, BLAISE A, BESSIERE JM. The essential oil of Hyptis pectinata. **Planta Medica**; v. 54, n. 6, p. 531-2, 1988.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2 ed. Clarendon Press, Oxford, UK. 1987.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Editora UFV. Viçosa, MG. 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª ed. Edições UFC. Fortaleza-CE, Brasil, 1997.

MELO,G.B.; SILVA, R. L.; MELO, V. A.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S.O.; SILVA, P.M.; CASTRO-E-SILVA O. JR. Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepactomia parcial de 70%. Resultados preliminares. **Acta Cirúrgica Brasileira**; v. 16, s. 1, 2001.

MELO,G.B.; SILVA, R. L.; MELO, V. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SOUZA, M.E.J.; JORDANI,M.C.; CASTRO-e-SILVA, O. Effect of aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver mitochondrial. **Phytomedicine**; v. 12, p. 359-362. 2005.

MELO GB, SILVA RL, MELO V.A., LIMA S.O., ANTONIOLLI A.R., CASTRO-E-SILVA T., MARCASSA L.G., BAGNATO V.S., ZUCOLOTO S., RAMALHO L.N., RAMALHO F.S., CASTRO-E-SILVA O. JR. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. **Digestive Diseases Sciences**; v. 50, n.5, p. 949-54. 2005

MILKUSLS, T. R.; FARRAR, J. T.; BILKER, W. B. The treatament of asymptomatic hyperuricemia: results from the population-based general practice research database (GPRD). **Arthritis & Rheumatism**; v. 48, s. 9, p. S612. 2003.

MOZURAITIS, R.; STRANDEN, M.; RAMIREZ, M. I.; BORG-KARLSON, A. K.; MUSTAPARTA, H. (-)-Germacrene D increse attraction and oviposition by the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. **Chemical Scences**; v.27, n.6, p. 505-9. 2002.

NASCIMENTO, P. F. C. **Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e de colutórios sobre os *Streptococcus mutans***. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE. 2005.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos in SIMÕES, C M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, cap. 1, 2ª ed. Ed. UFSC. Florianópolis-SC. Ed. Universidade/UFRGS. Porto Alegre-RS. 2000.

OLIVEIRA, E.R. **O que é medicina popular** (Coleção Primeiros Passos, 125). Braziliense, São Paulo 1984.

PASCUAL, E.; BATLLE-GUALDA E.; MARTINEZ, A.; ROSAS, J.; VELA, P. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. **Annals Internaltional Medicine**; v. 131, p. 756-759, 1999.

PEREDA-MIRANDA R, Hernandez L, Villavicencio MJ, Novelo M, Ibarra P, Chai H, Pezzuto JM. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of Natural Products**; v. 56, n. 4, p. 583-93. 1993.

PIESTCHMANN, M.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J.; PANT, A. K.; MATHELA, C. S. Volatile constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). **Journal Essential Oil Reserch**; v. 10, p. 550-52. 1998.

POULIOT, M.; JAMES, M. J.; McCOLL, S. R.; NACCACHE, P.H.; CLELAND, L. G. Monossodium urate microcrystals induced cyclooxygenase-2 in human monocytes. **Blood**; v. 5, p. 1769-76, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; **Farmacologia**, 4º ed. Guanabara-Koogan, São Paulo. 2001.

RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondarymetabolites in plants: for progress, many outstanding problems. **Plant of Molecular Biology**; v. 24, n. 1, p. 1-20. 1994.

ROCIC, B.; VUCIC-LOVRENCIC, M.; POJE, N.; POJE, M.; BERTUZZI, F. Uric Acid may inhibit glucose-induced insulin secretion via biding to essential arginine residue in rat pancreatic β -cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1181-1184. 2005.

ROJAS A, HERNANDEZ L, PEREDA-MIRANDA R, MATA R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **The Journal of Ethnopharmacology**; v. 35, n. 3, p. 275-83, 1992.

ROULEAU, P.; VANDAL, K.; RYCKMAN, C.; POUBELLE P. E.; BOIVIN, A.; TALBOT, M. The cadium –binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentration similar to those found in human inflammatory arthritis. **Clinical Immunology**; v. 107, p. 46-54. 2003.

RUDOLPH, F. B. The biochemistry and physiology of nucleotides. **The Journal of Nutrition**; v.124, s.1, p. 124S-127S.1994.

RYCKMAN, C.; GILBERT, C.; MÉDICES, C.; LUSSIER, A.; VANDAL, K.; TESSIER, P. Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**; v. 76, p. 1-8. 2004.

SAAG, K. G.; MILKUS, T. R. Recent advances in the epidemiology of gout. **Currents Rheumatology**; v. 7, p. 235-241, 2005.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários in SIMÕES, C M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed. Ed. da UFSC. Florianópolis-SC. Ed. da-Universidade/UFRGS. Porto Alegre-RS.2000.

SCHIITZ, C.; LILOTE, F.; PRUDHOMMEAUX F.; MEUNIER, A.;CHAMPY, R.; CALLEBERT, J. Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: quantitative histomorphometric analysis of cellular events. **Arthritis & Rheumatism**; v. 46, p. 1643-50. 2002.

SEDA, H. **Reumatologia** vol. 1, 2ª ed. Ed. Cultura Medics, Rio de Janeiro. 1982.

SEEGMILLER, J. E. The acute attack of gouty arthritis. **Arthritis & Rheumatism**; v.8, n. 5, p. 714-25. 1965

SIANI, A.C. **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos – Plataforma metodológica**. Scriptorio, Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, A. F. S. **Efeito da H. pectinata na motilidade gastrintestinal**. Monografia de conclusão de graduação do curso de medicina. UFS São Cristóvão-SE. 2004.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Dept. de Fitotecnia, Ed. UFV, 2. ed., Viçosa-MG. 2000.

SILVA, R. L.; MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; MELO, V. A. Efeito do extrato aquoso da Hyptis pectinata, sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirurgica Brasileira**; v. 17, n.3, p. 101-5. 2002.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. in SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed. Ed. UFSC. Florianópolis-SC. Ed. Universidade/UFRGS. Porto Alegre-RS.2000.

SKARE, T.L.Gota in **Reumatologia Princípios e Práticas** cap. 24. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro RJ, 1999.

SKÖLD, M.; KARLBERG A.; MATURA M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology** v. 44, n. 4, p. 538-545. 2006.

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, B. C. **Química Orgânica**. 7. ed. v. 1 e 2. Rio de Janeiro: LTC editora, 2002.

SOUZA, P. C. L.; BATISTA, J. S. **Avaliação da atividade anti-ulcerogênica do óleo essencial da *Hyptis pectinata***. VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Sergipe. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre-RS. 2004.

TCHOUMBOUGNANG, F.; ZOLLO,P. H. A.; BOYOM, F. F.; NYEGUE, M. A.; BESSIÈRE, J. M.; MENUT, C. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* specimens from Cameroon: *H. pectinata* (L.) Poit., *H. lanceolata* Poit., *H. spicigera* Lam. And *H. suaveolens* Poit. **Flavour and fragrance Journal**; v. 20, p. 340-43. 2005.

TERKELTAUB, R.A. Clinical practice. Gout. **New England Journal of Medicine**; v. 349, p. 1647-1655. 2003.

TERKELTAUB, R.A.; CURTISS, L. K.; TENNER, A. J.; GINSBERG, M. H. Lipoproteins containing apoprotein B are a major regulator of neutrophil responses to monosodium urate crystals. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 1719-30. 1984.

TRAMONTINI, N.; HUBER, C.; LIU-BRYAN, R. Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis. **Arthritis & Rheumatism**; v. 50, p. 2633-39. 2004.

VASUDEVAN, A. R.; BALLANTYNE, C.M. Cardiometabolic risk assessment: an approach to the prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. **Clinical Cornerstone**; v. 7, n. 2-3, p. 7-16. 2005.

VAN DEL DOOL, H.; KRATZ, J. D. J. A generalization of the retention index system including linear temperatura programmed gas-liquid partition cromatography, **Journal of Chromatography**; v. 11: 463-467, 1963.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VIEIRA, I. G.; **Estudo de caracteristeres silviculturais e de produção de óleo essencial de progênies de *Corymbia citridora* (HOOK) K. D. HILL & L.A.S. JOHNSON procedente de Anhembi SP- Brasil, Ex. Atherton qld Australia.** Disertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba,SP. Brasil. 2004.

VIGNERON, M; DEPARIS, X; DEHARO, E.; BOURDY,G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **The Journal of ethnopharmacology**; v.98, p. 351-60. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Medicinal Plants in The South Pacific.** Western Pacific Series No 19. WHO Regional Publications. 1998.

WORTMANN, R. L. Gout and hyperuricemia. **Current Opinions in Rheumatology**; v. 14, p. 281 – 286. 2002.

WOOLF, N. The Skeletal System *in Pathology: Basic and Systemic*, cap. 44. Elsevier Health Sciences. Philadelphia, PA USA, 1998.

WU, X. W.; LEE, C. C.; MUZNY, D. M.; CASKEY C.T. Two independent mutational events in the loss of urate oxidaseduring hominoid evolution. **The Journal of Molecular Evolution**; v. 34, p. 78-84. 1992.

YAGNIK, D.R; HILLYER, P.; MARSHALL, D. Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydratade crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. **Arthritis & Rheumatism**. V. 43, p. 1779-89. 2000.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Declaração do CEPA (Conselho de Ética em Pesquisa com Animais).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Trabalho de Pesquisa intitulado "Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso e óleo essencial da *Hyptis pectinata* Poit. (sambacaitá) em modelo murino de artrite induzida por cristais de urato de sódio", de Ângelo Roberto Antonioli, por ter sido desenvolvido antes da existência do CEPA/UFS, foi avaliado *a posteriori*, em reunião realizada no dia 03/04/2006, e considerado como condizente com os princípios éticos preconizados por este comitê.

São Cristóvão, 03 de abril de 2006

Profª. Drª. Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Anexo 2 - Cálculos para obtenção para equação da reta e dose letal 50%

1- Valor probíticos provisórios:

Dose A == > $6/6 - 4/6 = 2/6 = 0,3333 < \frac{1}{2}$ Vide tabela 08 - Não existe na Tabela 03 o quantil simples.

$$9/28 = 0,3214 \quad \text{Vide } \therefore 9/28 \text{ na Tabela 03} = 0,4637$$

$$2/6 = 0,3333$$

$$10/29 = 0,3448 \quad \text{Vide } \therefore 10/29 \text{ na Tabela 03} = 0,3993$$

$$\underline{0,0644}$$

Interpolação

$$(9 + 10) / (28 + 29) = 19/57 \rightarrow (19 + 1)/57 = 20/57$$

Como $2/6$ é menor que $\frac{1}{2}$, subtrair o afastamento normal de 5. Então:

$$5 - [0,3993 + 20/57 (0,0644)] = \boxed{4,5781}$$

Dose B == > $6/6 - 2/6 = 4/6 = 0,6666 > \frac{1}{2}$ Somar o afastamento da normal a 5

$$1/1 - 4/6 = 2/6 \quad \text{Vide tabela 03} = 0,4219 \quad \text{então } 5 + 0,4219 = \boxed{5,4219}$$

Dose C == > $6/6 - 1/6 = 5/6 = 0,8333 > \frac{1}{2}$ Somar o afastamento da normal a 5

$$1/1 - 5/6 = 1/6 \quad \text{Vide tabela 03} = 0,9674 \quad \text{então } 5 + 0,9674 = \boxed{5,9674}$$

Dose D == > $6/6 - 1/6 = 5/6 = 0,8333 > \frac{1}{2}$ Somar o afastamento da normal a 5

$$1/1 - 5/6 = 1/6 \quad \text{Vide tabela 03} = 0,9674 \quad \text{então } 5 + 0,9674 = \boxed{5,9674}$$

Dose E == > Não calculado (não houve sobreviventes)

2 - Coefficiente de regressão provisório:

$$b = 3 (D - A) + (C - B) / 3^2 + 1^2$$

$$b = 3 (1,3893) + 0,5455 / 10 = 0,4713$$

$$\boxed{b \approx 0,47}$$

Probite provisório: A = 4,5781

B = 5,4219

C = 5,9674

D = 5,9674

E = -

3 – Probite esperado (y):

Menor probite esperado = $b \times n^\circ$ de intervalos entre as doses

$$0,47 \times 4 = 1,88$$

Menor probite provisório esperado =

maior probite esperado – coeficiente de regressão provisório x intervalo =
menor probite provisório esperado

$$5,9674 - (0,47 \times 4) = 5,9674 - 1,88 = 4,08 \approx 4,1$$

A	B	C	D	E	A = 4,1
4,1	4,5	4,9	5,3	5,7	B = A + 0,4 = 4,1 + 0,4 = 4,5
					C = B + 0,4 = 4,5 + 0,4 = 4,9
					D = C + 0,4 = 4,9 + 0,4 = 5,3
					E = D + 0,4 = 5,3 + 0,4 = 5,7

4 – Probite operacional (y) – trabalhar com a Tabela 09, coeficiente de ponderação e valores probíticos para ajustes finos.

Solução A	—	Probite esperado	→ 4,1
		Probite max. operacional	→ 7,1665
		Intervalo	→ $3,7582 \cdot (4/6) = 2,5055$
			$7,1665 - 2,5055 = 4,661$

Solução B	—	Probite esperado	→ 4,5
		Probite max. operacional	→ 6,4640
		Intervalo	→ $2,8404 \cdot (2/6) = 0,9468$
			$6,4640 - 0,9468 = 5,5172$

Solução C — Probite esperado → 4,9
 Probite max. operacional → 6,2599
 Intervalo → 2,5192 (1/6) = 0,4199
 $6,2599 - 0,4199 = \boxed{5,8400}$

Solução D — Probite esperado → 5,3
 Probite max. operacional → 6,3018
 Intervalo → 2,6220 . (1/6) = 0,4370
 $6,3018 - 0,4370 = \boxed{5,8648}$

Solução E — Probite esperado → 5,7
 Probite max. operacional → $\boxed{6,4749}$

5. Ponderação (ω) = coeficiente de ponderação x n , onde n = 6 número de animais testados

Solução	Probite Esperado	Coeficiente	ω	$\omega \cdot y^*$
A	4,1	$0,47144 \times 6$	2,82864	13,1842
B	4,5	$0,58099 \times 6$	3,48594	19,2326
C	4,9	$0,63431 \times 6$	3,80586	22,2262
D	5,3	$0,61609 \times 6$	3,69654	21,5217
E	5,7	$0,53159 \times 6$	3,18954	20,6519
$\Sigma =$			17,00652	96,8166

* y = Probit operacional

6.

Solução	Dose	Log x	ω	$\omega \cdot x$
A	1,0	0,0	2,82864	0,0
B	1,5	0,1761	3,48594	0,6138
C	2,0	0,3010	3,80586	1,1455
D	4,0	0,4771	3,69654	1,7636
E	5,0	0,6990	3,18954	2,2294
$\Sigma =$			17,00652	5,7523

7.

Solução	Log x	Log x ²	ωx^2	y	ωxy
A	0,0	0,0	0,0	4,661	0,0
B	0,1761	0,031	0,1080	5,5172	3,3868
C	0,3010	0,0906	0,3448	5,8400	6,6900
D	0,4771	0,2276	0,8413	5,8648	10,3432
E	0,6990	0,4886	1,5584	6,4749	14,4357
$\Sigma =$			2,8525	-	34,8557

y = probite operacional

x = log x

8. $\Sigma \omega = 17,00652$; $\Sigma \omega y = 96,8166$; $\Sigma \omega x = 5,7523$; $\Sigma \omega x^2 = 2,8525$; $\Sigma \omega xy = 34,8557$

$$x = \Sigma (\omega x) / \Sigma \omega = 5,7523 / 17,00652 = 0,3382$$

$$y = \Sigma (\omega y) / \Sigma \omega = 96,8166 / 17,00652 = 5,6929$$

$$A = \Sigma (\omega x^2) - x (\Sigma \omega x) = 2,8525 - 1,9454 = 0,9071, \text{ portanto } A = 0,9071$$

$$B = \Sigma (\omega xy) - x (\Sigma \omega y) = 34,8557 - 32,7433 = 2,1124, \text{ portanto } B = 2,1124$$

$$b = B / A = 2,3287$$
9. Equação da reta – DL₅₀

$$y = a + bx; \quad a = y - bx \therefore a = 5,6929 - 2,3287 (0,3382)$$

então, a = 4,9054

y = a + bx;

y sempre = 5, $\therefore 5 = 4,9054 + 2,3287x$; então $5 - 4,9054 = 2,3287x$,
$$x = 0,0946 / 2,3287 \therefore x = 0,0406$$

x = 0,0406 log

Antilog = 1,0979, portanto $\boxed{DL_{50} \approx 1,1 \text{ g}}$

Anexo 3 - Tabela de quantis simples

Tabela 8 - Quantis Simples da Distribuição Normal. Frações próprias, com denominadores até 30, e o afastamento normal correspondente (BLISS, 1971).

*1/30	1,8339	*1/10	1,2816	5/27	0,8958	8/29	0,5952	*11/30	0,3407	9/20	0,1257
1/29	1,8187	3/29	1,2621	3/16	0,8871	5/18	0,5895	7/19	0,3360	5/11	0,1142
1/28	1,8028	2/19	1,2521	4/21	0,8761	7/25	0,5828	10/27	0,3309	11/24	0,1046
1/27	1,7861	3/28	1,2419	5/26	0,8694	2/7	0,5661	3/8	0,3186	6/13	0,0966
1/26	1,7688	1/9	1,2206	*1/5	0,8416	7/24	0,5485	11/29	0,3073	13/28	0,0896
1/25	1,7507	3/26	1,1984	6/29	0,8172	5/17	0,5414	8/21	0,3030	*7/15	0,0836
1/24	1,7317	2/17	1,1868	5/24	0,8122	8/27	0,5351	5/13	0,2934	8/17	0,0738
1/23	1,7117	3/25	1,1750	4/19	0,8046	*3/10	0,5244	7/18	0,2822	9/19	0,0660
1/22	1,6906	1/8	1,1503	3/14	0,7916	7/23	0,5119	9/23	0,2759	10/21	0,0597
1/21	1,6684	3/23	1,1244	5/23	0,7810	4/13	0,5024	11/28	0,2719	11/23	0,0545
1/20	1,6449	*2/15	1,1108	2/9	0,7647	9/29	0,4949	*2/5	0,2533	12/25	0,0502
1/19	1,6199	3/22	1,0968	5/22	0,7479	5/16	0,4888	11/27	0,2342	13/27	0,0464
1/18	1,5932	4/29	1,0897	3/13	0,7363	6/19	0,4795	9/22	0,2299	14/29	0,0432
1/17	1,5648	1/7	1,0676	*7/30	0,7279	7/22	0,4728	7/17	0,2230	*1/2	0
1/16	1,5341	4/27	1,0444	4/17	0,7215	8/25	0,4677	12/29	0,2178		
*1/15	1,5011	3/20	1,0304	5/21	0,7124	9/28	0,4637	5/12	0,2104		
2/29	1,4835	2/13	1,0201	6/25	0,7063	*1/3	0,4307	8/19	0,1992		
1/14	1,4652	3/19	1,0031	7/29	0,7019	10/29	0,3993	11/26	0,1940		
2/27	1,4461	4/25	0,9945	1/4	0,6745	9/26	0,3957	3/7	0,1800		
1/13	1,4261	*1/6	0,9674	7/27	0,6456	8/23	0,3912	*13/30	0,1679		
2/25	1,4051	5/29	0,9447	6/23	0,6407	7/20	0,3853	10/23	0,1642		
1/12	1,3829	4/23	0,9388	5/19	0,6336	6/17	0,3774	7/16	0,1573		
2/23	1,3597	3/17	0,9289	*4/15	0,6229	5/14	0,3661	11/25	0,1510		
1/11	1,3352	5/28	0,9208	7/26	0,6151	9/25	0,3585	4/9	0,1397		
2/21	1,3092	2/11	0,9085	3/11	0,6046	4/11	0,3488	13/29	0,1300		

Muitas frações com denominadores maiores podem ser rapidamente obtidas por simples interpolação entre valores adjacentes; por exemplo, de 5/13 e 7/18 devido a $(5+7) / (13+18) = 12/31$, o afastamento normal para 12/31 é julgado como sendo $0,2822 + (13/31).(0,0112) = (0,286897)$. O valor correto é 0,286894. Cada trigésimo é marcado com um asterisco.

Para converter em valores probíticos subtraia de 5, e para frações λ maiores do que $\frac{1}{2}$, adicione a 5 o valor para $1-\lambda$.

Anexo 4 - Probitos

Tabela 9 - Probitos - Coeficientes de ponderação e valores probíticos para serem utilizados em ajustes finos (adaptado de Bliss, 1935).

Probite esperado	Probite Mínimo Operacional Y - P/Z	Intervalo 1/Z	Probite Máximo Operacional Y + Q/Z	Coeficiente de ponderação $Z^2 / P Q$	Probite Esperado	Probite Mínimo Operacional Y - P/Z	Intervalo 1/Z	Probite Máximo Operacional Y + Q/Z	Coeficiente de ponderação $Z^2 / P Q$
1,1	0,8719	5034	5035	0,00082	5,0	3,7467	2,5066	6,2533	0,63662
1,2	0,9522	3425	3426	0,00118	5,1	3,7401	2,5192	6,2593	0,63431
1,3	1,0462	2354	2355	0,00167	5,2	3,7186	2,5573	6,2759	0,62742
1,4	1,1400	1634	1635	0,00235	5,3	3,6798	2,6220	6,3018	0,61609
1,5	1,2335	1146	1147	0,00327	5,4	3,6203	2,7154	6,3357	0,60052
1,6	1,3266	811,5	812,8	0,00451	5,5	3,5360	2,8404	6,3764	0,58099
1,7	1,4194	580,5	581,9	0,00614	5,6	3,4220	3,0010	6,4230	0,55788
1,8	1,5118	419,4	420,9	0,00828	5,7	3,2724	3,2025	6,4749	0,53159
1,9	1,6038	306,1	307,7	0,01104	5,8	3,0794	3,4519	6,5313	0,50260
2,0	1,6954	225,6	227,3	0,01457	5,9	2,8335	3,7582	6,5917	0,47144
2,1	1,7866	168,00	169,79	0,01903	6,0	2,5230	4,1327	6,6557	0,43863
2,2	1,8772	126,34	128,22	0,02459	6,1	2,1324	4,5903	6,7227	0,40474
2,3	1,9673	95,96	97,93	0,03143	6,2	1,6429	5,1497	6,7926	0,37031
2,4	2,0568	73,62	75,68	0,03977	6,3	1,0295	5,8354	6,8649	0,33589
2,5	2,1457	57,05	59,20	0,04979	6,4	0,2606	6,6788	6,9394	0,30199
2,6	2,2340	44,654	46,888	0,06169	6,5	- 0,705	7,721	7,0158	0,26907
2,7	2,3214	35,302	37,623	0,07563	6,6	- 1,921	9,015	7,0940	0,23753
2,8	2,4081	28,189	30,597	0,09179	6,7	- 3,459	10,633	7,1739	0,20774
2,9	2,4938	22,736	25,230	0,11026	6,8	- 5,411	12,666	7,2551	0,17994
3,0	2,5786	18,522	21,101	0,13112	6,9	- 7,902	15,240	7,3376	0,15436
3,1	2,6624	15,240	17,902	0,15436	7,0	- 11,101	18,522	7,4214	0,13112
3,2	2,7449	12,666	15,411	0,17994	7,1	- 15,230	22,736	7,5062	0,11026
3,3	2,8261	10,633	13,459	0,20774	7,2	- 20,597	28,189	7,5919	0,09179
3,4	2,9060	9,015	11,921	0,23753	7,3	- 27,623	35,302	7,6786	0,07564
3,5	2,9842	7,721	10,705	0,26907	7,4	- 36,888	44,654	7,7661	0,06168
3,6	3,0606	6,6788	9,7394	0,30199	7,5	- 49,20	57,05	7,8543	0,04979
3,7	3,1351	5,8354	8,9705	0,33589	7,6	- 65,68	73,62	7,9432	0,03977
3,8	3,2074	5,1497	8,3571	0,37031	7,7	- 87,93	95,96	8,0327	0,03143
3,9	3,2773	4,5903	7,8676	0,40474	7,8	- 118,22	126,34	8,1228	0,02458
4,0	3,3443	4,1327	7,4770	0,43863	7,9	- 159,79	168,00	8,2134	0,01903
4,1	3,4083	3,7582	7,1665	0,47144	8,0	- 217,3	225,6	8,3046	0,01457
4,2	3,4687	3,4519	6,9206	0,50260	8,1	- 297,7	306,1	8,3962	0,01104
4,3	3,5251	3,2025	6,7276	0,53159	8,2	- 410,9	419,4	8,4882	0,00828
4,4	3,5770	3,0010	6,5780	0,55788	8,3	- 571,9	580,5	8,5806	0,00614
4,5	3,6236	2,8404	6,4640	0,58099	8,4	- 802,8	811,5	8,6734	0,00451
4,6	3,6643	2,7174	6,3797	0,60052	8,5	- 1137	1146	8,7666	0,00327
4,7	3,6982	2,6220	6,3202	0,61609	8,6	- 1625	1634	8,8600	0,00235
4,8	3,7241	2,5573	6,2814	0,62741	8,7	- 2345	2354	8,9538	0,00167
4,9	3,7407	2,5192	6,2599	0,63431	8,8	- 3416	3425	9,0478	0,00118
5,0	3,7467	2,5066	6,2533	0,63662	8,9	- 5025	5034	9,1421	0,00082

Em toxicologia, os valores probíticos utilizados são encontrados adicionando-se 5 ao afastamento normal. O coeficiente de ponderação $Z^2 / P Q$ para qualquer teste é derivado do próbite Y dado por alguma fórmula provisória. O resultado apropriado para um teste em que uma proporção p observada morre e q sobrevive é y_c , onde $q = (Y - P/Z) + p/Z = (Y + Q/Z) - q/Z = q(Y - P/Z) + p(Y + Q/Z)$.