



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica**

EDUARDO HENRIQUE DA SILVA RAMOS

Avaliação das Atividades Biológicas do Óleo Essencial do Látex de *Mangifera indica* L. (var. Espada e Rosa)

Recife, 2014

EDUARDO HENRIQUE DA SILVA RAMOS

**Avaliação das Atividades Biológicas do Óleo Essencial do Látex de *Mangifera indica*
L. (var. Espada e Rosa)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica, a mesma foi realizada sob orientação da Prof^a. Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva e co-orientação do Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara.

Recife, 2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ramos, Eduardo Henrique da Silva

Avaliação das atividades biológicas do óleo do látex da *Mangifera indica* L. (var. Espada e Rosa) / Eduardo Henrique da Silva. – Recife: O Autor, 2015.

93 f.: il.

Orientadores; Teresinha Gonçalves da Silva, Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2015.
Inclui referências

1. Química medicinal 2. Plantas medicinais 3. Medicamentos – Toxicologia I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Câmara, Cláudio Augusto Gomes da (coorient.) III. Título.

615.19

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-085



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 28 de fevereiro de 2014.

Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2014, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Departamento de Histologia e Embriologia – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

*Em especial a minha mãe, Severina Alice da Silva
(In memoriam) por seu amor incondicional e por sempre
acreditar em mim, transmitindo-me as palavras
de incentivo, que mesmo após sua morte
ressoam em meus pensamentos
e me dão a força devida para lutar
por meus ideais.*

*Ao meu pai Josué Ferreira Ramos
e minha irmã Maria Larissa da Silva Ramos,
que sempre estiveram ao meu
lado nesta jornada, me
transmitindo segurança.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça me permitiu chegar até aqui, suprimindo minhas necessidades e me fortalecendo para conseguir vencer todas as barreiras que surgirem nesta longa caminhada, ao qual chamamos de vida.

À Universidade Federal de Pernambuco por ter me proporcionado uma formação de pós-graduação, abrindo novos horizontes numa longa caminhada que se inicia.

A minha orientadora professora Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva por sua grande paciência, dedicação, apoio e por acreditar na minha capacidade no desenvolver deste trabalho.

Ao meu co-orientador professor Dr. Cláudio Augusto Gomes da Camara pelo seu auxílio no que lhe era possível. Ambos foram alavancas indispensáveis nas horas mais difíceis para a realização dessa tese.

A minha ex-orientanda e agora mestranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Laís Ludmila de Albuquerque Nerys, pelo seu apoio desde o início de minha pesquisa até a sua conclusão.

A todos os que compõem o Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos- LBPF do Departamento de Antibióticos - Centro de Ciências Biológicas – UFPE. A Dr^a Jaciana dos Santos Aguiar, doutorandos Aline Stamford H. da S. G. G. Carrazoni, André Luiz de S. Barros, Tatiane Bezerra Oliveira, Larissa Cardoso C. de Araujo, Sandrine Maria de A. Lima, Jeyce Kelly F. de Andrade, Maria do Desterro Rodrigues, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos, Tonny Cley Campos Leite, Fernanda Virginia B. Mota, Temístocles Italo Santana, mestrandos Sandra Cabral da Silva, Anne Cecília N. da Cruz e os alunos de iniciação científica, Bruno Iraquitan Miranda da Silva, Jackellyne Araújo de Carvalho, Laís Emanuelle Bernardo Vieira, Letícia Leite Ferreira, Alane Dornelas de Castro, Viviane Maria Silveira da Silva, Alexandre de Melo Moura e a técnica de laboratório Maria Suzete Mendonça.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos – LPNB da Área de Química Orgânica – Departamento de Química – UFRPE, em especial a Roberta pela sua valiosa colaboração na extração dos óleos essenciais.

A professora Dr^a Helena Simões Duarte do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE por seu apoio incondicional para meu ingresso no campo científico, sempre me incentivando na realização da pós-graduação.

Enfim, agradeço a todos que direto ou indiretamente me ajudaram e apoiaram, tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Mangifera indica popularmente conhecida como mangueira é uma planta amplamente empregada na medicina popular como laxativa, antigripal, utilizada no combate à tosse, ao escorbuto, à anemia e diurética etc. Na literatura são descritas as atividades imunoestimulante, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, citotóxica, antimutagênica, antiadipogênica, antidiarréica, hipolipidêmica, hipoglicemiante e antineoplásica. Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico. Portanto, este trabalho teve como objetivos a extração, caracterização química, avaliação da toxicidade aguda e das atividades biológicas do óleo essencial do látex de *M. indica* var. Rosa (OEMiR) e Espada (OEMiE). A toxicidade aguda foi realizada segundo as normas da ANVISA. A avaliação do efeito citotóxico dos óleos essenciais em células tumorais (HEp-2, HT-29, NCI-H292 e HL-60) foi realizado através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A ação leishmanicida foi determinada através da análise da ação de OEMiR e OEMiE sobre formas promastigotas. Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados os testes do bolsão de ar, peritonite, edema de pata induzidos por carragenina e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. A quantificação de citocinas e NO foi feita no exsudato inflamatório do teste do bolsão de ar. Para avaliação do efeito antinociceptivo foram realizados os ensaios da nocicepção induzida por ácido acético, formalina e placa quente. No teste da toxicidade aguda os óleos essenciais apresentaram baixa toxicidade oral aguda, com $DL_{50} > 5.000$ mg/kg. No teste de citotoxicidade, os óleos testados foram citotóxicos para todas as linhagens testadas, com valores de IC_{50} entre 3,6-38,9 μ g/mL. No teste do bolsão de ar os melhores resultados foram obtidos nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg para ambos os óleos essenciais em relação ao grupo controle. Na peritonite, OEMiR e OEMiE (25 mg/kg) inibiram a migração leucocitária em 86% e 85%, respectivamente. Os óleos testados diminuíram a permeabilidade vascular induzida por ácido acético, quando comparado ao grupo controle. Na nocicepção induzida por ácido acético, os óleos apresentaram diminuição no número de contorções abdominais em relação ao grupo controle, onde OEMiR inibiu a nocicepção em torno de 58% e OEMiE em torno de 59%. No teste da formalina, os óleos testados apresentaram efeitos em ambas as fases, sendo mais ativo na segunda. No teste da placa quente os óleos apresentaram inibição da nocicepção. Nossos resultados mostraram que OEMiR e OEMiE apresentaram baixa toxicidade aguda oral, mas foram citotóxicos para células tumorais. Os óleos essenciais apresentaram ação leishmanicida, com boa seletividade. Os óleos também demonstraram atividade anti-inflamatória relacionada à inibição da migração celular, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e NO. O efeito antinociceptivo parece estar relacionado a ambos, efeitos centrais e periféricos.

Palavras-chaves: Látex. Atividade Anti-inflamatória. Atividade Antinociceptiva. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Mangifera indica L. popularly known as mango is a plant widely used in folk medicine with laxative, influenza, used to combat cough, scurvy, anaemia and diuretic. In scientific literature are described immunostimulatory, antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, cytotoxic, antimutagenic, antiadipogenic, antidiarrheal, hypolipidemic, hypoglycemic and anticancer activities. Among the natural products used in therapeutic approaches, essential oils are described as products with high therapeutic and pharmacological potential. Therefore, this study aimed extraction, chemical characterization, assessment of acute toxicity and biological activity of the essential oil of latex *M. indica* var. Rosa (EOMiR) and Espada (EOMiE). The acute toxicity was performed ANVISA standards. This evaluation cytotoxic the effect of essential oils in tumor cells (Hep-2, HT-29, NCI-H292 e HL-60) was performed by testing MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium). Leishmanicidal activity was determined by analysis of the action of EOMiR and EOMiE on promastigotes. To evaluate the anti-inflammatory activity were performed by test subcutaneous pocket of air, peritonitis, edema paw induced by carrageenan and vascular permeability induced by acetic acid. Quantification of cytokines and NO in the inflammatory exudate was taken from the test air pocket. Order to evaluate the antinociceptive effect were performed tests induced by acetic acid, formalin and hot-plate nociception. In Toxicity acute test of essential oils showed low acute oral toxicity, with an $LD_{50} > 5000$ mg / kg. In the cytotoxicity test, the oils tested were cytotoxic to all the strains tested, with IC_{50} values ranging from 3.6 to 38.9 mg / mL. On test air pocket the best results were obtained at doses of 12.5, 25 and 50 for both essential oils relative for the control group. The essential oils of *M. indica* var. Rosa and Espada decreased the concentration of TNF - α , IL - 1 β , IL - 6 and NO. Peritonitis in the EOMiR and EOMiE (25mg/kg) inhibited leukocyte migration in 86% and 85%, respectively. Tested oils decreased vascular permeability induced by acetic acid, compared to the control group. In acetic acid-induced nociception, the oils showed a decrease in the number of writhing relative the control group, where EOMiR inhibited the nociception around 58 % and EOMiE in 59%. In the formalin test, the oils tested had effects in both phases being the second most active. At the hot plate test oils showed a reduction of nociception. Our results showed that EOMiR and EOMiE showed low acute oral toxicity, but were cytotoxic to tumor cells. The essential oils showed leishmanicidal action, with good selectivity. The oils also have anti-inflammatory related to the inhibition of cellular reduction of pro-inflammatory cytokines and NO migration. The analgesic effect seems to be related to both central and peripheral effects.

Keywords: Latex. Anti-inflammatory Activity. Antinociceptive Activity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Mangifera indica</i> L.	25
Figura 2: Folhas, fruto e flor de <i>Mangifera indica</i> L.	25
Figura 3: <i>Mangifera indica</i> (látex)	26
Figura 4: <i>Mangifera indica</i> (látex fracionado)	26
Figura 5: Molécula de Isopreno	27
Figura 6: Representação esquemática da ultraestrutura das formas amastigota (A) e promastigota (B) de <i>Leishmania</i> sp.	30
Figura 7: Mecanismo específico da dor nociceptiva (A) e dor inflamatória (B)	36
Figura 8: Efeito dos óleos essenciais sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata	61
Figura 9: Efeito dos óleos essenciais do látex de <i>M. indica</i> sobre os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na inflamação induzida por carragenina (média $\pm$ DP).	67
Figura 10: Efeito dos óleos essenciais OEMiR e OEMiE sobre a produção de óxido nítrico na inflamação induzida por carragenina no teste da bolsa de ar (média $\pm$ DP).	69
Figura 11: Efeito dos óleos essenciais OEMiR e OEMiE (25 mg/kg, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.	71
Figura 12: Efeito dos óleos essenciais sobre a produção de MPO no tecido plantar do edema de pata (média $\pm$ DP).	73
Figura 13: Efeito dos óleos essenciais OEMiR and OEMiE no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético (média $\pm$ DP).	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Composição química dos óleos essenciais do látex de duas variedades de *Mangifera indica* 53
- Tabela 2:** Atividade citotóxica do óleo essencial do látex de *M. indica* var. Rosa e *M. indica* var. Espada sobre células tumorais humanas. 56
- Tabela 3:** Efeito leishmanicida e citotóxico dos óleos essenciais de *M. indica* sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* 61
- Tabela 4:** Evolução ponderal, consumo de ração e água dos animais tratados com os óleos essenciais das duas variedades de *Mangifera indica* (Rosa e Espada) em relação ao grupo controle 64
- Tabela 5:** Efeitos dos óleos essenciais do látex de *M. indica* sobre a migração celular na inflamação induzida pela carragenina no modelo do bolsão de ar (média $\pm$ DP). 65
- Tabela 6:** Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ DP) e percentual de inibição da migração celular dos grupos controle e tratados com os óleos essenciais no teste de peritonite induzida por carragenina. 70
- Tabela 7:** Efeitos dos óleos essenciais sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. 74
- Tabela 8:** Efeito dos óleos essenciais do látex de *M. indica* var. Espada e Rosa no teste da formalina em camundongos. 76
- Tabela 9:** Tempo de latência ao estímulo térmico no teste da placa quente após tratamento oral com os óleos essenciais (média $\pm$ desvio padrão). 78

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection* (Coleção America de Tipos de Culturas)

ATP – Adenosina Trifosfato

CC₅₀- Concentração Citotóxica em 50%

CG – Cromatografia Gasosa

DL₅₀- Dose Letal

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio Imunoabsorvente de Ligação Enzimática)

EM – Espctometria de Massa

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Persquisa Agropecuária

FID – *Flame Ionization Detector* (detector de ionização de chama)

Hep 2 – Carcinoma de laringe humana

HL-60 – Leucemia promielocítica humana

HT-29 – Adenocarcinoma de cólon humano

HTAB - Hexadeciltrimetil Brometo de Amônia

IASP - *International Association for the Study of Pain* (Associação International para Estudo da Dor)

IC₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPP – Isopentenil-pirofosfato

IR – Índice de Retenção

IS – Índice de Seletividade

ISO – *International Standard Organization* (Organização Internacional para Padronização)

MEP – Metileritritol Fosfato

MPO - Mieloperoxidase

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium)

NCI-H292 – Carcinoma pulmonar mucoepidermoide humano

NGF - Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Nervoso)

NCI - *National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer)

NO – Óxido Nítrico

OE – Óleos Essenciais

OEMiE – Óleo Essencial *Mangifera indica* var. Espada

OEMiR - Óleo Essencial *Mangifera indica* var. Rosa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF - Platelet-Activating Factor (Fator de Ativação Plaquetária)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)

PG - Prostaglandinas

PGI - Prostaciclina

PPO - Laccase/polifenol oxidase

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF- Fator de Necrose Tumoral

v.o. Via Oral

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Plantas Medicinais	22
3.2 Família Anacardiaceae	23
3.2.1 <i>Mangifera indica</i>	24
3.3 Óleos Essencias	26
3.4 Câncer	
27 3.4.1 Modelos experimentais no estudo do câncer	28
3.5 Leishmaniose	29
3.5.1 Vetores	30
3.5.2 Quimioterapia	31
3.6 Processo Inflamatório	32
3.7. Dor: Conceito e classificação	34
3.7.1 Mediadores químicos da dor	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Reagentes	39
4.2 Equipamentos	39
4.3 Animais	39
4.4 Material Botânico	40
4.4.1 Coleta do Látex	40
4.5 Local dos Experimentos	40
4.6 Obtenção dos Óleos Essenciais	41
4.7 Caracterização Química dos Óleos Essenciais	41
4.7.1 Cromatografia Gasosa	41
4.7.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas	42
4.7.3 Identificação dos Componentes	42
4.8 Atividades Biológicas	42
4.8.1 Toxicidade Aguda	42
4.8.2 Atividade Citotóxica	43
4.8.2.1 Cultura de Células	43
4.8.2.2 Citotoxicidade	44
4.8.3 Atividade Leishmanicida	44
4.8.3.1 Cultivo dos Parasitas	44
4.8.3.2 Atividade dos Óleos Essenciais sobre Formas Promastigota	45
4.8.3.3 Avaliação da Citotoxicidade dos Óleos Essenciais sobre Células de Mamíferos	45
4.8.4 Atividade Anti-inflamatória	46
4.8.4.1 Teste do Bolsão de Ar Subcutâneo	46
4.8.4.1.1 Quantificação dos Níveis de Citocinas	46
4.8.4.1.2 Quantificação dos Níveis de Oxído Nítrico	47
4.8.4.2 Peritonite Induzida por Carragenina	47
4.8.4.3 Edema de Pata Induzida por Carragenina	47
4.8.4.3.1 Atividade da Mieloperoxidase	48
4.8.4.4 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético	48

4.8.5 Atividade Antinociceptiva	49
4.8.5.1 Nocicepção Induzida por Ácido Acético	49
4.8.5.2 Teste da Formalina	50
4.8.5.3 Teste da Placa Quente	50
4.9 Análise Estatística	51
4.9.1 Atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antitumoral	51
4.9.2 Atividades antileishmanicida	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Composição Química dos Óleos Essenciais	53
5.2 Citotoxicidade dos Óleos Essenciais	56
5.3 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais sobre formas promastigotas	60
5.4 Toxicidade Aguda	62
5.5 Atividade Anti-inflamatória	64
5.5.1 Teste do Bolsão de Ar Subcutâneo	64
5.5.1.1 Determinação dos Níveis de Citocinas	66
5.5.1.2 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico	69
5.5.2 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina	70
5.5.3 Edema da Pata Induzido por Carragenina	71
5.5.3.1 Atividade da Mieloperoxidase	72
5.5.4 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético	73
5.6 Atividade Antinociceptiva	74
5.6.1 Teste das Contorções Induzidas por Ácido Acético	74
5.6.2 Teste da Formalina	76
5.6.3 Teste da Placa Quente	77
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e vêm sendo utilizados em muitas partes do mundo ao longo de décadas, despertando o interesse de vários pesquisadores (ARAÚJO; ONOFRE, 2011). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005).

No cenário mundial apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (FOGLIO et al., 2006). No Brasil, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas e/ou tóxicas (VARANDA, 2006). A utilização de plantas medicinais está em contínua expansão no âmbito mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitofármacos como importantes alternativas terapêuticas (GUARRERA, 2005).

Na pesquisa de novos medicamentos e substâncias bioativas, maior ênfase foi dada nos últimos anos para o estudo dos óleos essenciais produzidos pelas plantas, assim como de seus constituintes (SANTOS, 2012). Os óleos essenciais, frequentemente utilizados na aromoterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus

componentes possibilita que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais podemos citar a atividades antioxidante (WANNES et al., 2010), analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO et al., 2008), antitumoral (SILVA et al., 2008), antimicrobianas, antivirais, antidepressivas, relaxantes, sedativas, digestivas, diuréticas, hormonais, inseticidas, repelentes de insetos, mucolíticas, expectorantes, desodorantes, antimalárica, anticarcinogênica, anticonvulsivante, gastroprotetora (STEFLITSCH; STEFLITSCH, 2008) e anticolinesterásica (ALBUQUERQUE et al., 2010).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). Portanto, a flora brasileira é promissora fonte de inovações terapêuticas para as mais diversas áreas da saúde humana.

Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma grande lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas desenvolvidas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (FOGLIO et al., 2006).

Dentre as plantas medicinais brasileiras destacamos *Mangifera indica* L. (manga), natural da Ásia tropical, muito popular na Índia (CRAVO, 1995). Conhecida há pelo menos 4.000 anos, e no Brasil há cerca de 300 anos, tendo-se difundido sua cultura em todas as regiões tropicais e subtropicais (MARANCA, 1976).

São vários os estudos científicos sobre os atributos farmacológicos dos extratos de *Mangifera indica* L. Na literatura, vários dos trabalhos descrevem atividades farmacológicas deste espécie, como: imunoestimulante e antiviral (SÁNCHEZ et al., 2000), antimicrobiana (GARRIDO et al., 2001), anti-inflamatória (MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001), analgésica (SELLÉS et al., 2002), antioxidante (SAIRAM et al., 2003), citotóxica (BELTRÁN et al., 2004), antimutagênica (OJEWOLE, 2005), antiadipogênica (PARDO-ANDREU et al., 2008), antidiarréica (GARRIDO-SUÁREZ, 2010), hipolipidêmica (MORFFI et al., 2012), hipoglicemiante (RAJAN; THIRUNALASUNDARI; JEEVA, 2012) e antineoplásica (TAING et al., 2012).

Desta forma, ratifica-se a importância e necessidade dos estudos com produtos naturais, e vislumbrando o potencial farmacológico da família Anacardiaceae e reconhecendo a importância do gênero *Mangifera*, optamos por enveredar os estudos da espécie *Mangifera indica* L., mais especificamente do óleo essencial do látex desta planta, cujos estudos farmacológicos ainda são escassos, o que poderá conduzir para a descoberta de novas fontes de substâncias naturais bioativas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obtenção, caracterização química e avaliação da atividade biológica do óleo essencial do látex de *Mangifera indica* var. Espada e Rosa.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter óleo essencial a partir do látex de duas variedades de *M. indica*;
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais do látex através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa;
- Verificar a toxicidade aguda dos óleos essenciais;
- Avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais em linhagens de células tumorais;
- Avaliar a atividade leishmanicida dos óleos essenciais;
- Investigar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo dos óleos essenciais de *M. indica*;

===== 3. *REVISÃO DE LITERATURA* =====

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

A necessidade de solucionar problemas continua sendo a grande alavanca que impulsiona a humanidade. A dor fez com que o homem buscasse o analgésico; a doença, o remédio. Portanto, é fácil inferir que o uso de partes de plantas e animais no combate às doenças seja tão antigo quanto à própria humanidade (OLIVEIRA; AKISUE, 1997).

Apesar de ser um hábito antigo, somente a partir do século XX é que se verificaram estudos sistemáticos sobre a ação dos extratos de vegetais, visando-se avaliar e elucidar as atividades terapêuticas dos mesmos, bem como os mecanismos de ação farmacológicos associados (COSTA, 1977).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990, divulgou que entre 65 - 80% da população de países em desenvolvimento não tem acesso a qualquer atendimento primário a saúde, seja pela distância dos centros de saúde ou por falta de recursos financeiros, tendo as plantas medicinais como única fonte de cuidados básicos a saúde (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

No Brasil existe uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) que tem como objetivo subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, inclusive nas ações que também serão desenvolvidas pelos outros Ministérios participantes do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Essa lista contém 71 espécies, e esta deverá ser atualizada periodicamente (RENISUS, 2013).

Sabe-se ainda que o Sistema Público de Saúde no Brasil, sobretudo o do Nordeste brasileiro, não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população. Desta forma, alguns estados e municípios brasileiros vêm implementando Programas de Fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades. Portanto é relevante a caracterização e avaliação

de segurança e eficácia de plantas medicinais por grupos de pesquisas, já que esses estudos preliminares podem embasar a produção de um fitoterápico (SILVA et al., 2006).

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou o formulário nacional de fitoterápicos com o objetivo de padronizar a fabricação de medicamentos fitoterápicos. No formulário estão registradas as informações sobre a forma correta de preparo e as indicações e restrições de uso de cada espécie. Os requisitos de qualidade estão definidos de forma específica para a farmácia de manipulação e farmácias vivas (BRASIL, 2011).

Além de provas de eficácia, um fitoterápico tem que possuir estudos toxicológicos pré-clínicos que comprovem segurança sobre as doses nas quais aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório. Sempre que se inicia um estudo com plantas medicinais ou produtos fitoterápicos (na forma de chá, decocto, infusão ou extrato e / ou frações semipurificadas), um estudo de DL₅₀ deve ser realizada (STASI, 1996).

O uso de plantas medicinais, quando feito com critério, só tem a contribuir para a saúde de quem o pratica. Tais critérios referem-se à identificação do quadro clínico apresentado (sinal ou sintoma), escolha correta da planta a ser utilizada e adequada preparação (MARTINS, 1989).

3.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é de ocorrência pantropical, incluindo poucos representantes em regiões temperadas. Compreende aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies, muitas das quais de importância alimentar, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), seriguela (*Spondias mombin* L.) e pistache (*Pistacia vera* L.) (LORENZI; MATOS, 2002).

A família Anacardiaceae é amplamente representada no Brasil por várias espécies de importância econômica produtoras de frutos e óleos essenciais. Vários estudos fitoquímicos, bem como atividade antimicrobiana e fitotóxica também já foram relatadas. Porém, menos de 7% das espécies conhecidas desta família possuem estudos fitoquímicos e de atividades biológicas (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). No Brasil ocorrem 15 gêneros e cerca de 70 espécies,

diversas apresentando frutos e pseudofrutos comestíveis. Essa família tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais, voláteis, plantas ornamentais e alimentícias. Muitas espécies são utilizadas como condimentos importantes na culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que conferem aos alimentos (SOUZA; LORENZI, 2005).

3.2.1 *Mangifera indica* L.

O gênero *Mangifera* tem origem na Ásia tropical, com maior número de espécies encontradas em Bornéu, Java, Sumatra e na Península Malaia (BALLY, 2006). São conhecidas 58 espécies do gênero *Mangifera* distribuídas em dois subgêneros (EIADTHONG et al., 1999).

Mangifera indica popularmente conhecida como mangueira é uma planta amplamente empregada na medicina popular, sendo considerada laxativa, antigripal, utilizada no combate à tosse, ao escorbuto, à anemia, diurética etc. (CRAVO, 1995). As folhas, frutos e outras partes da planta são usados em muitos países para fins medicinais. Segundo alguns autores, o xarope das folhas e da polpa da fruta é recomendado contra tosse e bronquite pelo conteúdo em terebintina, que é um bom expectorante; a casca da árvore cozida é eficiente no combate às cólicas em geral, e a casca e as folhas são também empregadas no combate às diarreias, a asma e em algumas infecções gonocócicas (MARANCA, 1976).

Mangifera indica L. (Figura 1) é originária da Ásia Meridional e Arquipélago Indiano. O Brasil foi o primeiro da América a cultivar *M. indica* que foi trazida pelos portugueses no século XVI e plantada no Rio de Janeiro, de onde se difundiu para todo o país, chegando em 1.700 em Itamaracá na Bahia, às Antilhas em 1742 e depois ao México (SIMÃO, 1971).



Fonte: Ramos, 2014

A mangueira é uma árvore de elevado porte, às vezes com mais de 20 m de altura e até 2,5 m de diâmetro de tronco, esgalhada, formando densa e frondosa copa, cuja sombra não cresce planta alguma. Apresentam folhas alternas, pecioladas. As flores são pequenas, verdes, numerosas. O fruto é tipo drupa, casca verde, verde com pintas pretas, amarelado (Figura 2). Polpa de coloração que varia do amarelo ao amarelo alaranjado. A semente (caroço) é chata (CASTRO NETO, 1995).

Figura 2 – Folhas, fruto e flor de *M. indica* L.

Fonte: Arquivo pessoal, RAMOS, E.H.S.

O látex da manga (Figura 3 e 4) é um líquido transparente que escorre instantaneamente da fruta não madura, assim que é destacada do caule. Sabe-se há muito tempo sobre a capacidade do látex de produzir dermatite em contato com a pele, durante a colheita do fruto em amadurecimento (KEIL; WASSERMAN; DAWSON, 1946).

Figura 3 - *Mangifera indica* L. (látex)

Fonte: Arquivo pessoal, RAMOS, E.H.S.

Figura 4 - *Mangifera indica* L. (látex fracionado)

Fonte: Arquivo pessoal, RAMOS, E.H.S.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

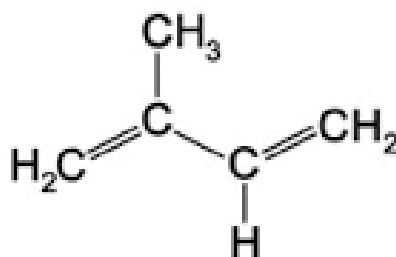
Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenos, alcalóides entre outros. Estes compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (Di STASI, 1996).

Dentre os principais compostos secundários estão os óleos essenciais, os quais são misturas complexas de compostos voláteis com odor forte que são sintetizados em diversos órgãos, incluindo brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes ou casca, e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Apesar de todos os órgãos de uma planta poder acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização (MIGUEL, 2010, TEIXEIRA, et al, 2013).

Os óleos essenciais são quimicamente compostos de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações. Dentre estes, o grupo mais representativo são os terpenóides (TAIZ; ZEIGER, 2004), os quais são

compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Os terpenos são formados pela fusão de unidades isoprênicas (Figura 5) de cinco carbonos. Quando submetidos a altas temperaturas podem se decompor em isoprenos, podendo referir-se, ocasionalmente, a todos os terpenos como isoprenóides (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 5. Molécula de isopreno



Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas aos OE podemos citar ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010) atividade antitumoral e leishmanicida (SILVA et al., 2008).

3.4 CÂNCER

O termo câncer é a tradução latina do grego carcinoma (de *karkinos* = crustáceo, carangueijo). Essa terminologia foi utilizada pela primeira vez por Galeno a fim de descrever um tumor maligno na mama, com veias superficiais túrgidas e ramificadas, assemelhando-se às patas de um carangueijo (FLECK 1992). Atualmente, esse termo é utilizado como sinonímia de neoplasia maligna.

O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração nos sistemas de regulação da proliferação e de diferenciação celulares. A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose

e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

A carcinogênese pode iniciar de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Como o câncer se desenvolve a partir de mudanças dinâmicas que ocorrem no genoma de uma célula, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica. No entanto, alterações epigenéticas também desempenham papel crítico neste processo (BAYLIN; OHM, 2006). A epigenética estuda mecanismos reguladores da atividade e herança gênica que independem de modificações na sequência de nucleotídeos do DNA. Os principais eventos epigenéticos descritos correspondem a modificações que ocorrem no próprio DNA e a alterações que se processam na compactação deste polímero e modificações pós traducionais em histonas (ROTHHAMMER; BOSSERHOFF, 2007).

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos. Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior tornando-se em um evidente problema de saúde pública mundial (OMS, 2013a).

No Brasil, as estimativas do ano de 2013, válidas também para o ano de 2014, apontam a ocorrência de aproximadamente 620.500 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2013).

3.4.1 Modelos experimentais no estudo do câncer

O tratamento do câncer vem sendo suportado por terapias convencionais, as quais causam sérios efeitos colaterais, podendo ainda desencadear processos de resistência ao agente usado no tratamento, e no melhor dos casos, conseguem estender a vida do paciente por alguns anos, não aliando a isto uma melhora na sua qualidade de vida. Há assim, uma clara necessidade de utilizar

conceitos e/ou terapias alternativas na prevenção e tratamento do câncer (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

Neste cenário, o sucesso do desenvolvimento de novos medicamentos depende fundamentalmente de um esforço multidisciplinar na descoberta de novas moléculas naturais e da otimização molecular através da aplicação de técnicas de síntese, química combinatória e bioquímica, aliadas a estudos biológicos de alta qualidade (CRAGG, 2005).

Para a descoberta de novos agentes antitumorais, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Os testes de citotoxicidade (*in vitro*), os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células tumorais em cultura, são os mais amplamente utilizados (HOLBECK, 2004). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, é uma técnica relativamente simples, reprodutível e auxilia na elucidação de um provável mecanismo de ação da substância (SUGGIT et al., 2005).

Para os testes antitumorais *in vitro*, geralmente são utilizadas várias linhagens celulares tumorais com o intuito de se obter uma visão ampliada dos efeitos do produto em estudo. Essas linhagens devem ser de cânceres originados de diferentes tecidos com diferentes origens embrionárias e com características morfológicas e fisiológicas distintas (CRAGG, 2005).

3.5 LEISHMANIOSE

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas tropicais, causadas por protozoários tripanosomatídeos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Presente em 88 países, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões sob o risco de infecção (OMS, 2010) estas doenças ainda estão entre as mais negligenciadas do mundo e são consideradas um grande desafio à saúde pública. Estima-se que ocorram cerca 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes anualmente (OMS, 2013b).

No Brasil, essa patologia está presente em todos os estados brasileiros, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. No período de 1988 a 2009, a leishmaniose tegumentar

americana apresentou média anual de 27.093 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 16 casos por 100 mil habitantes. A leishmaniose visceral, por sua vez, apresentou no mesmo período, uma média de 3.349 casos por ano e a incidência de 1,97 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2013).

3.5.1 Agente Etiológico e Vetores

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas obrigatórios e caracterizam-se por apresentar apenas duas formas de vida durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e a forma promastigota (Figura 6), associadas a dois tipos de hospedeiro. No hospedeiro vertebrado encontra-se a forma amastigota, parasita intracelular obrigatório de macrófagos. Um inseto hematófago da família Psychodidae ao picar o indivíduo ou animal parasitado, o hospedeiro invertebrado, suga junto com o sangue ou com a linfa macrófagos periféricos infectados com formas amastigotas de *Leishmania*. Uma vez no tubo digestivo do mosquito, essas formas são liberadas e se diferenciam em promastigotas (REY, 2010).

Figura 6 – Representação esquemática da ultra-estrutura das formas amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania*. N: núcleo. RE: retículo endoplasmático. M: mitocôndria. G: complexo de Golgi. K: kinetoplasto. F: flagelo.

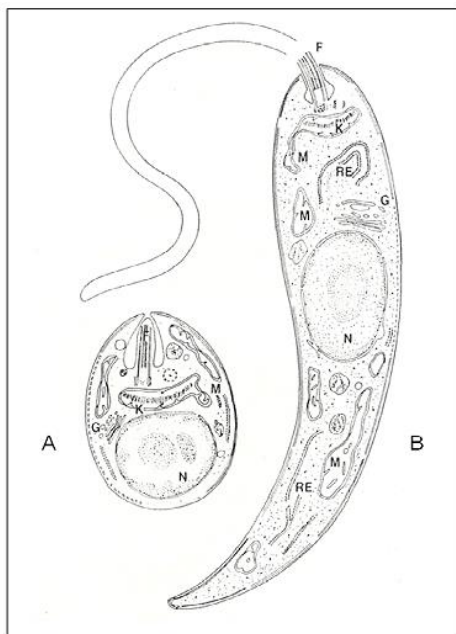


Figura modificada de (REY, 2010)

Os insetos vetores das leishmanioses são pequenos dípteros de 2 a 3 mm de comprimento, pertencente a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Somente 30 das 500 espécies conhecidas dessa subfamília foram identificadas como vetores da doença, sendo que dois gêneros são realmente importantes vetores, *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (REY, 2010).

É importante ressaltar que o homem está inserido no ciclo de vida da *Leishmania* como um hospedeiro acidental, os hospedeiros vertebrados naturais desse protozoário são cães, gatos e alguns animais silvestres (roedores, preguiças, tamanduás, marsupiais, raposas, etc), que são considerados reservatórios desses organismos; por isso as leishmanioses são consideradas zoonoses, adquiridas eventualmente quando o homem penetra no ecossistema onde esses organismos circulam (REY, 2010).

3.5.2 Quimioterapia

As drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de Sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Estes medicamentos foram introduzidos na década de 40 e desde então, têm sido considerados como drogas de primeira escolha no tratamento dessas protozooses. Os antimoniais pentavalentes interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP e GTP (BRASIL, 2010).

No Brasil o medicamento antimonial de escolha é o Glucantime® que, se administrado de forma contínua e posologicamente adequada, é eficaz para o tratamento das formas visceral, cutânea e mucocutânea da leishmaniose. Por sua vez, baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes do parasita (RATH et al., 2003). As dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses se devem ao fato dos parasitas do gênero *Leishmania* serem também eucariotos compartilhando muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes leishmanicidas ocorre em vias ou alvos comuns

ao parasita e ao hospedeiro (NAKAMURA et al, 2006). Neste contexto, a descoberta de novos compostos com maior seletividade contra estes parasitas ainda se faz necessária.

3.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os estudos sobre o processo inflamatório se iniciam com Cornelius Celsus no séc I d.C., a partir da descrição dos quatro sinais cardinais da inflamação: calor e rubor, devido ao aumento do fluxo sanguíneo capilar e da permeabilidade vascular; edema que ocorre pela infiltração de células em tecido; e dor ocasionada pela liberação de substâncias álgicas no local da inflamação (LARSEN; HOLT, 2000). Posteriormente um quinto sinal clínico foi acrescentado por Virchow: a perda da função da área lesionada (ROCHA et al., 2007).

A resposta inflamatória representa um dos mecanismos de defesa do nosso organismo, e consiste de uma longa cadeia de reações e atividades celulares com o intuito de reparar o tecido em que ocorre uma lesão ou destruição celular, ocorrendo atividades celulares, vasodilatação de arteríolas e vênulas, assim como aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, como consequência, o acúmulo de líquidos. Esta inflamação, geralmente aguda, é a resposta inicial ao agressor e pode tornar-se desconfortável para o paciente devido ao edema formado e a dor (CARVALHO, 2004).

A inflamação pode ocorrer em três fases distintas e cada uma mediada por diferentes mecanismos: uma aguda que tem como característica principal a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular; uma fase sub-aguda que consiste na infiltração de leucócitos e fagócitos; e por fim, a fase crônica caracterizada pela degeneração dos tecidos e na presença de fibroses (ROTELLI et al., 2003). A inflamação aguda é a primeira resposta a uma lesão celular ou tecidual, na qual contempla uma série de alterações sequenciais. Ela é mediada através de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos (LIEBERMAN, 2009).

Os mediadores pró-inflamatórios são tanto de origem tissular, por exemplo, os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, aminas vasoativas

(histamina e serotonina), bradicinina, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF e IFN- α), óxido nítrico; como de origem plasmática, os componentes do sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (CARVALHO, 2004; FEGHALI; WRIGHT, 1997).

Um grupo de mediadores inflamatórios importantes são os derivados do ácido araquidônico. Esse ácido possui duas vias enzimáticas que levam à produção de mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta à inflamação. A via iniciada pela cicloxigenase (COX) produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, enquanto que a via das lipoxigenases (LOX) leva à produção de leucotrienos e lipoxinas (SERHAN; CHIANG, 2004; SANJITA; DINAKAR; SAUMYA, 2008).

A COX é a enzima chave que está envolvida na biossíntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que por sua vez, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, além dos processos patológicos, como a inflamação (LEVAL et al., 2000). As isoformas da COX são classificadas como COX-1 (constitutiva), COX-2 (indutiva), além de existir a COX-3, que é uma variante da COX-1. Estas enzimas são inibidas por substâncias anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) (ZHANG; CAO; ZHONG, 2009).

A COX-1 é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos e fornece prostaglandinas para manter as funções fisiológicas como a citoproteção do estômago e na regulação do fluxo sanguíneo renal (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Em contraste, a COX-2 é induzida em células do sistema imunológico, tais como macrófagos, em resposta à lesão, infecção ou outros tipos de estresse produzindo prostaglandinas que atuam para sensibilizar os nociceptores e induzir inflamação (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas responsáveis pela produção de leucotrienos (LTs). Entre as lipoxigenases existentes nos tecidos dos mamíferos, a 5-LOX é encontrada principalmente em células de origem mielóides, como por exemplo, leucócitos polimorfonucleares (PMNL), mastócitos, macrófagos e basófilos (GOMES et al., 2009).

Os leucotrienos são importantes mediadores químicos em uma variedade de condições inflamatórias e alérgicas. Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de uma grande variedade de efeitos, incluindo principalmente a contratilidade da musculatura lisa (LTC₄, LTD₄, LTE₄); agregação plaquetária, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos (LTB₄); aumento na permeabilidade vascular (LTC₄, LTD₄, LTE₄); atividade sobre linfócitos e hiperalgesia (LTB₄) (HAEGGSTRÖM, 2000).

Fármacos com ação anti-inflamatória estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (PARENTE, 2000; FIORUCCI et al., 2001). Eles podem acarretar efeitos adversos, resultantes da inibição da atividade da prostaglandina E₂ sintetase, incluindo perfuração e hemorragia do trato gastrointestinal, alterações renais e nos mecanismos de hemostase (SCHOLICH; GEISLINGER, 2006). Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias derivadas de produtos naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos.

3.7 DOR: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

A dor é um dos sinais carinais da inflamação e segundo a IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor, ela pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial. Além de envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva, incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

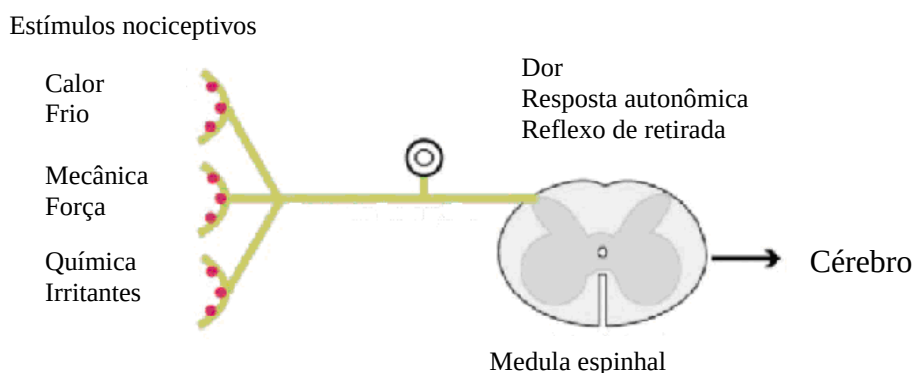
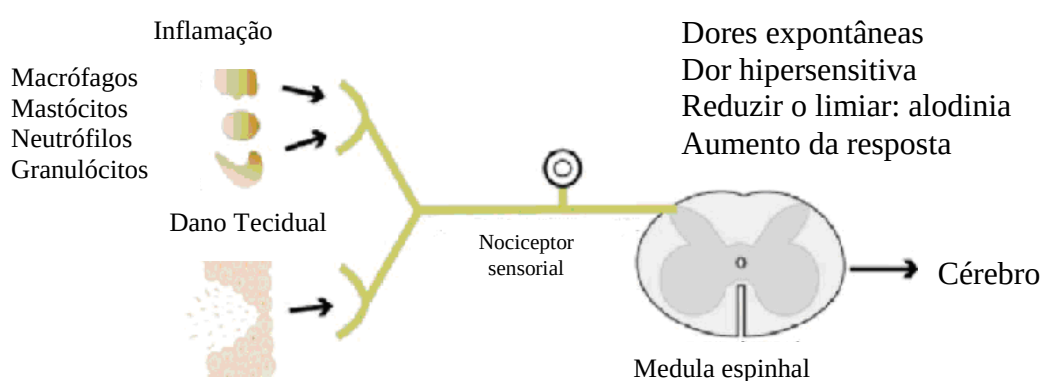
A percepção da dor envolve dois componentes: o estímulo doloroso (nocicepção) e a reação emocional. A dor tem um valor biológico fundamental, pois alerta o indivíduo sobre a ocorrência de alguma forma de lesão orgânica instalada ou em vias de se instalar. Em condições normais, a

informação sensorial é captada por estruturas do sistema nervoso periférico (SNP) e transmitida ao sistema nervoso central (SNC). Nestas estruturas, neurotransmissores diferentes realizam a função bioquímica de transmitir a dor (DAUDT et al., 1998).

Existe uma diferença entre os termos nocicepção e dor. Muitos dos experimentos realizados com metodologias que empregam estímulos dolorosos são realizados em animais, os quais apresentam reações comportamentais compatíveis com a sensação de dor, porém, uma vez que não é possível determinar objetivamente se a sensação apresentada é realmente *dor* (já que o animal não pode se comunicar), é preferível classificá-la como sendo resultado da ativação das vias nociceptivas. Portanto, é possível denominar tais reações em animais experimentais como *nocicepção*. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (ALMEIDA, ROIZENBLATT, TUFIK, 2004).

Um episódio doloroso pode ser classificado de acordo com o critério temporal em *agudo* - respondem rapidamente às intervenções e não costumam ser recorrentes, estando associados a respostas neurovegetativas como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia, agitação psicomotora e ansiedade (BRASIL, 2001); e *crônico* - definida como a dor cuja duração ou intensidade afete adversamente a função ou o bem-estar do doente persistindo além da cicatrização do tecido normal (KOPF; BANZHAF; STEIN, 2005).

Do ponto de vista fisiológico a dor pode ser classificada em quatro tipos de mecanismos distintos, de acordo com o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos: *nociceptiva*, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores; *neurogênica*, quando ocorre lesão do tecido neuronal; *neuropática*, quando ocorre a disfunção de um nervo; *psicogênica*, que ocorre por fatores psicológicos; ou *inflamatória*, resultante de processos inflamatórios (Figura 7) (MILLAN, 1999).

Figura 7: Mecanismo específico da dor nociceptiva (A) e dor inflamatória (B)**A. Dor Nociceptiva****B. Dor Inflamatória**

Adaptado (WOOLF, 2004).

3.7.1 MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR

Os receptores nociceptivos são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, consequentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algioênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina, histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P, o fator de ativação plaquetária (PAF), radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxanos, interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) (KRAYCHETE, CALASANS, VALENTE, 2006; MA; QUIRION, 2008).

Quando um estímulo intenso provoca lesão tecidual, há desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas liberam enzimas que agem sobre os

cininogênios, formando cininas. A partir da membrana celular, pela ação da fosfolipase A2, libera-se ácido araquidônico que, por ação da ciclo-oxigenase e da lipoxigenase, origina prostaciclina, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas (BATLOUNI, 2010).

Além dessa resposta inflamatória tecidual, há uma resposta neurogênica, com produção de vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ação sobre as células inflamatórias com a liberação de mediadores químicos. Os mediadores inflamatórios agem aumentando a sensibilidade dos nociceptores, reduzindo assim seu limiar de excitabilidade (ROCHA et al, 2007).

===== 4. MATERIAIS E MÉTODOS =====

4.1 Reagentes

Soro bovino fetal (Gibco), Meio RPMI-1640, meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO), 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 - difeniltetrazólio (MTT), Hexadeciltrimetil Brometo de Amônia (HTAB) (Sigma Chemical Co.), meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, monoterpenos e sesquiterpenos, indometacina e carragenina (Sigma-Aldrich Co.), ácido acético e Tween 80 (Merck), EDTA (Labtest), kits TNF- α , IL-6 e IL-1 β ELISA (eBioscience), sulfato de morfina (União Química), ácido acético glacial (VETEC), citrato de fentanila (Cristalia), Evans blue (Sigma), cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (Vetbrands); reagente de Griess (Sigma).

4.2 Equipamentos

Balança analítica, câmara de fluxo laminar, câmara de CO₂, centrífuga, analisador hematológico ABX micros 60 - Horiba, espectrofotômetro de placa e pletismômetro (Ugo Basile, Itália), aparelho do tipo Clevenger (hidrodestilação/arraste a vapor).

4.3 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) albinos swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas, pesando entre 25 e 30 g e ratos wistar machos e fêmeas, pesando entre 180 a 200 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais

Experimentais (ICLAS). O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (23076.46150/2012-23 CCB - UFPE).

4.4 Material Botânico

Foram coletados materiais botânicos das duas variedades de *M. indica* (Rosa e Espada), em dezembro de 2010 no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco. Os espécimes foram identificados pela especialista Ladjane C. Gomes e uma exsiccata de cada espécime foi preparada e depositada no Herbário Vasconcelos Sobrinho – PEURF, da UFRPE, com os números 364 para *M. indica* var. Espada e 363 para *M. indica* var. Rosa.

4.4.1 Coleta do Látex

Os frutos foram colhidos com os pedúnculos intactos (cerca de 2 centímetros de comprimento). Posteriormente, o pedúnculo foi destacado a partir da zona de abscisão do fruto. O fruto foi imediatamente invertido sobre um tubo de vidro, e o látex foi coletado. Os tubos foram armazenados em freezer a 4 ° C até o isolamento do óleo essencial. Para obtenção de 100 mL de látex de *M. indica* var. Espada foram necessários 50 frutos de tamanho variando entre 8 -10,2 cm, já para *M. indica* var. Rosa foram necessários 70 frutos que variam entre 8 – 11,2 cm.

4.5 Local dos Experimentos

O isolamento e a caracterização química dos óleos essenciais foram realizados nas dependências do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Ciências Moleculares da UFRPE sob a supervisão do Prof. Claudio Augusto Gomes da Câmara.

Os ensaios biológicos para avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e nociceptiva foram realizados nas dependências do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada nas dependências do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Microciologia, Centro de pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, sediado no Campus da UFPE.

4.6 Isolamento dos Óleos Essenciais

As amostras do látex foram divididas em duas porções de 100 mL cada e submetidas à hidrodestilação durante duas horas num aparelho do tipo Clevenger. A camada do óleo obtida foi separada por decantação, seca com sulfato de sódio anidro, herméticamente fechado e estocado em vidro âmbar em temperatura de 5 °C antes de ser submetido à análise química e bioensaios, o rendimento total do óleo foi expresso como uma percentagem (g/100 g de material fresco).

4.7 Caracterização química dos óleos essenciais

4.7.1 Cromatografia Gasosa

As análises quantitativas por Cromatografia Gasosa (CG) foram realizadas utilizando um equipamento Hewlett-Packard 5890 GC série II aparelho equipado com um detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna capilar DB-5 de sílica fundida não polar (30 mx 0,25 x 0,25 milímetros de espessura de filme) da J & W Scientific. O programa de temperatura da coluna foi de 60-24 °C a 3 °C / min, para fins de integração. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 260 °C. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão de 1 mL/min, uma taxa de fluxo e uma pressão de entrada de 30 psi. O sistema foi operado em modo split (1:30). O volume de injeção foi de 0,5 mL da solução (1:100 do óleo em hexano). A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas dos picos de CG na ordem de eluição a partir da coluna DB-5, e é expressa como uma percentagem relativa da área total do cromatograma. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva.

4.7.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

A análise por CG/EM foram realizadas usando um equipamento Hewlett-Packard CG/EM (CG: 5890 SERIES II/ GC-EM: MSD 5971) montado com a mesma coluna e programa de temperatura do experimento com o CG. Os espectros de massas foram obtidos com um impacto eletrônico de 70 eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550. O hélio foi usado como gás de arraste, com velocidade de fluxo 1 mL/ min, modo split (1:30). O volume de injeção foi de 1 µL de uma solução de 1/100 diluída em hexano.

4.7.3 Identificação dos Componentes

A identificação dos componentes ocorreu com base nos índices de retenções (IR) obtidos no CG com relação a uma série homologa de n-alcanos (C₁₁-C₂₄) calculados de acordo com a equação de Van den Dool & Kratz e por comparação com espectros da literatura do computador (NIST 98 e WILEY) e outros espectros de massa. As percentagens das áreas foram obtidas eletronicamente a partir da resposta do CG-FID sem uso de padrão interno ou fatores de correção.

4.8 Atividades Biológicas

4.8.1 Toxicidade Aguda

A metodologia seguiu as normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para avaliação da atividade aguda foram utilizados grupos de 10 animais cada, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Uma suspensão contendo os óleos essenciais (OEMiR e OEMiE) dissolvidos em salina: tween 80 (3%) foi administrado por via oral (v.o.) nos animais dos grupos testes. Ao controle foi administrado o veículo (salina e Tween 80 3%). As doses foram escolhidas seguindo recomendações da ANVISA, visando o bem estar animal. Nos grupos de I a IV foram administradas uma suspensão do OEMiR nas doses de 1000, 2000, 4000 e 5000 mg/kg; nos grupos V a VIII foram administradas as mesmas doses do OEMiE. O grupo controle (IX) recebeu apenas o veículo. Após a administração de cada substância teste, foi realizado o *screening* hipocrático que

fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE; ROBICHAUD, 1983). Os parâmetros (atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte) foram avaliados durante as primeiras 24 h, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 min e diariamente durante 14 dias. Desde a 24^a h até o 14^o dia após a administração da dose, foram observadas a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram submetidos à anestesia terminal com xilazina (0,10 mL/kg) e cetamina (0,35 mL/kg). Os órgãos como baço, rins e fígados foram coletados e pesados para avaliar possíveis alterações macroscópicas e para determinar seus pesos absolutos e relativos (peso do órgão/100 g do peso corpóreo) (ANVISA, 2004).

4.8.2 Atividade Citotóxica

4.8.2.1 Cultura de Células

As linhagens celulares utilizadas para os ensaios de citotoxicidade foram HEP-2 (carcinoma da laringe humano), HT-29 (adenocarcinoma do cólon humano), NCI-H292 (carcinoma pulmonar mucoepidermoide humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). As linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). As linhagens de HEP-2, NCI-H292 e HT-29 foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 ug / ml de estreptomicina a 37 ° C com 5% de CO₂. A linhagem HL-60 foi cultivada em meio RPMI-1640, nas mesmas condições.

4.8.2.2 Citotoxicidade

Para determinação da citotoxicidade, uma suspensão celular de 3×10^5 células/mL para a linhagem HL-60 e 2×10^5 células/mL para as outras linhagens celulares foram preparadas em meio adaptado para cada linhagem celular. A suspensão foi distribuída em placas de cultura com 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂ durante 24 h. Após 24 h, os óleos essenciais OEMiR e OEMiE previamente dissolvidos em 1 mL de DMSO, foram diluídos em série no meio DMEM para obtenção das concentrações (50,0, 25,0, 12,50, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 µg/mL) e adicionadas em placas de 96 poços (100 µL), sendo novamente incubadas a 37 °C durante 72 h. No final do período de incubação, 25 µL de MTT (5,0 mg/mL) foi adicionada às placas, que foram então incubadas durante 3 horas. No final deste período, o meio de cultura contendo o excesso de MTT foi aspirado, e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A absorvância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas (ELX 800) e comparada com a do controle (MOSMANN, 1983). As substâncias foram testadas em duplicatas. Os valores foram expressos através de intervalo de confiança de dois experimentos independentes. Doxorrubicina foi utilizado como padrão.

4.8.3 Atividade Leishmanicida

4.8.3.1 Cultivo dos parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa LTB 0016) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB). Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas em fase exponencial de crescimento (3 dias de cultura).

4.8.3.2 Atividade dos óleos essenciais sobre formas promastigotas

Formas promastigotas (1×10^6 parasitas/mL) foram incubadas em meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, por 72 horas em placas de 24 poços, na ausência ou presença de diferentes concentrações dos óleos essenciais (6,25 – 100 $\mu\text{g/mL}$). O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados através de microscopia óptica e pela contagem direta em câmara de Neubauer. Os valores da IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas) foram determinados após 72 horas de cultivo por análise de regressão não linear através do software SPSS 8.0. Cada teste foi realizado em dois experimentos independentes em triplicata (MEDEIROS et al., 2011).

4.8.3.3 Avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais sobre células de mamíferos

Macrófagos peritoneais (6×10^5 células/mL) obtidos de lavado peritoneal coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus músculos*), foram aderidos em placas de 96 poços contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações (6,25 – 100 $\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais por 72 horas. Após este período, o meio foi retirado e adicionado 100 μL de meio RPMI sem vermelho de fenol suplementando com 10% de SFB e 10 μL de MTT (5mg/mL), a placa foi incubada em estufa de 37°C e 5% de CO_2 , na ausência de luz. Após 3 horas, a solução MTT-RPMI foi retirada e 100 μL de DMSO foram adicionados para solubilizar o precipitado. A absorbância de cada poço foi medida espectrofotometricamente a 595 nm em espectrofotômetro. A CC_{50} (concentração capaz de causar um efeito citotóxico em 50% das células) foi estimada por análise de regressão logarítmica dos valores encontrados, no software SPSS 8.0. A partir da CC_{50} , foram determinados os índices de seletividade (ISe) dos compostos, através da razão entre a CC_{50} e a IC_{50} de formas promastigotas, o qual nos informa o quanto um composto é tóxico para o parasita em relação as células do hospedeiro. Macrófagos não tratados

foram utilizados como controle. O teste foi realizado em dois experimentos independentes em quadruplicata (MEDEIROS et al., 2011).

4.8.4 Atividades Anti-inflamatória

4.8.4.1 Teste do bolsão de ar subcutâneo

O bolsão de ar é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória (SEDGWICK; LEES, 1986). Neste método se avaliou a migração celular para o sítio inflamatório através da quantificação de leucócitos, principalmente neutrófilos, os quais são o tipo de célula em maior abundância no exsudato produzido no interior do bolsão de ar. Os animais de ambos os sexos, os quais receberam por via subcutânea 2,5 mL de ar estéril (1º e 4º dia) na região dorsal. No 7º dia, 1 mL de uma solução de carragenina (1% (p/v) foi injetada na cavidade. Os óleos essenciais de *M. indica* var. Rosa e Espada (6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg), o fármaco padrão indometacina e o veículo (salina e Tween 80 3%) foram administrados por via oral 1 h antes da injeção de carragenina. Após 6 horas, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e os bolsões foram lavados com 3 mL de solução salina contendo 3 µM de EDTA. A contagem total de leucócitos foi determinada em analisador hematológico Micros 60 ®. Os exsudados foram centrifugados por 10 min e o sobrenadante armazenado a - 20 °C para análise de TNF- α , IL-6 β , IL-1 α e NO (KIM, et al., 2006; BARROS, et al., 2010).

O teste de bolsão de ar foi utilizado para definir a melhor dose a ser utilizada nos demais modelos experimentais de atividade anti-inflamatória.

4.8.4.1.1 Quantificação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 α).

A quantificação dos níveis de TNF, interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) foram realizadas através da técnica de ELISA sandwich usando kits específicos para camundongos de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) com um limite inferior de detecção de 10 pg/mL. A determinação dessas citocinas permite avaliar se o efeito do óleo essencial envolve a modulação do sistema imunitário.

4.8.4.1.2 Quantificação dos níveis de óxido nítrico

O NO é um importante mediador na inflamação aguda e crônica. Este mediador é considerado um potente vasodilatador, o seu envolvimento durante a resposta inflamatória pode estar relacionada com sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e consequente formação de edema através de mudanças na circulação sanguínea local (SALVEMINI et al., 1993; SALVEMINI, et al., 1996). Para avaliação da produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrato (metabólito estável do NO) foram medidas no sobrenadante do exsudato do bolsão de ar. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50 µL de reagente de Griess por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio em triplicata (GIUSTARINI et al., 2008).

4.8.4.2 Peritonite induzida por carragenina

Este modelo, diferente do teste de bolsão de ar subcutâneo, tem por objetivo avaliar o influxo significativo de macrófagos e mastócitos para o local de inflamação (DAS, 1998). Dois grupos receberam, por via oral, os óleos essenciais OEMiR e OEMiE (25 mg/kg). A indometacina, fármaco padrão, foi administrado via oral na dose de 10 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina e Tween 80 3%). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por aplicação intraperitoneal de 0,1 mL/10 g do agente flogístico carragenina (1% em salina). Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, sendo injetado na cavidade peritoneal 3 mL de PBS contendo EDTA para coleta do exsudato. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico micros 60 (GUERRA, et al., 2011).

4.8.4.3 Teste do Edema de Pata induzido por carragenina

Este teste teve por objetivo avaliar a diminuição na liberação de vários mediadores químicos. Neste ensaio o edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL a 1% de suspensão de carragenina na região sub-plantar da pata traseira direita dos ratos (WINTER; RISLEY; NUSS,

1962). Um volume igual de salina (NaCl 0,9%) foi injetado na pata contralateral. Os ratos foram divididos em grupos com 10 animais. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina + Tween 80 3%), outro grupo recebeu o fármaco padrão indometacina 10 mg/kg por via oral. Os grupos teste foram tratados com a dose de 25 mg/kg de ambos os óleos essenciais, 1 hora antes da injeção de carragenina. O volume da pata foi medido antes da administração de carragenina em 60, 120, 180 e 240 min após a aplicação. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição do edema, calculado de acordo com a seguinte fórmula $[1 - \text{tratado/controlado}] \times 100$.

4.8.4.3.1 Atividade da Mieloperoxidase

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e é usado como índice quantitativo para avaliar a migração celular para o sítio da inflamação em vários tecidos. Amostras da região plantar da pata inflamada dos animais foram imediatamente retiradas e armazenada em 500 µL de tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia – diluído em 1 litro de tampão fosfato de potássio) a -20° C, para posterior determinação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). Para a determinação dessa enzima, as amostras foram homogeneizadas com tampão HTAB e centrifugadas (10 minutos, 14.000 rpm e 4 °C). O sobrenadante foi coletado e 7 µL foi distribuído em placa de 96 poços. Em seguida adicionou-se 200 µL por poço de dianisidina (16,7 mg de o-dianisidina – Sigma; 90 mL de água deionizada; 10 mL de tampão fosfato de potássio; 50 µL de peróxido de hidrogênio 1%). A concentração de MPO foi estimada por meio de medida colorimétrica (absorbância a 450 nm) através de espectrofotometro. Os resultados foram expressos em absorbância/5min (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). O teste foi realizado em duplicata.

4.8.4.4 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético.

A fim de avaliar se os óleos essenciais inibem a participação de aminas vasoativas (como histamina, serotonina e bradicinina), foi realizado o ensaio da permeabilidade vascular, cujo extravasamento de um corante para a cavidade peritoneal é diretamente proporcional à intensidade

de cor medida espectrofotometricamente (LYKBE; CUMMINGS, 1969). Os óleos foram administrados aos animais (n=8) por via na dose de 25 mg/kg. O grupo padrão recebeu indometacina na dose de 10 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (salina e Tween 80 3%). Trinta minutos após, cada animal recebeu por via endovenosa 0,1 mL de uma solução salina de azul de Evans pelo plexo retroorbital. Após 10 minutos da injeção do corante, 0,5 mL ácido acético 0,5% (v/v) foi injetado por via intraperitoneal. Vinte minutos após, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, a cavidade peritoneal foi lavada com 2,0 mL de salina e o exsudato foi coletado e centrifugado a 2.000 rpm durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em filtro de 610 nm com um espectrofotômetro e a concentração de corante extravasado foi calculada usando uma curva padrão de corante de azul de Evans (WHITTLE, 1964).

4.8.5 Atividade Antinociceptiva

4.8.5.1 Nocicepção induzida por ácido acético

Este modelo é utilizado como triagem uma vez que nos informa se as substâncias testadas possuem ou não ação nociceptiva de forma não específica, pois é um modelo sensível a substâncias analgésicas de ação central ou periférica dotada dos mais variados mecanismos de ação (SHAFIEE et al., 2003). Neste ensaio os animais receberam tratamento por via oral com os óleos essenciais nas doses de 12,5, 25, 50 mg/kg, indometacina na dose de 10 mg/kg (fármaco padrão) e o veículo (salina + TWEEN 80, 3%). Após uma hora, o ácido acético 1% foi injetado (0,1 mL/10 g do peso do animal) na cavidade peritoneal dos animais para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Dez minutos após a aplicação do ácido, os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno transparentes, onde foram observados e registrou-se o número de contorções abdominais durante 20 minutos. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções do grupo tratado com o a média do grupo controle (KOSTER; ANDERSON; De DEBEER, 1959; GUERRA et al., 2011).

4.8.5.2 Teste da Formalina

O teste da formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de fármacos analgésicos, sendo utilizado no esclarecimento dos possíveis mecanismos do efeito antinociceptivo. Este teste tem por objetivo avaliar a ação das substâncias testadas tanto sobre a dor neurogênica quanto sobre a dor inflamatória (HUNSKAAR; HOLLE, 1987). Neste ensaio os animais receberam tratamento por via oral com os óleos essenciais nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg e o veículo (salina + TWEEN 80, 3%; v.o) 1 hora antes da injeção de formalina. A morfina na dose de 2,5 mg/kg foi administrada 45 minutos antes da indução da nocicepção (GOMES et al., 2007). Em seguida, os animais receberam injeção de 20 µL de formalina (2,5%, v/v) na região subplantar da pata direita. Imediatamente após a injeção, o tempo em que o animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado. A resposta nociceptiva foi registrada nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória) após injeção de formalina.

4.8.5.3 Teste da placa Quente (*hot plate*)

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por IRWIN (1968). O teste da placa quente é muito para avaliar a ação de fármacos sobre o sistema nervoso central (EDDY; LEIMBACH, 1953). Neste ensaio os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio (Insight equipments, Brasil) aquecida à temperatura fixa (55 ± 1 °C) e observados em relação ao tempo que levaram para manifestar uma resposta ao estímulo térmico. Esta resposta corresponde ao ato de lamber as patas, pular ou sapatear. Vinte e quatro horas antes de se iniciar o teste, os animais foram submetidos ao estímulo, sendo selecionados os que levaram até 20 segundos para manifestar resposta. Os animais foram tratados, por via oral, com salina e os óleos essenciais (12,5, 25 e 50 mg/kg). As medidas de latência foram realizadas nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos após o tratamento oral. Foi utilizado como fármaco padrão, por via subcutânea, a morfina (2,5 mg/kg) e solução salina como controle (salina + TWEEN 80, 3%) (IRWIN, 1968).

4.9 Análise Estatística

4.9.1 Atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica

Os resultados foram expressos como média $\pm$ D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – uma ou duas vias), seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o software *Graph Pad prism*. 5.0. Valores de “p” menores que 0,05, foram considerados significativos.

4.9.2 Atividade Leishmanicida

As análises de regressão não linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM CO., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Dunnet, considerando significativo valores de $p < 0.05$, no programa *Graph Pad Prism* 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

== 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ==

5.1 Composição química dos óleos essenciais

O látex dos frutos de *M. indica* var. Rosa e Espada é um líquido claro viscoso com um aroma característico da fruta madura. Os látex coletados foram submetidos à hidrodestilação e produziram óleos incolores e com cheiro agradável. O melhor rendimento foi obtido para o óleo essencial de *M. indica* var. Rosa (OEMiR) ($9,50 \pm 0,0\%$). Todos os constituintes identificados nos óleos essenciais do látex das duas variedades de *M. indica* estudadas estão listadas na Tabela 1 na ordem de eluição da coluna de DB-5.

Tabela 1 – Composição química dos óleos essenciais do látex de duas variedades de *Mangifera indica*

Componentes	IR ^a	IR ^b	<i>M. indica</i> var. Espada	<i>M. indica</i> var. Rosa	Método de Identificação
Rend (%)±SD			5,6±0,0	9,5±0,1	
α -Pineno	930	932	0,8±0,0	11,5±0,1	IR, EM, CI
Canfeno	941	946		0,3±0,0	IR, EM, CI
Sabineno	966	969	.	1,9±0,0	IR, EM
β -Pineno	979	974	1,9±0,0	40,7±0,3	IR, EM, CI
δ -2-Careno	997	1001	0,6±0,0		IR, EM
δ -3-Careno	1005	1008	5,7±0,0	2,1±0,0	IR, EM
α -Terpineno	1012	1014	2,5±0,0	1,0±0,0	IR, EM, CI
<i>p</i> -Cimeno	1018	1020	0,4±0,0	0,3±0,0	IR, EM, CI
Limoneno	1023	1024	1,4±0,1	1,3±0,0	IR, EM, CI
Silvestreno	1025	1025	0,9±0,0	0,7±0,0	IR, EM
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1039	1044		0,6±0,0	IR, EM
γ -Terpineno	1050	1054	0,4±0,0	0,2±0,0	IR, EM
Terpinoleno	1082	1086	73,6±0,2	28,3±0,1	IR, EM, CI

<i>p</i> -Cimen-8-ol	1180	1179	0,7±0,0	0,3±0,0	IR, EM
<i>trans</i> -Crisantenil acetato	1231	1235	0,3±0,0		IR, EM
<i>cis</i> -Crisantenil acetato	1258	1261	0,3±0,0	0,3±0,0	IR, EM
Isopulegil acetato	1271	1274	0,5±0,0	0,1±0,0	IR, EM
<i>E</i> -Patchenol	1325	1328		0,1±0,0	IR, EM
β -Patchouleno	1380	1379	0,3±0,0	0,1±0,0	IR, EM
β -Longipineno	1400	1400	0,8±0,0	2,9±0,0	IR, EM
Cicloseiqueleno	1407	1406	0,4±0,0	0,2±0,0	IR, EM
γ -Elemeno	1435	1434	0,3±0,0	1,5±0,0	IR, EM, CI
Citronelil propanoato	1442	1444		0,1±0,0	IR, EM
α -Cloveno	1449	1452	0,6±0,0	0,3±0,0	IR, EM
γ -Gurjuneno	1472	1475	3,7±0,2	1,3±0,0	IR, EM, CI
γ -Muuroleno	1477	1478	0,4±0,0		IR, EM
γ -Himachaleno	1477	1481	0,6±0,0	0,2±0,0	IR, EM
Monoterpenos hidrocarbonados			88,2±0,2	88,9±0,4	
Monoterpenos Oxigenados			1,8±0,1	0,8±0,0	
Sesquiterpenos hidrocarbonados			7,1±0,1	6,5±0,1	
Sesquiterpenos Oxigenados				0,1±0,0	
Total			97,1±0,3	96,3±0,5	

^a Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcanos em uma coluna de capilaridade DB-5. ^b Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção, EM = espectrometria de massa, CI = co-injeção com padrões autênticos.

No óleo essencial OEMiR foram identificados 24 compostos e no OEMiE foram identificados 22 compostos, o que representa cerca de $97,1 \pm 0,3\%$ e $96,3 \pm 0,5\%$ do OEMiE e OEMiR, respectivamente (Tabela 1). Dezenove compostos foram comuns a ambas as variedades. Esta análise revelou que os óleos foram caracterizados por um elevado teor de hidrocarbonetos monoterpênicos. O principal composto identificado no OEMiE foi terpinoleno ($73,6 \pm 0,2\%$), com

δ -3-careno ($5,7 \pm 0,0\%$), sendo o segundo mais abundante. O composto principal do OEMiR foi β -pineno ($40,7 \pm 0,3\%$), seguido por terpinoleno ($28,3 \pm 0,1\%$) e α -pineno ($11,5 \pm 0,1\%$). Os óleos apresentam perfis químicos semelhantes, diferindo apenas nas percentagens dos constituintes. O terpinoleno foi encontrado nos óleos de ambas as espécies, porém verificou-se que ele é o principal constituinte do OEMiE e foi encontrado em uma percentagem menor no OEMiR. O mesmo padrão foi observado para α -e β -pineno, que foram os principais componentes identificados no OEMiR mas foram detectados em percentagens inferiores a 2% no OEMiE.

Loveys et al. (1992), relataram a presença de terpinoleno (83,7%) e car-3-eno (89,8%) como principais componentes das variedades de manga Kensington australiana e Irwin, respectivamente. No nosso trabalho, estes compostos também foram detectados em ambas as variedades Rosa e Espada, no entanto, foram os principais componentes apenas na variedade Espada.

Em contraste, Andrade et al. (2000) estudando óleos essenciais das mangueiras do Pará (Brasil), não relataram a presença de terpinoleno na fração volátil da polpa de *M. indica* var. Rosa, apenas encontraram uma pequena quantidade (0,2%) na variedade Espada. De acordo com a literatura, os óleos essenciais a partir do látex das variedades de manga avaliadas neste trabalho, possuem diferenças na composição em relação aos óleos essenciais do látex de sete variedades colhidas na Índia (JOHN et al., 1999). Especificamente, estes óleos essenciais da Índia não continha terpinoleno, e esses óleos possuem menor teor de β -pineno e alta de β -mirceno, limoneno, cis-e trans-ocimeno e ocimeno.

O α -pineno foi o principal composto encontrado no óleo essencial obtido do fruto da variedade Qalmi (ANSARI et al., 2004) e do látex de quatro variedades de manga (Malgoa, Mudás, Mallika e Totapuri) coletados na Índia (JOHN et al., 1999). O óleo essencial obtido das folhas de uma espécie de manga do Quênia continha α -pineno como o composto principal (ALWALA et al., 2010). β -pineno foi encontrado numa quantidade apreciável (12,5%) de uma amostra de frutos da variedade Qalmi recolhidos na Índia (ANSARI et al., 2004).

5.2 Citotoxicidade dos Óleos Essenciais e dos Componentes Majoritários de *M. indica*

As atividades citotóxicas dos óleos essenciais das duas variedades de *M. indica* e dos principais terpenos da var. Rosa (β -pineno, terpinoleno e α -pineno), e da var. Espada (terpinoleno e δ -3-careno) bem como o possível sinergismo entre os principais terpenos, foram investigadas pelo ensaio do MTT (Tabelas 2).

Os valores de IC_{50} variaram entre 12,3 - 38,9 $\mu\text{g/mL}$ para o OEMiR e 3,6 - 14,5 $\mu\text{g/mL}$ para o OEMiE, dependendo da linhagem celular testada. Estes valores indicam que estas linhagens tumorais diferem quanto à sua sensibilidade para as substâncias contidas no óleo essencial do látex de *M. indica*. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferentes características moleculares destas células. Geralmente, o mecanismo de morte celular induzida após tratamento é dependente de vários fatores, tais como os compostos utilizados, as suas concentrações e da linhagem celular em estudo.

Tabela 2 – Atividade citotóxica do óleo essencial do látex de *M. indica* var. Rosa e var. Espada sobre células tumorais humanas.

Óleo Essencial	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HT-29	HEp-2	NCI-H292	HL-60
OEMiR	28,7	25,6	38,9	12,3
	20,3 – 30,5	20,5 – 31,9	33,3 – 48,4	9,5 – 15,9
OEMiE	9,2	6,2	14,5	3,6
	6,0 – 14,0	4,4 – 8,6	11,4 – 18,4	2,8 – 4,8
Terpinoleno	16,7	13,7	17,4	28,8
	13,0 – 21,6	11,5 – 16,3	14,8 – 19,6	25,6 – 32,3
α -Pineno	10,3	11,0	11,8	11,8
	8,7 -12,2	7,7 – 15,6	9,1 – 13,5	10,0 – 14,0
β -Pineno	6,6	6,3	7,5	10,5

	5,8 – 7,5	5,0 – 8,0	5,1 – 11,0	9,1 – 12,0
δ-3-Careno	45,5	35,0	42,6	63,1
	37,6 – 55,0	29,6 – 41,2	35,1 – 51,9	47,4 – 84,0
Terpinoleno (74%) +	22,8	26,5	29,3	27,0
δ-3-Careno (6%)	16,4 – 31,6	22,8 – 30,8	25,8 – 33,2	23,03 – 31,8
β-Pineno (41%) +	22,3	30,5	40,1	7,8
Terpinoleno (28%) +	16,1 – 31,1	25,6 – 36,4	20,6 – 47,9	5,6 – 10,7
α-Pineno (11%)				
Terpinoleno (74%) +	39,4	35,0	30,4	53,2
β-Pineno (2%)	36,0 – 43,1	27,7 – 44,4	21,8 – 42,2	44,6 – 63,4
Doxorrubicina	0,4	0,7	0,01	0,2
	0,3 – 0,5	0,2 – 1,4	0,004 – 0,3	0,01 – 0,2

Tempo de exposição, 72 h (n = 3). HEp-2, carcinoma da laringe; NCI-H292, pulmão carcinoma mucoepidermóide, HT-29, adenocarcinoma de cólon, e HL-60, células de leucemia promielocítica. Doxorrubicina foi utilizado como um controle positivo. OEMiR = óleo essencial de *M. indica* var. Rosa; OEMiE = óleo essencial de *M. indica* var. Espada. R²- coeficiente regressão.

De acordo com os critérios do *National Cancer Institute* (NCI-USA), para considerar um extrato bruto promissor para purificação, a IC₅₀ deve ser $\leq 30 \mu\text{g/mL}$, e para uma substância, este valor deve ser $\text{IC}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$, o que corresponde a uma forte atividade citotóxica (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Os óleos testados apresentaram valores de IC₅₀ abaixo do valor determinado pela NCI para todas as linhagens celulares testadas exceto para OEMiR frente a linhagem NCI-H292. O óleo essencial é classificado como um extrato bruto e tem uma composição complexa, contendo de um a várias dezenas de centenas de componentes, com os terpenos, sendo os componentes principais (MIGUEL, 2010).

Terpinoleno e δ -3-careno foram os principais componentes do OEMiE e ambos foram avaliados separadamente para determinar as suas atividades citotóxicas. Terpinoleno demonstrou

atividade citotóxica em todas as linhagens testadas, entretanto foi mais potente frente a HT-29, HEp-2 e NCI-H292. δ -3-careno exibiu baixa citotoxicidade para todas as linhagens testadas.

Para avaliar as interações entre os constituintes principais do OEMiE, alguns dos seus componentes foram testados isoladamente e em misturas com concentrações iguais às presentes no OEMiE. Quando analisados isoladamente o terpinoleno apresentou uma atividade citotóxica mais potente do que δ -3-careno, no entanto, quando foram analisadas proporções iguais às encontradas no óleo [(terpinoleno: δ -3-careno (74:6)], a mistura apresentou atividade inferior ao terpinoleno e superior ao careno. Estes resultados sugerem que a atividade citotóxica exibida pelo OEMiE envolve interações complexas entre o componente principal terpinoleno e outros componentes minoritários da mistura.

Os principais componentes do OEMiR mostraram os seguintes resultados quando analisados separadamente: β -pineno (IC_{50} 6,6 - 10,5 μ /mL), terpinoleno (IC_{50} 13,7 - 28,8 μ /mL) e α -pineno (IC_{50} 11,0 - 11,8 μ /mL). Ambos α -e β -pineno apresentaram maior citotoxicidade do que o terpinoleno.

Quando uma mistura dos três componentes foi analisada [β -pineno (41%) + terpinoleno (28%) + α pineno (11%)], observou-se uma significativa atividade citotóxica frente a todas as linhagens tumorais, exceto NCI-H292. Uma significativa atividade citotóxica foi observada para β -pineno e, dado que é um componente do OEMiE, a atividade citotóxica de uma mistura de β -pineno e terpinoleno foi avaliada. A mistura β -pineno + terpinoleno se apresentou menos ativa do que os compostos separados e o OEMiE, indicando que existe antagonismo entre os dois componentes. Este resultado mostra que a atividade do OEMiE está associado com o sinergismo entre todos os compostos presentes no óleo, e não apenas por um componente em particular.

No que diz respeito às suas propriedades biológicas, deve se ter em mente que os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas, não se pode saber se os seus efeitos biológicos são o resultado de sinergismo entre todas as moléculas ou reflete apenas as atividades das principais moléculas presentes nas concentrações mais elevadas de acordo com a análise de

cromatografia em fase gasosa. Geralmente, os componentes principais refletem muito bem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais a partir dos quais eles foram isolados, com as amplitudes dos seus efeitos sendo dependente da sua concentração quando são testados isoladamente ou em óleos essenciais (IPEK et al., 2005).

Assim, a importância do sinergismo entre as várias moléculas contidas em um óleo essencial, em comparação com a ação de um ou dois componentes principais do óleo, parece questionável. No entanto, é possível que a atividade dos componentes principais seja modulada por outras moléculas em pequenas concentrações (HOET et al., 2006).

Além do mais, é provável que vários componentes de um óleo desempenhem papéis essenciais na definição da sua fragrância, densidade, cor, textura, e, acima de tudo, as interações celulares, incluindo a penetração celular, atração lipofílica ou hidrofílica, fixação em paredes e membranas celulares e distribuição celular (CAL, 2006). Esta última característica é muito importante, porque a distribuição do óleo dentro da célula determina o tipo de ação (BAKKALI et al., 2008).

Devido ao grande número de componentes, os óleos essenciais parecem não ter alvos celulares específicos (CARSON; MEE; RILEY, 2002). O modo de ação dos óleos essenciais muitas vezes envolve diversos alvos ao mesmo tempo (Di PASQUA et al., 2006). Como compostos típicos lipofílicos, estes óleos passam através da parede celular e a membrana citoplasmática, perturbando a estrutura das diferentes camadas de polissacáridos, ácidos graxos e os fosfolípidos e permeabilização dessas estruturas (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Em contraste com os numerosos relatórios que têm sido publicados sobre a toxicidade dos óleos essenciais, há pouco conhecimento acerca dos efeitos inibitórios dos hidrocarbonetos terpênicos puros. O representante mais comum de terpenos cíclicos é α -pineno, e β -pineno, limoneno e terpinoleno são também comuns. Os estudos com sistemas de modelo de lipossomas têm confirmado que os hidrocarbonetos de terpeno cíclicos acumulam-se na membrana. Estes compostos podem atravessar facilmente e/ou interagir com a membrana para provocar uma perda

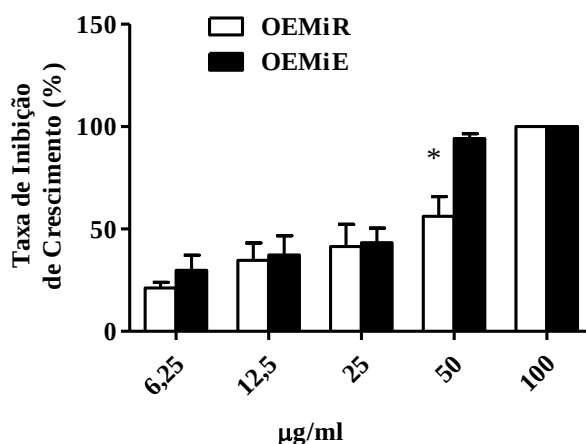
de integridade estrutural. Este aumento da permeabilidade aos íons de protons pode resultar em morte celular (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

A citotoxicidade dos óleos essenciais para células de mamífero pode ser causada pela indução de apoptose e necrose. Em células eucarióticas, os óleos essenciais podem induzir a despolarização das membranas mitocondriais, diminuindo o potencial de membrana, afetando os canais de Ca^{++} e outros íons e diminuindo o gradiente de pH, afetando (como em bactérias) a bomba de prótons e o *pool* de ATP (VERCESI et al., 1997). Os óleos essenciais alteram a fluidez das membranas, que se tornam permeável anormalmente, resultando na fuga de radicais, citocromo c, íons de cálcio e proteínas, como no caso do estresse oxidativo e insuficiência bioenergética. A permeabilização das membranas mitocondriais exteriores e interiores levam a morte celular por apoptose e necrose (ARMSTRONG, 2006).

5.3 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais sobre formas promastigotas

Nossos resultados demonstraram que ambos os óleos apresentaram efeito citotóxico similar sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose-dependente (Figura 8). Apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ o perfil de atividade citotóxica entre os dois óleos se diferenciaram, tendo o OEMiE apresentado taxa de inibição de crescimento superior a OEMiR.

Figura 8: Efeito dos óleos essenciais sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.



*p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA)

As IC₅₀/ 72 h estimada para os dois óleos foram 39,1 e 23,0 µg/mL para OEMiR e OEMiE, respectivamente (Tabela 3). Os óleos apresentaram um baixo efeito citotóxico em relação aos macrófagos, apresentando uma CC₅₀ 142,8 e 158,6 µg/mL para OEMiR e OEMiE, no entanto, ambos se mostraram mais específicos para o parasita do que para os macrófagos, com valores de índice de seletividade de 6,9 para OEMiE, demonstrando, assim, ser seis vezes mais tóxico para o parasita do que para os macrófagos, já em relação ao OEMiR observamos um índice de seletividade menor 3,7, porém apresentando atividade, uma vez que o aceitável é que o IS seja acima de 3,00.

Tabela 3. Efeito leishmanicida e citotóxico dos óleos essenciais de *M. indica* sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

Tratamento	Promastigota IC ₅₀ (µg/ml)	Macrófago CC ₅₀ (µg/ml)	Índice de Seletividade
EOMiR	39,1±5,6	142,8±6,0	3,7
EOMiE	23,0±2,7	158,6±2,5	6,9

Índice de Seletividade_{pro} = CC₅₀ macrófagos/IC₅₀ forma promastigota

IC₅₀- concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas;

CC₅₀- concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos;

Os óleos essenciais, bem como os seus componentes têm sido pesquisados devido a seu amplo espectro de efeitos farmacológicos, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-helmíntica e antiprotozoários (MACEDO et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Eles também são conhecidos por possuírem atividades biológicas importantes contra tripanosomatídeos como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* (OTOGURO et al., 2011) (De MEDEIROS et al., 2011) e *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007). Essas atividades são atribuídas, principalmente, à presença de constituintes terpênicos, aromáticos e alifáticos (SCHELZ; HOHMANN; MOLNAR, 2010).

É descrito na literatura que os componentes terpênicos são responsáveis pela característica hidrofóbica dos óleos essenciais (BURT et al., 2005), esta característica permite que os óleos essenciais passem livremente através das membranas celulares e induzem a morte dos parasitas uma vez que afetam as vias metabólicas ou e as organelas citoplasmáticas (KNOBLOCH et al., 1989). Por outro lado, os próprios óleos essenciais podem interagir com a membrana do parasita e causar alterações fisiológicas drásticas que levam à perda da permeabilidade da membrana, que em última instância conduzem à morte celular (BAKKALI et al., 2008). No entanto, devido ao grande número de componentes e as interações sinérgicas ou antagonistas existentes entre eles, é provável que os óleos essenciais tenham outros alvos celulares além das membranas celulares. As interações dos óleos essenciais com lipídios e proteínas foram relatados (BAKKALI et al., 2008) .

5.4 Toxicidade aguda

O primeiro experimento *in vivo* realizado foi à avaliação da toxicidade aguda, que avalia o efeito que um conjunto de substâncias pode produzir no animal dentro de um curto período de tempo resultante da administração de uma única dose ou de várias doses. É uma avaliação importante no início da pesquisa para fornecer subsídios sobre o modo de ação tóxico da substância testada e determinante para a continuidade da pesquisa de produtos naturais (BRITO, 1994).

Os resultados do teste de toxidade aguda estão descritos na Tabela 4. Os animais tratados com os óleos essenciais apresentaram piloereção, agitação e sonolência, logo após a gavagem, (na

primeira hora de observação), entretanto, nenhum animal veio a óbito em 24 horas. Foi observada variação significativa consumo de ração dos animais do grupo tratado em relação ao controle durante 14 dias de observação. Mesmo apresentando uma diminuição no consumo de ração, não houve alteração significativa nos pesos dos animais dos grupos tratados, evidenciando possível ausência de toxicidade sistêmica (Tabela 4). Segundo Cunha (2009) os sinais de toxicidade sistêmica podem ser definidos pela diminuição considerável no consumo de água e ração, associado a alterações comportamentais, apatia, além da redução da massa corpórea e da evolução ponderal (CUNHA, 2009).

O “screening” hipocrático permite avaliar os efeitos de substâncias sobre o estado de consciência e disposição, a atividade exploratória, coordenação motora, tônus muscular, reflexos e atividade sobre o sistema nervoso central e autônomo. Este teste possibilita a aquisição dos dados preliminares sobre os efeitos que um extrato bruto pode produzir, direcionando as investigações científicas posteriores (MALONE, 1977). Nos primeiros 15 minutos foi avaliada a atividade exploratória, ou seja, o animal explora a gaiola, um ambiente novo, o que é medido através da ambulação. Dos 15 aos 60 minutos, foi avaliada a atividade motora do animal, isto é, quando ele já conhece o ambiente e não explora mais, e sim se movimenta (CARLINI; BURGOS, 1979).

Tabela 4: Evolução ponderal, consumo de ração e água dos animais tratados com os óleos essenciais das duas variedades de *Mangifera indica* (Rosa e Espada) em relação ao grupo controle.

Óleos Essenciais	Dose (mg/kg)	Consumo de ração (g/dia/animal)	Consumo de água (mL/dia/animal)	Peso dos Animais Inicial/Final (g)	Evolução Ponderal (%)
Controle	-	8,37 ± 0,82	8,81 ± 0,87	32,5 – 40,2	5,3 ± 0,38
OEMiR	1000	5,70 ± 0,55*	8,00 ± 0,87	31,3 – 34,8	4,8 ± 0,47
	2000	5,96 ± 0,57*	7,39 ± 0,72	24,9 – 30,1	4,7 ± 0,22
	4000	6,91 ± 0,67*	7,98 ± 0,77	23,6 – 34,1	4,9 ± 0,10
	5000	6,57 ± 0,67*	8,57 ± 0,87	29,4 – 33,1	5,2 ± 0,20
OEMiE	1000	6,41 ± 0,67*	9,11 ± 0,90	31,7 – 39,8	5,2 ± 0,57
	2000	5,92 ± 0,57*	7,14 ± 0,72	21,4 – 30,5	5,3 ± 0,60
	4000	5,55 ± 0,52*	7,86 ± 0,77	24,6 – 26,5	5,0 ± 0,70
	5000	6,56 ± 0,62*	8,81 ± 0,87	22,8 – 31,8	5,0 ± 0,21

*p < 0,05 diferença significativa em relação ao controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle (salina + Tween 80 3%). N= 10 animais por grupo. OEMiR (*M. indica* var. Rosa) e OEMiE (*M. indica* var. Espada)

A determinação do peso relativo dos órgãos de metabolização/excreção (fígado e rins), órgão imunológico (baço) podem fornecer indicações da função de cada órgão e atuação da substância testada sobre o organismo. Em nosso estudo houve diferenças estatisticamente significativa em algumas doses, dos pesos relativos e absolutos do fígado, rim e baço comparado ao grupo controle. Estas alterações observadas com o uso dos óleos em alguns grupos foram pouco relevantes quando comparados aos seus controles, não caracterizando toxicidade. A necropsia dos animais não evidenciou nenhuma alteração macroscópica que justificasse o estudo histopatológico dos órgãos selecionados para análise.

Os resultados indicam que os óleos em estudo apresentaram baixa toxicidade, tendo o valor da $DL_{50} > 5000$ mg/kg, sendo considerada segura.

5.5 Atividade Anti-inflamatória

5.5.1 Teste do Bolsão de Ar Subcutâneo

O pré-tratamento dos animais com os óleos essenciais tanto o OEMiR quanto o OEMiE apresentaram atividade anti-inflamatória para todas as doses testadas, indicada por uma diminuição

significativa na migração de leucócitos polimorfonucleares para o sítio inflamatório quando comparados com o grupo controle (Tabela 5). As doses de OEMiR (12,5, 25 e 50 mg/kg) apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante à indometacina (10 mg/kg). Apesar do OEMiE ter apresentado atividade anti-inflamatória, o OEMiR apresentou melhor atividade. Para ambos os óleos a atividade não foi dose dependente.

Tabela 5: Efeitos dos óleos essenciais do látex de *M indica* sobre a migração celular na inflamação induzida pela carragenina no modelo do bolsão de ar (média $\pm$ DP).

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Nº de PMNL/mL ((x10 ⁶))	Inibição (%)
Controle	-	10,53 $\pm$ 0,95	-
Salina	-	0,25 $\pm$ 0,05	-
Indometacina	10	2,61 $\pm$ 0,27*	75,2
OEMiR	6,25	6,44 $\pm$ 0,62*	38,8
	12,5	2,33 $\pm$ 0,21* Δ	77,9
	25	2,50 $\pm$ 0,19* Δ	72,9
	50	3,34 $\pm$ 0,30* Δ	68,3
	6,25	6,03 $\pm$ 0,63*	42,7
OEMiE	12,5	4,43 $\pm$ 0,44*	57,9
	25	4,95 $\pm$ 0,42*	53,0
	50	4,74 $\pm$ 0,49*	55,0

* Significativo estatisticamente em relação ao grupo controle: (p < 0,05). N= 8 animais por grupo.

Δ Não significativo em relação ao grupo tratado com indometacina.

Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

O bolsão de ar é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória. A indução da inflamação pela carragenina no bolsão de ar subcutâneo forma uma membrana com características semelhantes à membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatóide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (SEDGWICK; LEES, 1986).

A carragenina é um polissacarídeo, derivado de algumas espécies de algas, que é amplamente utilizado em diversos estudos experimentais a cerca da migração de neutrófilos por ser

uma substância com intensa ação quimiotática (SZABÓ; BECHARA; CUNHA, 2005). Ela desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios (PANTHONG, et al., 2004), sobretudo histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (DAMAS et al., 1990). Apartir dos resultados obtidos no teste de bolsão de ar, a dose de 25 mg/kg foi escolhida para avaliação da atividade anti-inflamatória nos outros modelos experimentais por ser uma dose intermediária e não ter apresentado diferença estatística significativa em relação às demais.

5.5.1.1 Determinação dos níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 and TNF- α).

As citocinas são importantes mediadores pró e anti-inflamatórios que se ligam a receptores específicos na célula alvo para promoverem o efeito biológico (WONG; FISH, 2003).

Para avaliar ação dos óleos essenciais sobre a liberação de citocinas, foi realizada a dosagem das interleucinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) do exsudato inflamatório do teste do bolsão. Os resultados encontram-se na Figura 9.

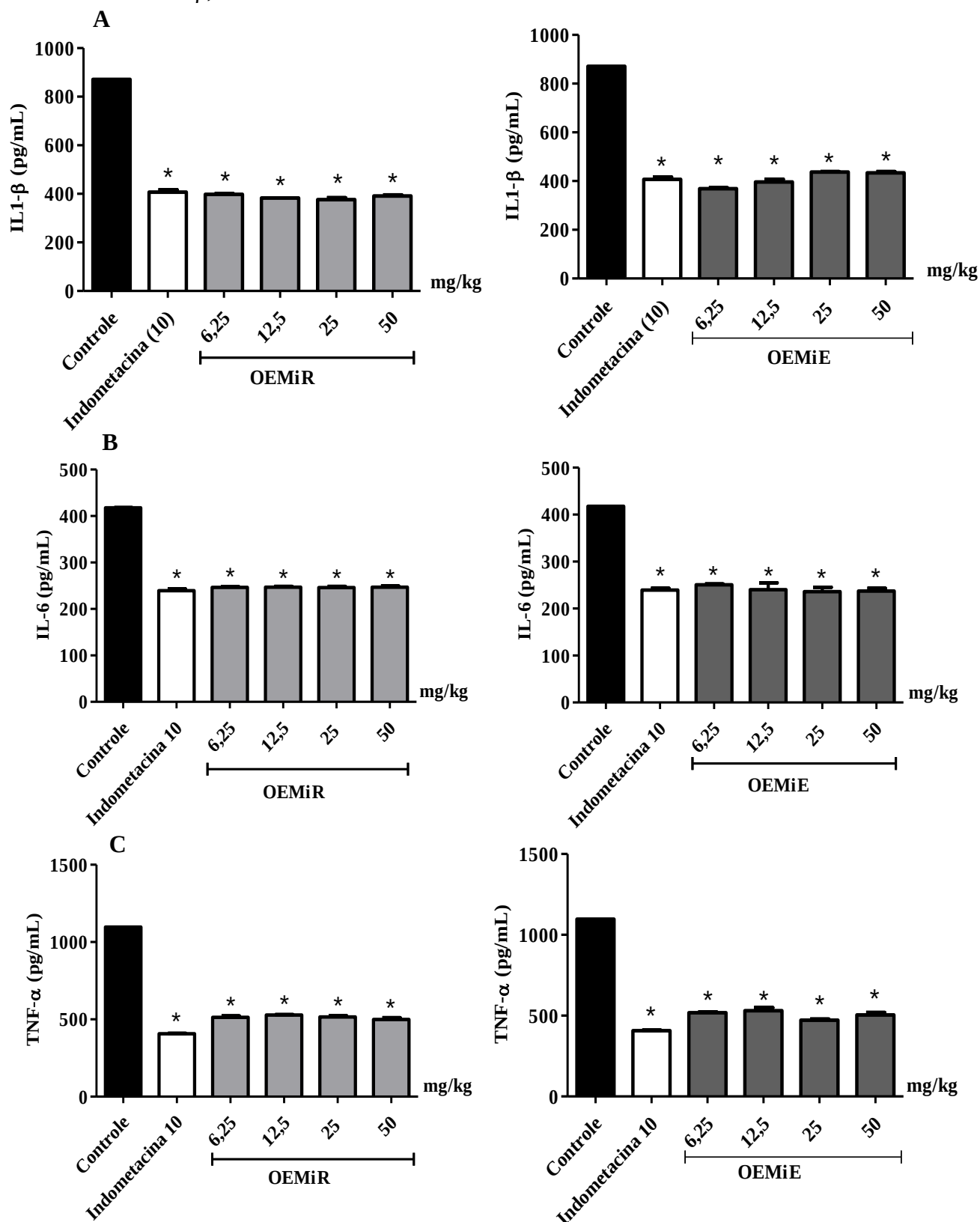
Todas as doses de OEMiR e OEMiE testadas diminuíram significativamente a produção de IL-1 β em relação ao grupo controle.

A IL-1 β é a principal citocina envolvida na inflamação. Esta citocina sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos e age sinergicamente com TNF- α ativando a resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos e promovendo a diapedese leucocitária na resposta inflamatória aguda (BARKSBY et al., 2007).

A função principal da IL-1 β é servir como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções e outros estímulos, promovendo a proliferação e a diferenciação das células do sistema imune inato e adaptativo (OLIVEIRA et al., 2008). É uma das responsáveis por induzir a expressão da molécula de adesão ICAM-1, e aumento da síntese de outras citocinas como IL-6 pelos monócitos (LEMAY; VANDER; KLUGER, 1990).

Figura 9: Efeito dos óleos essenciais do látex de *M indica* sobre os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na inflamação induzida por carragenina (média $\pm$ DP).

A – Nível de IL-1 β , B – Nível de IL-6 and C – Nível de TNF- α .



* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)

Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

Ambos os óleos estudados diminuíram a concentração de TNF- α no exsudato inflamatório em relação ao grupo controle.

A principal função do TNF- α é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. O TNF- α age nas células endoteliais, ativa a expressão de novos receptores celulares que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Esta citocina também estimula as células endoteliais a secretarem as quimiocinas que atraem os leucócitos. O TNF- α age no hipotálamo onde induz febre (pirógeno endógeno), por meio do aumento de síntese de prostaglandina. No fígado estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e do fibrinogênio, conjuntamente com as interleucinas 1 e 6. Quando secretado em grande quantidade, pode desencadear ainda choque séptico, causando hipoglicemia, diminuição do tônus vascular e da contração do miocárdio, além de coagulação intravascular disseminada (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (BLOEMEN et al., 2007). Além disso, o TNF- α é um dos principais reguladores da produção e liberação de IL-1 β . (SASAKAWA et al., 2005).

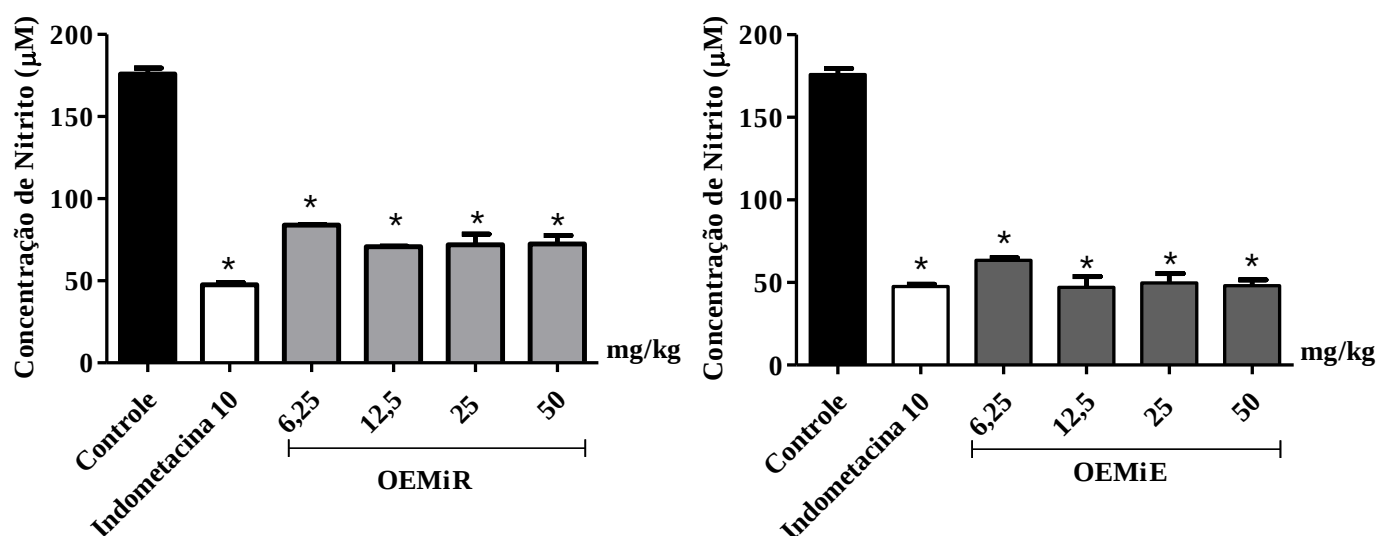
Ao avaliar os níveis de IL-6, observou-se que ambas as espécies, em todas as doses, causaram uma diminuição significativa dos níveis desta citocina quando comparados ao grupo controle.

A interleucina IL-6 é o principal estimulador da produção de proteínas da fase aguda (GAULDIE et al., 1987; GABAY, 2006). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SOUZA et al., 2008).

5.5.1.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico

Neste estudo, todas as doses testadas de ambos os óleos essenciais apresentaram uma diminuição significativa na produção do NO (Figura 10).

Figura 10: Efeito dos óleos essenciais sobre a produção de óxido nítrico no teste do bolsão de ar (média $\pm$ DP).



* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)
Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni

Segundo SALVEMINI et al. (1996), o NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Segundo dados da literatura, é atribuído ainda ao NO a capacidade de inibir a adesão leucocitária (TSAO et al., 1994) através da redução na expressão de moléculas de adesão (CD11b/CD18, L-, P-, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) (PRUEFER; SCALIA; LEFER, 1999).

O NO é um importante mediador na inflamação uma vez que está relacionado a várias ações: relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres que são protetores contra agentes infecciosos e células

tumorais, mas que também podem ser lesivos para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (RIBBONS et al., 1997).

Uma vez que houve uma redução na produção do NO na presença dos óleos testados em todas as doses, sugere-se uma ação inibitória da vasodilatação. Estes resultados corroboram com os resultados do edema de para e permeabilidade vascular induzidos por ácido acético.

5.5.2 Peritonite induzida por carragenina

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que os óleos essenciais inibiram significativamente a migração celular em relação ao grupo controle. Os óleos apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante à indometacina (10mg/kg) e não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 6: Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ DP) e percentual de inibição da inflamação dos grupos controle e tratados com os óleos essenciais no teste de peritonite induzida por carragenina

Treatamento	Dose (mg/Kg)	Nº of PMNL/mL ($\times 10^6$)	Inibição (%)
Controle	-	11,76 $\pm$ 0,88	-
Indometacina	10	1,64 $\pm$ 0,46*	86,05
OEMiR	25	1,56 $\pm$ 0,19*	86,73
OEMiE	25	1,69 $\pm$ 0,29*	85,63

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$), N= 8 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni

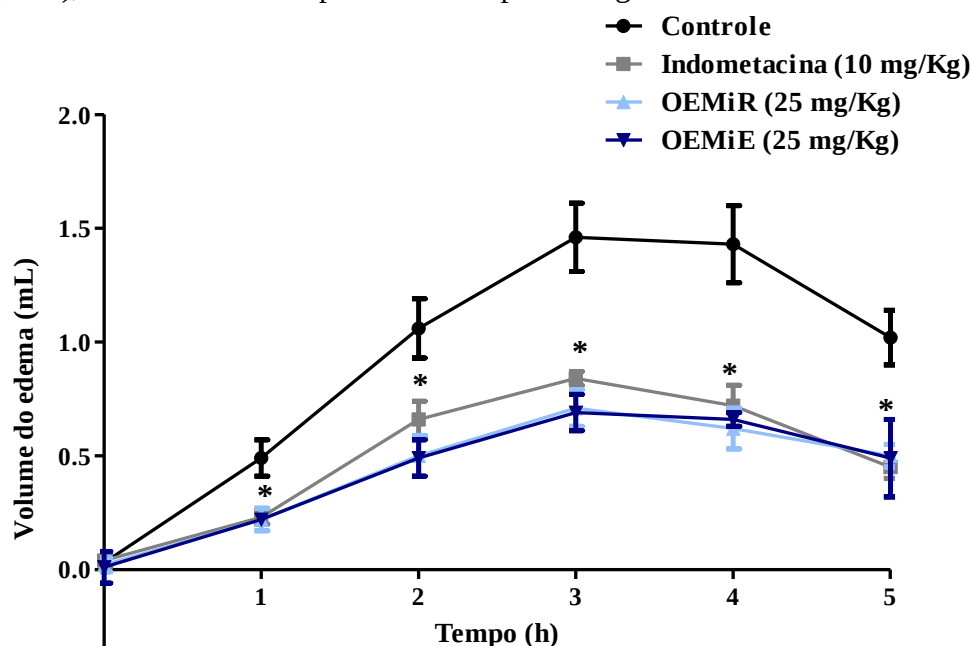
Estudos realizados por DAS (1998), descrevem a diferença entre os métodos de bolsa de ar e peritonite induzida por carragenina. No método do bolsa de ar, os neutrófilos são o tipo de célula em maior abundância. Estes são responsáveis pela quimiotaxia. Na peritonite induzida pela carragenina existe uma quantidade elevada de macrófagos e mastócitos. Estas células são atraídas ao local da inflamação pelas citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β e TNF- α . De acordo

com os nossos resultados, podemos inferir que os óleos em estudo inibem a produção de mediadores por neutrófilos e macrófagos, uma vez que apresentaram ação nos testes do bolsão e peritonite, respectivamente.

5.5.3 Edema de pata induzido por carragenina

No teste do edema de pata induzido por carragenina os óleos essenciais das duas variedades de *M. indica* na dose de 25 mg/kg apresentaram redução do edema da 1ª a 5ª h (Figura 11). Quando analisados entre si, os óleos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

Figura 11. Efeito dos óleos essenciais OEMiR e OEMiE (25 mg/kg, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.



* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)
Análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni

Foi através do modelo de edema de pata induzido pela carragenina que pesquisadores da Merck, Sharp & Dohme demonstraram a atividade anti-inflamatória da indometacina. Portanto, esse modelo foi, e continua sendo importante para o desenvolvimento de novas drogas com potencial anti-inflamatório (MORRIS, 2003).

A inflamação induzida pela carragenina é um processo agudo, altamente reproduzível e bem estudado. O desenvolvimento do edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória (GUZZO et al., 2008). Na fase inicial (1-2 h) ocorre liberação de histamina, serotonina, bradicinina e citocinas que desencadeiam a formação do edema e estes mediadores contribuem fortemente com a migração celular, principalmente de neutrófilos para o sítio inflamatório. A fase posterior (3-5h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de NO (MORRIS, 2003; POSADAS et al., 2004).

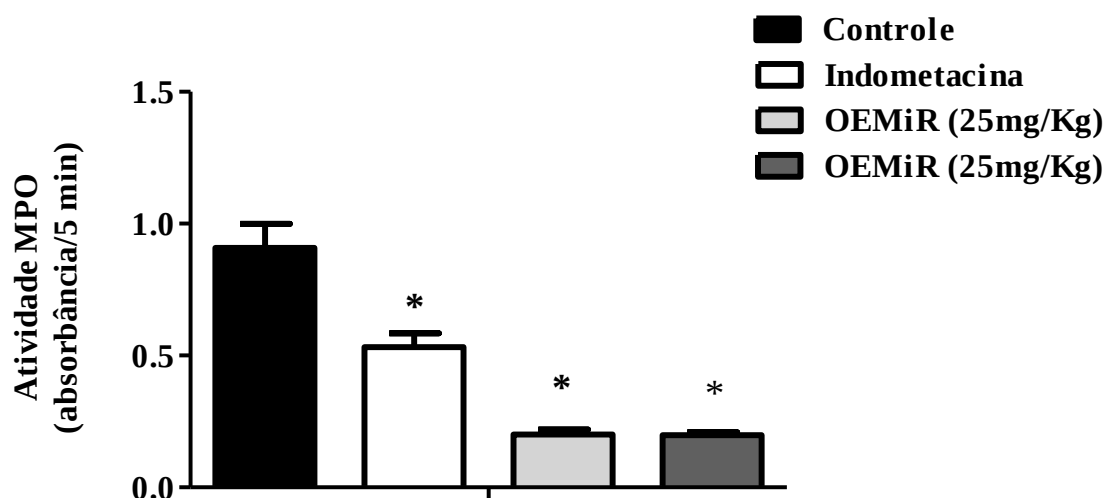
Com base nos resultados do teste de edema de pata, pode-se sugerir que o efeito anti-inflamatório apresentado pelos óleos, pode está associado com a redução de mediadores pró-inflamatórios tanto da fase inicial como da segunda fase, uma vez que eles reduziram o edema até a quinta hora.

5.5.3.1 Atividade da Mieloperoxidase

A infiltração neutrofílica no teste do edema de pata induzido por carragenina foi avaliada através da quantificação da mieloperoxidase (MPO), enzima esta presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, cuja função é promover a formação de espécies reativas de oxigênio auxiliando na destruição de agentes patogênicos (ARNHOLD, 2004).

Os óleos OEMiR e OEMiE apresentaram diminuição significativamente a atividade da MPO em relação ao grupo controle (Figura 12). Esta redução na atividade na MPO indica uma redução na migração de neutrófilos para o local da inflamação, corroborando assim com os resultados encontrados no teste do bolsão. Arnhold (2004) associou a atividade da MPO com o número de neutrófilos, uma vez que a mieloperoxidase sendo um produto dos grânulos dos neutrófilos, é considerada um marcador de infiltração destas células no local da inflamação.

Figura 12: Efeito dos óleos essenciais sobre a produção de MPO no tecido plantar dos animais submetidos ao edema de pata (média $\pm$ DP).



* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)
Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni

5.5.4 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético

Observou-se que nos animais tratados com OEMiR e OEMiE houve uma redução significativamente da permeabilidade vascular em relação ao grupo controle. Os óleos apresentaram inibição da permeabilidade similar à indometacina. Entre si os óleos não apresentaram diferença significativa (Figura 13). O efeito dos óleos sobre a redução da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético provavelmente envolve a diminuição na liberação de aminas vasoativas, com conseqüente redução do edema.

Figura 13: Efeito dos óleos essenciais no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético (média $\pm$ DP).



* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)

Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni

5.6 Atividade Antinociceptiva

5.6.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Os resultados da atividade antinociceptiva dos óleos essenciais estão demonstrados na Tabela 7. Os óleos essenciais OEMiR e OEMiE, nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg causaram redução significativa no número de contorções abdominais em comparação ao grupo controle.

Tabela 7: Efeitos dos óleos essenciais sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Nº de contorções (nº/20min)	Inibição (%)
Controle	-	83,5 $\pm$ 4,82	-
Indometacina	10	24,9 $\pm$ 1,95	67,4
OEMiR	12,5	50,5 $\pm$ 1,41*	33,7
	25	44,0 $\pm$ 2,23*	42,3
	50	32,0 $\pm$ 3,03*	58,0
OEMiE	12,5	42,5 $\pm$ 4,72*	44,2
	25	41,0 $\pm$ 4,08*	53,0
	50	31,2 $\pm$ 3,36*	59,1

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)

OEMiR – óleo essencial *M. indica* var. Rosa e OEMiE – óleo essencial *M. indica* var. Espada.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, apesar de simples e pouco específico, é de fácil observação além de apresentar boa sensibilidade aos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais, bem como substâncias semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente (KOSTER et al., 1959; IKEDA et al., 2001; Le BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Além disso, os resultados obtidos com várias classes de fármacos analgésicos, neste ensaio, mostram boa correlação com a ação analgésica em outros estudos pré-clínicos (SIEGMUND; CADMUS; LU, 1957; COLLIER, et al., 1968).

O ácido acético age liberando mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos, provocando em camundongos, a nível peritoneal, um aumento nos níveis de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, serotonina, histamina, assim como liberação de bradicinina e citocinas, como $TNF-\alpha$ e IL-8 (DERAEDT et al., 1980; RIBEIRO et al., 2000). A aplicação do ácido ocorre de modo a provocar comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incordenação da atividade motora (Le BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Neste estudo, os óleos foram capazes de reduzir as contorções em todas as doses testadas. Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférica, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias também inibem as contorções como: hipotensores, depressores e estimulantes do sistema nervoso e anti-histaminicos (Le BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Portanto, a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético, deve ser conduzida de forma cautelosa e levando-se em consideração os resultados de outros testes.

Devido a pouca especificidade da resposta antinociceptiva desse modelo experimental e visando direcionar o estudo do mecanismo da ação antinociceptiva foram necessários outros, como o da formalina e placa quente para o direcionamento dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo.

5.6.2 Teste da Formalina

Os óleos essenciais OEMiR e OEMiE foram capazes de diminuir o tempo que os animais passaram lambendo a pata injetada com formalina durante as duas fases em relação ao grupo controle (Tabela 8). O efeito produzido na primeira fase foi semelhante à morfina para as doses de 12,5 e 25 mg/kg (OEMiR) e 50 mg/kg (OEMiE).

Tabela 8: Efeito dos óleos essenciais do látex de *M. indica* var. Espada e Rosa no teste da formalina em camundongos.

Tratamento		1ª fase	Inibição (%)	2ª Fase	Inibição (%)
Control	-	90,0±9,1	-	112,9±14,9	-
Morfina	2,5	36,5±7,8*	70,0	21,0±0,8*	81,4
OEMiR	12,5	37,1±3,8*	58,8	66,1±6,9*	41,5
	25	38,0±3,9*	57,8	67,6±5,7*	40,2
	50	29,0±2,5*	67,8	83,0±4,3*	26,4
OEMiE	12,5	48,2±4,4*	46,5	76,4±6,6*	32,3
	25	50,7±5,2*	43,7	69,0±2,8*	38,8
	50	33,6±3,2*	62,7	77,8±6,6*	31,0

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$)

OEMiR – óleo essencial *M. indica* var. Rosa e OEMiE – óleo essencial *M. indica* var. Espada.

O teste da formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de substâncias analgésicas, sendo utilizado no esclarecimento dos possíveis mecanismos do efeito antinociceptivo. Este teste produz duas fases distintas de nocicepção: a fase 1, neurogênica (através da estimulação direta dos neurônios nociceptivos) é iniciada logo após a injeção da formalina e transcorre durante 5 minutos subsequentes a aplicação da formalina. Esta fase é caracterizada pela dor de origem neurogênica devido à estimulação direta de terminações nociceptivas aferentes (tipo C e Aδ). Respostas positivas, através da redução do tempo de lambida da pata, indicam participação de mediadores periféricos como histamina, serotonina, bradicinina e substância P. Nesta fase uma redução da resposta à dor pode ocorrer também pela atuação através da liberação de glutamato e também da substância P na medula. Drogas anti-inflamatórias

esteroidais e não-esteroidais parece não afetar esta fase enquanto que a administração de agonistas opióides como a morfina pode inibir a resposta nociceptiva (HUNSKAAR; HOLLE, 1987).

A fase 2, conhecida como dor de origem inflamatória, inicia-se após 15 minutos da indução da dor pela formalina e permanece durante os 45 minutos subsequentes. Esta fase está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina, prostaglandinas e também bradicinina. Esta fase pode ser inibida por medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais como a aspirina, indometacina, dexametasona e também pelos analgésicos opióides (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Drogas anti-inflamatórias esteroidais e não-esteroidais parece não afetar a primeira fase do teste. Entretanto, drogas de ação central como os narcóticos são capazes de inibir ambas as fases (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

5.6.3 Teste da Placa Quente

No teste da placa quente, os animais tratados com ambos os óleos OEMiR e OEMiE aumentaram o tempo de reação ao estímulo térmico no tempo de 60 – 180 segundos, apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle para todas as doses testadas, apenas nos tempos de 120 e 180 segundos. O grupo tratado com o fármaco padrão morfina (2,5 mg/kg), opióide de ação central, apresentou elevação significativa no tempo de reação ao estímulo térmico nociceptivo, ao longo do experimento (Tabela 9).

Tabela 9: Tempo de latência ao estímulo térmico no teste da placa quente após tratamento oral com os óleos essenciais (média $\pm$ desvio padrão).

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Tempo de Latência (seg)			
		0	60	120	180
Controle	-	7,8 $\pm$ 0,4	8,7 $\pm$ 0,9	8,4 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,4
Morfina	2,5	7,9 $\pm$ 0,3	10,2 $\pm$ 1,3*	15,1 $\pm$ 1,5*	18,6 $\pm$ 1,6*
OEMiR	12,5	7,6 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,5	11,5 $\pm$ 0,5*	14,2 $\pm$ 0,4*
	25	7,9 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,5	11,7 $\pm$ 0,5*	14,5 $\pm$ 0,5*
	50	8,4 $\pm$ 0,5	9,8 $\pm$ 0,6*	11,6 $\pm$ 0,5*	14,8 $\pm$ 0,6*
OEMiE	12,5	8,2 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 0,7	10,9 $\pm$ 1,1*	13,7 $\pm$ 0,5*
	25	8,6 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 0,5	12,3 $\pm$ 1,2*	14,0 $\pm$ 0,5*
	50	7,9 $\pm$ 0,8	9,1 $\pm$ 0,9	10,5 $\pm$ 1,1*	13,8 $\pm$ 0,6*

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle: (p < 0,05)

OEMiR – óleo essencial *M. indica* var. Rosa e OEMiE – óleo essencial *M. indica* var. Espada

O teste da placa quente caracteriza-se como um modelo animal para avaliação do perfil de atuação de fármacos com atividade analgésica. As respostas comportamentais exibidas pelos animais neste ensaio, lambes as patas e pular, são de nível supra-espinhal, sendo, portanto utilizado predominantemente para verificação da atividade de fármacos que atuem no sistema nervoso central, como fentanil e morfina, que promovem o aumento do tempo de latência na resposta nociceptiva para verificação do efeito antinociceptivo central (LOH et al. 1976; LEVY; PROUDFIT, 1977; Le BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; RINALDI et al., 2009).

No ensaio da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (MOGIL; ADHIKARI, 1999).

Em concordância com os resultados obtidos no teste de formalina, o teste da placa quente mostrou que os óleos promoveram o aumento do tempo de latência dos animais submetidos ao estímulo térmico. Estes resultados, portanto indicam que os óleos estudados possuem atividade antinociceptiva a nível central e periférico.

6. *CONCLUSÃO*

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Foi possível caracterizar 22 componentes no OEMiE e 24 componentes no OEMiR.
- Os óleos essenciais OEMiE e OEMiR em estudo apresentaram baixa toxicidade oral com valores de DL_{50} acima de 5000 mg/kg.
- O OEMiR apresentou moderada atividade citotóxica enquanto que OEMiE apresentou alta atividade citotóxica frente a todas as linhagens tumorais testadas. Ambos demonstraram ser mais efetivos em relação a linhagem HL-60.
- Os óleos essenciais apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* se mostraram mais tóxicos para o parasita do que para as células de mamíferos (macrófagos).
- Os óleos essenciais de *M. indica* var. Rosa e Espada apresentaram atividade anti-inflamatória significativa, reduzindo a migração celular, a permeabilidade vascular e formação do edema de pata induzidos por carragenina.
- A atividade anti-inflamatória parece estar relacionada à redução dos níveis de citocinas ($TNF-\alpha$, $IL-6\alpha$ e $IL-1\beta$) e NO nos exsudatos inflamatórios.
- Os óleos essenciais de *M. indica* var. Rosa e Espada apresentaram atividade antinociceptiva promissora nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético, formalina e da placa quente, sugerindo que esta atividade está relacionada tanto a efeitos no sistema nervoso central quanto periférico.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders; 2000. 553 p.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para a condução de Estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES> (acessado Março 2011).

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. et al. Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 20(4): 615-620. 2010.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v.1000, n. 1-2, p. 40-56. 2004.

ALWALA, O. J. et al. Characterization and evaluation of repellent effect of essential oil of *Mangifera indica* L. from Kenya. **Journal Essential Oil-bearing Plants**. v. 13, n. 1, p. 85-96. 2010.

ANDRADE, H. H. A.; MAIA, J. G. S.; ZHOGHBI, M. G. B. Aroma Volatile Constituents of Brazilian Varieties of Mango fruit. **Journal of food Composition and Analysis**. v. 13, n. 1, p. 27-33. 2000.

ANSARI, S. H. et al. Characterization of volatile constituents of mango ‘Qalmi’ (*Mangifera indica* L.) fruit. **Journal Essential Oil**. v. 16, n. 5, p. 417-419. 2004.

ARAUJO, D.; ONOFRE, S. Ação do extrato hidroalcolico de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt. (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. v. 6, n. 1, p. 1-8. 2011.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **BioEssays**. v. 28, n. 3, p. 253–260. 2006.

ARNHOLD, J.. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**. v. 69, n. 1, p. 4-9, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446–475. 2008.

BALLY, I. S. E. **Mangifera indica (mango)**, ver. 3.1. In: Elevitch, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. 2006.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitoria: Edufes, 624p. 2008.

BARKSBY, H. E. et al. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 149, n. 2, p. 217-225, 2007.

- BARROS, C. D. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.18, n. 11, p.3805-3811. 2010.
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatorios Nao Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cerebro-Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**. v. 94, n. 4, p. 556-563. 2010.
- BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Reviews Cancer**. v. 6. n. 2, p. 107-116. 2006.
- BELTRÁN, A. E. et al. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). **European Journal of Pharmacology**. v. 499, p. 297– 305. 2004.
- BLOEMEN, K. et al. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunology Letters**. v. 113, n. 1, p. 6-18. 2007.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, p.618–622. 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Brasília, DF, 2001. 120 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília, DF, 2011. 126 p.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde. Brasília, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2013.
- BRITO, A. R. M. S. Manual De Ensaio Toxicológicos In Vivo. Ed. Unicamp, Campinas (Brazil), 1994. p.122.
- BURT, S. A. et al. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal of Food Protection**. p. 919–926. 2005.
- CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Médica**. v. 72, p. 311–316. 2006.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 3, p. 37-39. 2003.
- CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**. v. 1, n. 3, p. 25-31, 1979.
- CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, n.2, p. 362-367. 2008.

- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p. 1914–1920. 2002.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, 2004.
- CASTRO NETO, M. T. de. Aspectos fisiológicos da mangueira sob condições irrigadas. In: Informações técnicas sobre a cultura da manga no semi-árido brasileiro. Petrolina: CPATSA-EMBRAPA, p.83-99, 1995.
- COLLIER, H. O. et al The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.
- CORREIA, S. J., DAVID, J. P., DAVID J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1287-1300. 2006.
- COSTA, O. A. Brazilian Plants With Hypoglycemic Effects. **Leandra**. n. 7, p.63-75. 1977.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **Journal Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1-2, p.72-79. 2005.
- CRAVO, A. B. Frutas e ervas que curam: usos, receitas e dosagens. Ed. HEMUS. São Paulo. 1995. p. 140.
- CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19 (2A): 403-411, 2009.
- DAMAS, J. et al. Kinins and Peritoneal Exudates Induced By Carrageenin And Zymosan In Rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 101, n. 2, p.418-22, 1990.
- DAS, A.M., Flower, R.J., Perretti, M., 1998. Resident mast cells are important for eosinophil accumulation in vivo. **Journal of Leukocyte**. v. 64, p. 156–162, 1998.
- DAUDT, A.W. et al. Opioides no manejo da dor — uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.44, n. 2, p. 106-110. 1998.
- De MEDEIROS, M. D. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**. 60, 237–241. 2011.
- DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an allergic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24. 1980.
- Di PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 2745–2749. 2006.
- Di STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo – SP: Ed UNESP. 1996. p. 100.

- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. LI dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. v.107, p.385-393. 1953.
- EIADTHONG, W. et al. Analysis of phylogenetic relationships in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA. **Agriculture, Biology & Environmental Sciences**. v. 80, n. 3-4, p. 145-155. 1999.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-23. 2007.
- FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**. v. 2, p. 12-26. 1997.
- FIORUCCI, S. et al. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biomechanical Pharmacology**. v. 62, p. 1433. 2001.
- FLECK, J. Câncer - Integração clínico biológico. Ed. Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, 1992.
- FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência** (UNICAMP), v. 7, 2006.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**. v. 8, n. 2, p. S3. 2006.
- GARRIDO, G. et al. Analgesic and Antiinflammatory Effects of *Mangifera indica* L. Extract (Vimang). **Phytotherapeutic Research**. v. 15, p. 18–21. 2001.
- GARRIDO-SUÁREZ, B. B. et al. A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin. **Molecules**. v. 15, n. 12, p. 9035-45. 2010.
- GAULDIE, J. et al. Interferon γ /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 7251-7255. 1987.
- GIUSTARINI, D. et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**. v. 440, p. 361-380. 2008.
- GOMES, R. N. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care**. v.11, n. 2, p.R49. 2007.
- GOMES, A. et al. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology** v, 78, p. 171–177. 2009.
- GUARRERA, M. P. Traditional Phytotherapy in central Italy. **Fitoterapia**. v. 76, p.1-25. 2005.
- GUERRA, A. S. H. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. v. 11, n. 11, p. 1816-1822. 2011.

GUZZO, L. S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 116, p. 120–124. 2008.

HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 161, p. S25–S31. 2000.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**. v. 72, p. 480–482. 2006.

HOLBECK, S. L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**. v. 40, p. 785–793. 2004.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103–104. 1987.

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

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf> . Acesso em: 4 de jan de 2013.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 4 de maio de 2013.

IPEK, E. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*. v. 93, p. 551–556. 2005.

IRWIN, S. Comparative observacional assessment: I. a. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacology**. v. 13, n. 3, p.222–257. 1968.

JOHN, K. S. et al. Characterization of aroma components of saps from different Indian mango varieties. **Phytochemistry**. v. 52, p. 891–894. 1999.

KEIL, H.; WASSERMAN, D.; DAWSON, C. R. Mango dermatitis and its relationship to poison ivy hypersensitivity. **Annals of Allergy**. v. 4. p. 825. 1946.

KIM, J. Y. et al. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Carrageenan-Induced Inflammation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, p.858–864. 2006.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**. v. 13, n.1, p.1–12. 2008.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**. 1, p. 118–119. 1989.

KOPF, A.; BANZHAF, A.; STEIN, C. Perioperative management of the chronic pain patient. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 19, n. 1, p. 59–76. 2005.

- KOSTER, R., ANDERSON, M., De DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeding**. v. 18, p. 412-418. 1959.
- KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Proinflamatorias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 46, n.3, p. 199-206. 2006.
- LARSEN, G. L.; HOLT, P. G. The concept of airway inflammation. **American Journal. Respiratory and Critical Care Medicine**. v.162, p. S2-S6. 2000.
- Le BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, n. 4, p. 597-652. 2001.
- LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **American Journal of Physiology**. v. 258, n. 3, p. 798-R803. 1990.
- LEVAL, X. et al. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. **Current Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 10, p. 1041-1062. 2000.
- LEVY, R. A.; PROUDIT, H. K. The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 202, p. 437-445. 1977.
- LIEBERMAN, P. Histamine, antihistamines, and the central nervous system. **Allergy Asthma Proceedings**. v.30, n.5, p. 482-6. 2009.
- LOH, H. H. et al. Beta-endorphin is a potent analgesic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 73, p. 2895-2898. 1976.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum. 2002. p. 49-59.
- LOVEYS, B. R. et al. Mango Sapburn: Components of Fruit Sap and Their Role in Causing Skin Damage. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 19, p. 449-457. 1992.
- LYKBE, A. M. J.; CUMMINGS, R. Inflammation in healing. 1. Time – course and meditation of exsudation in wound healinh in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 50, p. 309-318, 1969.
- MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? **Neuroscience Letters**. v. 437, n. 3, p. 165–169. 2008.
- MACEDO, I. T. et al. Anthelmintic effect of Eucalyptus staigeriana essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**. 173, 93–98. 2010.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of Mangifera indica L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, p. 133–137. 2001.
- MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evalution. In: New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity, ed. By H. Wagner and P. Wolf, **Springer-Verlag**, Berlin, p. 24-53. 1977.

- MARANCA, G. **Fruticultura comercial, manga e abacate**. 2^a. ed. São Paulo: Nobel S. A, 1976. p. 138.
- MARTINS, E. R. **Plantas medicinais**, 2^a. ed. Belém – PA: Editora CEJUP, 1989. p. 15-40.
- MEDEIROS, M. G. F. et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**. V. 60(3), p. 237-241. 2011.
- MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of essential Oils: A Short Review. **Molecules**. v. 15, p. 9252-9287. 2010.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57, p. 1-164. 1999.
- MOGIL, J. S.; ADHIKARI, S. M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **Journal of Neuroscience**. v. 19, p.21-25. 1999.
- MORFFI, J. et al. Antimutagenic Properties of *Mangifera indica* L. Stem Bark Extract and Evaluation of its Effects on Hepatic CYP1A1. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 67, n. 3, p. 223-228. 2012.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, 2003. p. 115-121.
- MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63. 1983.
- NAKAMURA C.V. et al. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16 (1): 61-66, 2006.
- OJEWOLE, J. A. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. v. 27, n. 8, p. 547-54. 2005.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. ed. 2^a. São Paulo: Editora Atheneu. 1997.
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation**. v. 31, n.1, p.36-46. 2008.
- OLSEN, T. et al. Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 42, n. 11 p.1312-1320. 2007.

Organização Mundial da Saúde. **Control f the leishmaniasis**. Geneve, 2010. Technical Report Series, n. 949.

Organização Mundial da Saúde. **Cancer**. 2013a. Disponível em : <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em: 10 jan. 2013a.

Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis: Fact sheet**. Geneve, 2013b. Technical Report Series, n.375. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

OTOGURO, K. et al. In vitro antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**. 72, 2024–2030. 2011.

PANTHONG, A. et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana* Pierre. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, p. 237–242, 2004.

PARDO-ANDREU, G. L. et al. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. **Pharmacology Research**. v. 57, p. 79-86. 2008.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**. v. 28, p. 2375-2382. 2000.

POSADAS, I. et al. Carrageenan induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, p. 331–338. 2004.

PRUEFER, D.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Homocysteine provokes leukocyte endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. **General Pharmacology**. 33, p.487-498. 1999.

RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Anti-enteric bacterial activity and phytochemical analysis of the seed kernel extract of *Mangifera indica* Linnaeus against *Shigella dysenteriae* (Shiga, corrig.) Castellani and Chalmers. **Asian Pac J Trop Med**. v. 4, n. 4, p. 294-300. 2012.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**. São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAVEN, P. R.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 738.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global prespective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13. 2003.

RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE DO SUS. Disponível em < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf> >. Acesso em: 02 jan. 2013.

REY, L. Leishmaníases cutâneas e mucocutâneas do Novo Mundo. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010 , p. 62 – 74.

- RIBBONS, K. A. et al. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. v. 280, p. 1008-1115. 1997.
- RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 387, n. 1, p. 111-118. 2000.
- RINALDI, S. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, n. 3, p. 541-546. 2009.
- ROCHA, A. P. C. et al. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, 94-105. 2007.
- ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**. v 48, p. 601-606. 2003.
- ROTHHAMMER, T, BOSSEHOFF, A. K. Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell Research**. v. 20, n. 2, p. 92-111. 2007.
- SAIRAM, K. et al. Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 84, p. 11-15. 2003.
- SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 90, n. 15, p. 7240- 7244. 1993
- SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced brat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 118, n. 4, p. 829- 838. 1996.
- SÁNCHEZ, G. M. S. et al. Protective effects os *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. **Pharmacological Research**. v. 42, n. 6, p. 565-573. 2000.
- SANJITA, D.; DINAKAR, S.; SAUMYA, P. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of arbortristoxide-A. **Journal Ethnopharmacology**. v. 116, p. 198–203. 2008.
- SANTORO, G. F. et al. Antiproliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**. 134, p. 1649–1656. 2007.
- SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. p. 104, 475–483. 2010.
- SANTOS, F. A. Atividade antibacteriana antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium Guyanense* PERS. *Psidium pohlianum* BERG. 1997. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SASAKAWA, T. et al. FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor secretion from peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**. v. 29, n. 2, p. 67-71. 2005.

SCHELZ, Z.; HOHMANN, J.; MOLNAR, J. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. In: Chattopadhyay, D. (Ed.), *Ethnomedicine: a Source of Complementary Therapeutics*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 281–304. 2010.

SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Is mPEGS-1 a promising target for pain therapy? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 27, n.8, p. 399-401. 2006.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A. Comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**. v. 18, n. 3-4, p.439-46. 1986.

SELLÉS, A. J. N. et al. Isolation and Quantitative Analysis of Phenolic Antioxidants, Free Sugars, and Polyols from Mango (*Mangifera indica* L.) Stem Bark Aqueous Decoction Used in Cuba as a Nutritional Supplement. **Journal of Agriculture Food Chemistry**., v. 50, p. 762–766. 2002.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**. v. 30, p. 69-95. 2004.

SHAFIEE, A. et al. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2-pyrazolines in mouse writhing test. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 3, p. 360-362. 2003.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Review**. v. 3, p. 701-708. 2003.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**. v. 259, p. 2201–2222. 1995.

SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Society Experimental Biology and Medicine**. v. 95, p. 729. 1957.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**. v. 38, n. 1, 2008.

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. 7ª. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1971. p. 530.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1ª. ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005. p. 640.

SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**.v. 8,90(2), p. 94-99. 2008.

STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**; 5ª. ed. São Paulo – SP: Ed UNESP, Capítulo 8 Alba Regina M. Souza Brito. 1996. p. 100.

STEFLITSCH, W.; STEFLITSCH, M. Clinical aromatherapy. **Journal of Men's Health**. v. 5, n. 1, pp. 74-85. 2008.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In: Methods in Plant Biochemistry. Hostettmann, K. (Ed.). Vol. 6. Acad. Press, London, 71-133. 1991.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**. v. 11, p. 971-981. 2005.

SZABÓ, M. V. R. S.; BECHARA, G. H.; CUNHA, F. Q. Efeito inibitório da acupuntura sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 21, n. 1, p. 91-95, 2005.

TAING, M. W. et al. Mango fruit peel and flesh extracts affect adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Food Function**. v. 3, n. 8, p. 828-836. 2012.

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

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 43, p. 587-595. 2013.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, n. 1, p. 5–17. 1992.

TONET, A. C. et al. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. **Brazilian Journal Medical Biobical Research**. v 41(1), p. 47-53. 2008.

TSAO, P. S. et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. **Circulation**. 89, p.2176-2182. 1994.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 38, p. 97–120. 1998.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, n.3, p. 519-528. 2005.

VERCESI, A. E. et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**. v. 17, p. 43–52. 1997.

VYKLICKY, L. Techniques for the study of pain in animals. **Advances in Pain Research and Therapy**. v. 3, p.727–745, 1979.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n.5, p. 1362-1370. 2010.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**. v. 22, p.246–253. 1964.

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

WOOLF, C. J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**.v. 140, p. 441-451. 2004.

WONG, M. M.; FISH, E. M. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**. v. 15, p. 5-14, 2003.

ZHANG, X.; CAO, J.; ZHONG, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells Naunyn-Schmied. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 379, p. 581–586. 2009.