

LUCIMARI ROMANA DIPE DE FARIA

**Validação farmacológica do óleo essencial de
Rosmarinus officinalis L. (alecrim) –atividades
antiinflamatória e analgésica.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

UNIFENAS

Alfenas-MG

2005

LUCIMARI ROMANA DIPE DE FARIA

**Validação farmacológica do óleo essencial de
Rosmarinus officinalis L. (alecrim) –
atividades antiinflamatória e analgésica.**

Dissertação apresentada à UNIFENAS,
como parte das exigências do Mestrado
em Ciência Animal para obtenção do
Título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

UNIFENAS

Alfenas-MG

2005

FARIA, Lucimari Romana Dipe de

Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) : atividades antiinflamatória e analgésica / -- Lucimari Romana Dipe de Faria. – Alfenas : UNIFENAS,2005. 49 p.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade José do Rosário Vellano.

1.Rosmarinus officinalis L. (alecrim) 2. Antiinflamatório _
atividade

CDU: 615.015.4 (043)

LUCIMARI ROMANA DIPE DE FARIA

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ALECRIM) – ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA.

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADOR

1º EXAMINADOR

2º EXAMINADOR

Alfenas, 15 de Março de 2005.

DEDICATÓRIAS

Ao meu esposo, Antonio Paulo de Faria, parceiro e cúmplice em tudo que a vida oferece e, principalmente, nessa etapa que estamos concluindo.

Aos meus filhos, Paulo Antonio e Henrique, que sempre me incentivaram e perdoaram minhas ausências.

Aos meus pais e familiares, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

A Aloísio Bernardes de Faria, Pedro Bernardes Filho, Zélia Maria Ribeiro Faria e Maria Elizabeth de Oliveira, hoje na Graça de Deus, por sempre demonstrarem confiança em meu desempenho e me estimularem para que levasse adiante minhas pesquisas. “Deus seja louvado!”

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou possível concretizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, que me orientou, sendo um exemplo de pesquisador devotado e competente.

Aos professores e coordenadores do curso de Ciência Animal, que me ensinaram lições de vida e não apenas conteúdos.

Aos colegas de curso, companheiros e amigos, presentes nos momentos alegres e nos momentos difíceis que atravessamos.

Ao pessoal do Laboratório de Fitofármacos, Luiz Gustavo, Yris, Walkíria, Cida, Melissa, Guilherme, Haine, Lucimara e Érica, que tanto me auxiliaram nos experimentos e em todos os momentos, como verdadeiros amigos.

Ao João e Gentil, que sempre trataram os animais do Biotério da Universidade com competência e dedicação e que me apoiaram nos experimentos e nas dificuldades.

Aos funcionários da UNIFENAS pelo acolhimento e dedicação.

Ao Prof. Vinicius Vieira Vignoli, Prof. Paulo Roberto Corrêa Landgraf e Zélia Fernandes Ferreira Miranda, responsáveis pela revisão dessa dissertação.

A todas as pessoas que me apoiaram e acreditaram em mim, possibilitando a concretização desse trabalho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO _____	1
2	OBJETIVOS _____	2
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	3
3.1.	Estudos gerais sobre <i>Rosmarinus officinalis</i> L. _____	2
3.2	O processo inflamatório _____	8
3.3	Dor _____	15
3.4	Antiinflamatórios e analgésicos _____	17
4	MATERIAL E MÉTODOS _____	19
4.2	Material vegetal _____	19
4.3	Obtenção do óleo essencial _____	19
4.4	Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. _____	19
4.3.1.	Animais _____	19
4.3.2.	Determinação da dose letal média (DL ₅₀) _____	19
4.3.3.	Determinação da dose efetiva 50 (DE ₅₀) _____	20
4.3.4.	Edema de pata de rato _____	20
4.3.5.	Teste do granuloma _____	20
4.3.6.	Dermatite induzida pelo óleo de cróton _____	21
4.3.7.	Permeabilidade vascular em ratos _____	21
4.3.8.	Avaliação da atividade analgésica _____	22
4.3.8.1.	Contorções em camundongos _____	22
4.3.8.2.	Teste da formalina _____	23
4.3.8.3.	Placa quente em camundongos _____	23
4.4.	Teste para avaliação da potência em relação à lesão gástrica (lesões agudas induzidas por estresse) _____	24
4.5.	Análise estatística _____	25
5.	RESULTADOS _____	26
5.1.	Obtenção do óleo essencial _____	26
5.2	Determinação da dose letal média (DL ₅₀) _____	26
5.3.	Determinação da dose efetiva 50 (DE ₅₀) _____	30

5.4	Teste do granuloma_____	31
5.5	Dermatite induzida pelo óleo de cróton_____	32
5.6	Permeabilidade vascular em ratos_____	33
5.7	Teste da formalina_____	34
5.8	Placa quente em camundongos_____	35
5.9	Teste para avaliação da potência em relação à lesão gástrica (lesões agudas induzidas por estresse)_____	36
6	DISCUSSÃO_____	37
7	CONCLUSÃO _____	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADKI	Adenosinoquinase
AINE	Antiinflamatório não esteroidal
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butirato
BHA	t-butil hidróxi anisol
BL	Linha de base
COPs	Produto de oxidação do colesterol
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DE₅₀	Dose efetiva média
DEXAM.	Dexametasona
DL₅₀	Dose letal média
DO	Densidade óptica
EPM	Erro padrão médio
FARM. BRAS.	Farmacopéia Brasileira
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSV	Vírus da herpes simples
5 H-T	5-hidroxitriptamina (serotonina)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INOS	Forma induzida de óxido nítrico-sintetase
IP₃	Trifosfato inositol
ip	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeos
Lth	Linfócito T helper
MDA	Malondialdeído
% MPE	Porcentagem de efeito máximo possível
NGF	Nerve growth factor

NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
NO	Óxido nítrico
OERO	Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis L.</i>
PG	Prostaglandina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaciclina
pH	Potencial de hidrogênio
PMN	Nociceptores polimodais
RBF	Fluxo sanguíneo renal
SFC	Supercritical fluid chromatography
SFE	Supercritical fluid extraction
SNC	Sistema nervoso central
TL	Tempo de latência
TNF	Fatores de necrose tumoral
TGF-β	Fator de crescimento transformador Beta
UV	Ultravioleta
v. o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1. Efeito da administração (p.o.) de OERO (50, 100, 200 e 300 mg/Kg) em edema de pata de rato, induzido por injeção intraplantar de carragenina (1000 µg/pata)._____ 27
- Figura 2. Regressão linear do efeito da administração (v.o.) do OERO (50, 100, 200 e 300 mg/kg) sobre o edema de pata de rato, induzido pela injeção intraplantar de carragenina (1000 µg/pata)._____ 28
- Figura 3. Regressão linear do efeito da administração (v.o.) do OERO (10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg) sobre contorções induzidas por ácido acético 1% (i.p.) em camundongos. DE₅₀ = 261 mg/kg._____ 29
- Figura 4. Efeito da administração (p.o.) de OERO (10, 50, 100, 200, 300 e 400mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre contorções induzidas por ácido acético 1% (i.p.)._____ 30
- Figura 5. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg v.o.), dexametasona (0,5 mg/kg v.o), durante seis dias, sobre a formação do tecido granulomatoso._____ 31
- Figura 6. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg) e dexametasona (0,5 mg/kg), sobre o edema induzido por óleo de croton em camundongos_____ 32
- Figura 7. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o) e ciproeptadina (10 mg/kg, v.o), sobre a permeabilidade vascular induzida por histamina em ratos._____ 33

Figura 8. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o), indometacina (10mg/kg, v.o) e morfina (5 mg/kg, i.p), sobre a hiperalgesia induzida pela aplicação da formalina em camundongos. _____ 34

Figura 9. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o) e morfina (4 mg/kg, i.p), sobre o tempo de latência em teste de placa quente em camundongos _____ 35

Figura 10. Índice de analgesia do tratamento com OERO (300 mg/kg, p.o.) e morfina (4 mg/kg, i.p.) , em teste de placa quente. _____ 36

Tabela 1. Efeito da administração de OERO (300 mg/kg), indometacina (10 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.), sobre a incidência de lesões gástricas agudas, induzidas por estresse causado por restrição alimentar e imersão em água (17h). _____ 36

RESUMO

O *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) é muito utilizado na medicina popular. Este trabalho teve como objetivo estudar o óleo essencial desta espécie (OERO) em modelos inflamatórios e hiperalgésicos, *in vivo*, a fim de detectar o possível envolvimento de seus princípios ativos na resposta inflamatória, algésica e analisar o potencial ulcerogênico. Para tanto, foram utilizados os seguintes modelos experimentais: edema de pata de rato, teste do granuloma, permeabilidade vascular, eritema de orelha por óleo de croton, teste de contorções em camundongos, teste da formalina, placa quente e úlcera gástrica por estresse. O rendimento do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* foi de 1,4%. Em ratos e camundongos, com a administração das doses (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 mg/kg) por via oral (v. o.), não foi possível determinar a dose letal média (DL₅₀). Com as doses de 50, 100, 200, e 300 mg/kg, v. o., sobre o edema de pata de rato, o OERO produziu efeito dose-dependente, cujo coeficiente de correlação linear obtido foi $r = 0.9986$ ($y = -13,93 X + 0,30$) e a DE₅₀ determinada foi de 212 mg/kg. No teste de contorções em camundongos, as doses do OERO de 10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg, v. o., produziram efeito dose-dependente com coeficiente de correlação de $r = 0,93095$ ($y = 30,54x + 0,073$), e DE₅₀ de 261 mg/kg. A administração diária de 300 mg/kg, v. o., do OERO, durante 6 dias, inibiu a formação do tecido granulomatoso em 59% ($p < 0,001$, teste “t” de Student). No eritema de orelha por óleo de croton, o OERO na dose de 300 mg/kg, v. o., provocou efeito inibitório significativo de 77% ($p < 0.05$). No teste de permeabilidade vascular, o tratamento por via oral com o OERO, antagonizou a resposta à histamina, inibindo a permeabilidade vascular em 50% ($p < 0.05$, teste “t” de Student). O tratamento com o OERO (300 mg/kg, v.o) produziu inibição de 40% ($p < 0.05$, teste “t” de Student) da fase I do processo hiperalgésico induzido por formalina, enquanto a inibição da fase II foi de 48%. No teste de placa quente, o OERO (300 mg/kg, v.o.) produziu tempos de latência maiores que os tempos basais. Entretanto, tal diferença não foi significativa. No ensaio de úlcera gástrica, o grupo tratado com o OERO inibiu em 44% o número de lesões gástricas por estresse quando comparado ao grupo controle. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que o OERO apresenta atividade antiinflamatória, sobre os processos inflamatórios agudo e crônico, e

atividade analgésica. Entretanto, provoca pouca interferência danosa sobre a mucosa gástrica.

Palavras – chave: *Rosmarinus officinalis*, óleo essencial, antiinflamatório, analgésico.

**Pharmacological validation of the essential oil from *Rosmarinus officinalis L.*
(rosemary) – antiinflammatory and analgesic activities**

ABSTRACT

The *Rosmarinus officinalis L.* (rosemary) is widely used in popular medicine. The objective of this paper was to study the essential oil of this species (ROEO) on inflammatory and hyperalgesic models *in vivo*, in order to detect the possible involvement of its active principles on the inflammatory and analgesic responses, and analyze its ulcerogenic potential. The following experimental models were used: rat paw edema, granuloma test, vascular permeability, ear erythema by croton oil, writhing test in mouse, formalin test, hot plate, and gastric ulcer by stress. The yield of the essential oil extracted by hydrodistillation of the aerial parts from *Rosmarinus officinalis* was 1.4%. With the oral administration, in rats and mice, of the doses (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, and 5000 mg/kg), it was not possible to determine the median lethal dose (LD₅₀). With the oral doses of 50, 100, 200 and 300 mg/kg on the rat paw edema, the ROEO produced dose-dependent effect, of which the lineal correlation coefficient was $r = 0.9986$ ($y = -13.93 \times + 0.30$), and the median effective dose (ED₅₀) was 212 mg/kg. In the writhing test in mice, the oral doses of ROEO – 10, 50, 100, 200, 300 and 400 mg/kg – produced dose-dependent effect with a correlation coefficient of $r = 0.93095$ ($y = 30.54 \times + 0.073$), and ED₅₀ of 261 mg/kg. The daily administration of ROEO (300 mg/kg, orally) for 6 days inhibited the granulomatous tissue formation in 59% ($p < 0.001$, Student “t” test). In the ear erythema by croton oil, the ROEO, in the oral dose of 300 mg/kg, provoked the significant inhibitory effect of 77% ($p < 0.05$). In the vascular permeability test, the oral treatment with ROEO antagonized the response to histamine, thus inhibiting the vascular permeability in 50% ($p < 0.05$, Student “t” test). The oral treatment with ROEO (300 mg/kg) inhibited phase I of the hyperalgesic process by formalin in 40% ($p < 0.05$, Student “t” test), while phase II was inhibited in 48%. In the hot plate test, ROEO (300 mg/kg, orally) produced more latency times than basal times; the difference, however, was not significant. In the gastric ulcer trial, the ROEO-treated group inhibited in 44% the number of gastric lesions by stress when compared with

the control group. The results suggest that ROEO shows antiinflammatory activity in both acute and chronic inflammatory processes, exhibits analgesic activity and provokes little harmful interference on the gastric mucosa.

Key words: *Rosmarinus officinalis*; essential oil; antiinflammatory; analgesic.

1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal tem contribuído para a espécie humana como fonte de alimento, medicamento e cosmético desde tempos longínquos. Através de pesquisas científicas a utilização tem sido mais criteriosa. Porém muito ainda há por desvendar dos segredos da Fitoterapia (CARVALHO e ALMANÇA, 2003).

Conhecida em nosso país por alecrim, é uma planta oriunda da região mediterrânea da Europa e usada na culinária, medicina, beleza e magia. Também conhecido popularmente por alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarino e libanotis. Seu nome em latim, "*Rosmarinus*", significa "o orvalho que vem do mar", em alusão ao aroma abundante das praias mediterrâneas onde o alecrim crescia e se desenvolvia espontaneamente. A palavra "*officinalis*" significa que era uma planta reconhecida pela prática médico - herborista (MATOS, 2002).

É uma planta arbustiva, podendo atingir até dois metros de altura. Pertence à família Labiatae (Lamiaceae). Apresenta folhas opostas, pequenas, lineares, coriáceas, aromáticas, flores bilabiadas, lilás claro ou brancas. Muito utilizada na medicina popular. É perene, não sobrevivendo a invernos rigorosos e altos índices de pluviosidade, necessita de solos bem drenados e sol pleno (GEMTCHÚNICOV, 1976; BECKETT, 1988; LORENZI e MATOS, 2002).

O estudo taxonômico do alecrim classifica-o no reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, sub-classe *Asteridae*, ordem *Lamiales*, família *Lamiaceae*, gênero *Rosmarinus* e espécie *Rosmarinus officinalis* L. (JOLY, 1987).

A família Lamiaceae compreende mais de duzentos gêneros, com aproximadamente 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo, concentrando-se na região do Mediterrâneo e do Oriente próximo. Gêneros cujas espécies são usadas como condimento têm seu cultivo em destaque como *Hyptis* (erva-cravo), *Ocimum* (alfavaca), *Rosmarinus* (alecrim), *Mentha* (hortelã-pimenta), *Origanum* (manjeriço), *Basilicum* (basilicão), *Melissa* (erva-cidreira), entre outras. Estas e outras plantas dessa família são usadas na medicina popular, para extração do óleo essencial e em paisagismo (BECKETT, 1988).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar o óleo essencial da espécie *Rosmarinus officinalis* em modelos inflamatórios e hiperalgésicos *in vivo*, a fim de detectar o possível envolvimento de seus princípios ativos na resposta inflamatória, algésica e analisar o potencial ulcerogênico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estudos gerais sobre *Rosmarinus officinalis* L.

Como a maioria das espécies medicinais, foi trazida na época da colonização de origem mediterrânea, prefere solos pedregosos e sol pleno. Propaga-se melhor por estaquia de galhos. O estresse hídrico deve ser evitado, irrigando sempre que necessário. O cultivo de espécies aromáticas, como é o caso do *Rosmarinus officinalis*, e a obtenção de óleo essencial, têm se constituído em importante atividade econômica. Avalia-se a necessidade de cultivo de 500 mil hectares de espécies da família Lamiaceae para obtenção de óleo essencial. Em 1992 foi estimado o uso do *R. officinalis* em 295 toneladas, sendo a maior utilização na área alimentícia e em cosméticos. Tem sido utilizado na área da saúde, onde se encontra uma variedade de estudos com resultados eficazes. Em farmácias, como outras drogas vegetais ricas em óleos voláteis, é empregado *in natura* na preparação de infusões, sob forma de preparações galênicas, ou na aromatização de formas farmacêuticas destinadas para uso oral. São encontradas diterpenoquinonas com esqueleto do fenantreno, quando extraídas por clorofórmio, empregando-se maceração, percolação ou combinação de métodos extrativos. O isolamento e purificação de quinonas são realizados por cromatografia em coluna ou em camada delgada (LORENZI e MATOS, 2002; SIMÕES et al., 2003).

Na aromaterapia o *R. officinalis* é comumente usado para estimular a mente e a memória. Cita-se que estudantes utilizavam folha de alecrim no cabelo em dias de exame. Angioni et al. (2004) comprovaram a eficácia do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em aumentar o desempenho cognitivo de seres humanos saudáveis submetidos a uma bateria de testes cognitivos computadorizados, demonstrando que o impacto olfatório causado por esse óleo essencial realça significativamente a qualidade total da memória e dos fatores da memória secundária.

O óleo essencial é utilizado como tônico para o estresse, combatendo a apatia e a ansiedade. Estevez et al. (2004) analisaram a adição de óleos essenciais de sálvia (*Salvia fruticosa* L.) e alecrim comparada à adição de BHT quanto à composição total de compostos voláteis e ao índice de peroxidação e de vitamina C. Concluíram que a redução de peroxidação lipídica foi eficiente com adição de BHT, porém a adição dos óleos essenciais trouxe enriquecimento do sabor, além do efeito

antioxidante, sendo detectados 41 terpenos, incluindo alfa-pineno, beta-mirceno, cariofileno, linalol, cânfora e 1,8-cineol.

O *Rosmarinus officinalis* é empregado como fitoterápico. As partes utilizadas da planta são as folhas e sumidades floridas de onde é obtido o óleo essencial. Apresenta função adstringente, analgésica, anti-séptica, antiespasmódica, antiinflamatória, antioxidante, aromática, digestiva, estimulante, tônica e vasodilatadora. É utilizado na medicina popular como estimulante geral, hipertensor, estomáquico, anti-séptico pulmonar, béquico, carminativo, colagogo, colerético, emenagogo, antireumático e diurético. Tem aplicação tópica como estimulante do couro cabeludo, em cremes e loções analgésicas. É utilizada a tintura (10% a 20%) obtida dos folíolos para loções contra alopecia e o extrato glicólico (2% a 6%) em xampus para evitar queda de cabelo. Quando utilizado o pó, a indicação é de 2 a 4 gramas (CARVALHO e ALMANÇA, 2003).

Poderá ocorrer diferenciação na composição e na produção do óleo essencial, dependendo do subtipo (ecotipo) e da parte da planta que foi utilizada. Flamini et al. (2002) testaram dois ecotipos de *Rosmarinus officinalis*, a *cevoli* e a *lunigiana*, observando maior produção do óleo essencial na parte apical da planta e nas folhas. O ecotipo *cevoli* produziu maior quantidade de óleo essencial por possuir mais folhas e flores na parte apical. Constataram valores mais elevados de 1,8 cineol no ecotipo *lunigiana* e de alfa-pineno no ecotipo *cevoli*.

A alteração da composição e distribuição dos princípios ativos do *Rosmarinus officinalis*, assim como o caminho geral da biossíntese desses compostos, foi proposta por Del Bano et al. (2004). Os flavonóides eriocitrina, luteolina 3'-O-beta-D-glucuronídeo, hesperidina, diosmina, isoscutelareína, 7-O-glucosídeo, hispidulina 7-O-glucosídeo e genkuanina foram estudados nas folha, flores, hastes e raízes durante o crescimento da planta, em Múrcia na Espanha. O maior nível da luteolina 3'-O-beta-D-glucuronídeo nas folhas foi encontrado nos meses de junho a agosto, sugerindo a diminuição da ativação das enzimas envolvidas na biossíntese da flavona. Detectaram a presença significativa de hesperina e diosmina no sistema vascular, sendo os níveis de hesperidina superiores ao dos diterpenos fenólicos e ácido rosmarínico. Esses pesquisadores sugeriram um relacionamento funcional e estrutural entre fitorreguladores e flavonóides, em que flavonóides seriam protetores da atividade dos fitorreguladores.

Foram realizadas pesquisas com óleos essenciais, incluindo o de

Rosmarinus officinalis, visando aplicações como inseticidas e inibidores de germinação de sementes de ervas daninhas. Os resultados obtidos demonstraram tanto a eficácia desses óleos quanto a necessidade de mais estudos (ANGELINI et al., 2000; MORETTI et al., 2002).

Bessette et al (2003) revelaram que pesticidas naturais contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentam eficácia contra larvas de insetos, apresentando a vantagem de não produzir toxicidade a humanos e animais domésticos. Angelin et al. (2003) testaram a inibição de germinação de ervas daninhas com diferentes óleos essenciais incluindo dois ecotipos de *Rosmarinus officinalis*. O ecotipo que possuía 47% de 1,8-cineol inibiu completamente a germinação, *in vitro*, assim como o borneol quando testado isoladamente, composto presente em alta concentração no ecotipo 1,8-cineol.

Zeng e Shetty (2000) relataram uma inversão na correlação entre compostos fenólicos totais e a atividade da peroxidase na espécie *R. officinalis*. Essa proporção depende da maturidade da planta, pois as peroxidases estão envolvidas no processo de lignificação, no tecido cicatricial da planta, na degradação de compostos aromáticos e na defesa de agressões por agentes patógenos. Nesses casos há um acréscimo da atividade de peroxidação.

Nogues e Baker (2000), estudando plantas do mediterrâneo, incluindo o *Rosmarinus officinalis*, pesquisaram os efeitos da radiação UV-B, antes e durante a seca. Concluíram não serem significativas as alterações ocorridas no crescimento e fotossíntese, porém confirmaram o decréscimo de ácido carnósico, devido à oxidação, e aumento de alfa-tocoferol. Pouco se sabe a respeito das funções do ácido carnósico na planta, *in vivo*. Munne-Bosch e Alegre (2001) mostraram que esse composto protege cloroplastos contra a oxidação, retirando radicais livres, durante situações de estresse da planta, como secas e altas temperaturas.

Mune-Bosch et al. (2001) observaram o efeito da seca durante o verão na região mediterrânea, sobre o *Rosmarinus officinalis*. Relataram decréscimo de água (58%) e redução da assimilação de dióxido de carbono. Houve aumento de alfa-tocoferol, isorosmanol (25%), dimetil - isorosmanol (40%), devido à ação da enzima desidrogenase levando à oxidação do ácido carnósico, que apresentou um decréscimo de 22%.

Sanches-Blanco et al. (2004) testaram os efeitos da irrigação e umidade em dois grupos de mudas de alecrim em viveiro, verificando ser o grupo irrigado o que

melhor se aclimatou após transplante e que apresentou regulamento estomatal mais eficiente que o grupo submetido a estresse hídrico.

Nakatani (2000) isolou vinte e seis compostos fenólicos antioxidantes do *Rosmarinus officinalis*. Ibanez et al. (2000) utilizaram uma combinação de métodos para análise dos princípios ativos antioxidantes extraídos de *R. officinalis* e observaram que os resultados foram melhores com o HPLC. Torre (2001), quantificou o alfa-tocoferol (vitamina E) das folhas de *Rosmarinus officinalis* através do método de HPLC. As folhas recém-colhidas foram secas em estufa de microondas e maceradas. O alfa-tocoferol foi extraído com acetona e o extrato obtido foi analisado por HPLC, usando como padrão o ergocalciferol (Vitamina D₂).

Stahenko et al. (2002) determinaram, *in vitro*, a atividade antioxidante do óleo essencial obtido, que se mostrou superior à atividade antioxidante da vitamina E, do Trolox e do BHA (t-butil hidroxi anisol). Essa capacidade antioxidativa foi avaliada por Cervellat et al. (2002), através da reação de Briggs-Rauscher, que utiliza pH em torno de 2,0. Foi demonstrado que o ácido carnósico é potente antioxidante, porém apresenta grande instabilidade, se transformando em carnosol. Para evitar essa degradação, Backleth, Leuold e Parlar (2003) utilizaram pH 4,0 e fluxo de gás em uma solução padrão na presença de saponina como substância surfactante, para estabilizar o ácido carnósico.

Ramirez et al. (2004) obtiveram carnosol e ácido carnósico de *Rosmarinus officinalis* da extração com fluido supercrítico. Abu et al. (2004) utilizaram ultrassom para aumentar a eficiência da extração de ácido carnósico. Conseguiram melhor rendimento e diminuição do tempo de extração. Compararam solventes e também droga seca e fresca. Os melhores resultados foram obtidos com droga seca e etanol.

Wellwood e Cole (2004) desenvolveram métodos para identificação e separação de extratos de 12 amostras diferentes de alecrim, usando três solventes com polaridades variadas, obtendo excelente atividade antioxidante. Seus principais componentes antioxidantes foram separados por HPLC. As concentrações de ácido carnósico foram correlacionadas com a atividade antioxidante desses extratos e com a inibição da oxidação do ácido linoléico.

Com intuito de demonstrar a atividade antioxidante de compostos naturais, Ozcan (2003) testou extratos de plantas (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia fruticosa* L., *Rhus coriaria* L.) na conservação de óleo de amendoim. Observou alta eficiência

do alecrim, inferior apenas ao BHT (hidroxitolueno butirato).

São encontradas várias referências sobre a eficácia do *Rosmarinus officinalis* L. em processos patológicos. Daferera et al. (2000) pesquisaram as propriedades antimicrobiana e fungicida do óleo essencial, atribuindo essa ação aos compostos monoterpênicos, que possuem a capacidade de inibir a produção de Conídios em *Penicillium digitatum*. Oluwatuyi, Kaatz e Gibsons (2004) fracionaram um extrato clorofórmico das partes aéreas de alecrim, obtendo ácido carnósico, carnosol, 12-metóxi-*trans*-carnósico e 12-metóxi-*cis*-carnósico. Testaram a atividade antibacteriana desses componentes e, devido à eficiência detectada, demonstraram grande potencial para serem sintetizados.

O extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* possui efeito diurético, provocando diminuição do clearance de creatinina e aumento da excreção urinária de eletrólitos (Haloui et al., 2000).

Em 2001, Zeng et al. demonstraram que a atividade do carnosol, rosmanol e epirosmanol se manifesta no corpo humano através da inibição de radicais livres lipídicos na membrana plasmática e da inibição de oxidação do LDL. Valenzuela et al. (2004) relataram o risco da formação de COPs (produtos de oxidação do colesterol) em alimentos e a necessidade da adição de antioxidantes. Testaram a adição de alguns oxidantes naturais, inclusive extrato de alecrim, ao óleo de soja, demonstrando inibição da oxidação.

Foi observada inibição da motilidade de cultura de *Trypanosoma cruzi*, na forma epimastigota, após 48 horas de incubação com o extrato metanólico de *Rosmarinus officinalis* (ABE et al., 2002).

Sotelo-Felix et al. (2002 a, b), utilizando carnosol, verificaram a normalização da bilirrubina plasmática, redução (69%) do malondialdeído (MDA) hepático e redução da alanina aminotransferase (ALT) em 50%, prevenção da queda do glicogênio hepático e proteção do parênquima hepático. Assim, atribuíram a ação hepatoprotetora do *Rosmarinus officinalis* ao carnosol.

Kim e Kim (2003), pesquisando a atividade antioxidante e inibitória do glutathione, sugeriram a possibilidade do extrato hidroalcoólico de alecrim apresentar propriedades farmacológicas para tratamento de complicações diabéticas.

Kosaka e Yokoi (2003) testaram o efeito de extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre células de glioblastoma humanas T98G, observando aumento na síntese de NGF (nerve growth factor). O NGF é vital para crescimento e manutenção funcional

do tecido nervoso.

A dependência química desencadeada com utilização de opiáceos, como morfina, tem sido motivo de preocupação de clínicos e pesquisadores. Hosseinzadeh e Nourbaksh (2003) induziram dependência química por morfina em camundongos e testaram a inibição da síndrome da retirada utilizando extrato hidroalcoólico de *R. officinalis* após administração de Naloxana, observando diminuição da síndrome.

Há uma necessidade crescente de descobrir substâncias com atividade antiviral, devido ao fato de vírus apresentarem resistência a determinadas drogas disponíveis. O HSV (vírus do herpes simples) causa grande variedade de doenças, podendo levar a óbito. Vijayan et al (2004) pesquisaram várias plantas de diferentes famílias, selecionando aquelas com histórico etnomedicinal; entre essas foi estudado o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* que mostrou atividade parcial em concentração elevada. Mostraram a necessidade de elucidar os constituintes ativos dessas plantas que podem ser úteis no desenvolvimento de novos e eficazes agentes antivirais.

Gedney, Glover e Fillingim (2004) investigaram o efeito inalatório dos óleos essenciais de alecrim e lavanda sobre respostas sensoriais e afetivas. Os testes foram realizados com 13 homens e 13 mulheres. Observaram reações ao calor, à pressão mecânica e a dores isquêmicas induzidas. Concluíram que a aromaterapia utilizada não conseguiu produzir efeito analgésico, porém observaram ausência dos efeitos desagradáveis gerados por experiências dolorosas.

3.2 O processo inflamatório

A inflamação é uma resposta inespecífica a uma agressão inespecífica. O agente responsável pela agressão pode ter natureza química, física ou biológica. A resposta inflamatória independe da natureza do agente que a iniciou. Os quatro sinais e sintomas característicos da inflamação são eritema, dor, calor e edema, podendo ocorrer a perda da função da área lesionada. Esses sinais são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores da inflamação. Aumenta o fluxo sanguíneo na área lesada produzindo calor e eritema. Com aumento da temperatura as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. O edema surge com o aumento da permeabilidade. Podem extravasar fatores da coagulação sanguínea

para os tecidos. O fibrinogênio é convertido a uma espessa rede de filamentos insolúveis de fibrina onde microorganismos invasores são aprisionados, bloqueando a difusão no organismo. A dor pode resultar de vários fatores, como aumento da pressão, devido ao edema, sobre tecidos e terminações nervosas; de lesão das fibras nervosas; da irritação devida a substâncias tóxicas produzidas por microorganismos ou extravasamento de substâncias intracelulares de células lesadas e, também, por cininas que afetam algumas terminações nervosas. As prostaglandinas intensificam a dor associada à inflamação (CORRÊA e NOVELLI, 2002; TORTORA e GRABOWSKI, 2002; CONSTANZO, 2004).

A inflamação é um mecanismo natural de defesa contra qualquer agressão de agente externo. É caracterizada por reação de diversos vasos sanguíneos e, geralmente, acúmulo de fluidos e leucócitos com função de diluir e isolar agentes lesivos. A intensidade da inflamação depende da extensão do traumatismo (RANG et al., 2004). Alguns farmacologistas dividem a resposta inflamatória em três fases: aguda, resposta imune e inflamação crônica. Essas fases inflamatórias são especificadas por Carvalho (2004). Na fase aguda, que é transitória, há aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Há extravasamento de proteínas aumentando a viscosidade sanguínea. Na fase subaguda (tardia) ocorre migração de leucócitos e células sanguíneas até o agressor, obedecendo a um gradiente químico (quimiotaxia). O reconhecimento do agressor é feito através de marcadores protéicos ligados ao agente agressor, fenômeno conhecido por opsonização. Ocorre a fagocitose, morte do microorganismo e degradação. A fase proliferativa crônica é caracterizada por degeneração tecidual e fibrose.

Um processo inflamatório não desaparece na primeira fase (aguda), pode evoluir para cura completa, cura com seqüelas e inflamação crônica, podendo levar a óbito dependendo da extensão da lesão e do comprometimento de órgãos com perda de função. A resposta inflamatória crônica de hipersensibilidade tardia pode manifestar-se sob forma de granuloma que são nódulos de tecidos de granulação. São compostos por fibroblastos, capilares e macrófagos modificados. Geralmente é observada a presença de células gigantes formadas por fusão de macrófagos modificados, podendo existir necrose central. Podem surgir em decorrência de infecções micobacterianas e fúngicas. Os granulomas podem originar tanto de organismos vivos como de agentes exógenos não-vivos e indigeríveis que podem desencadear a formação de células gigantes. O antígeno estimula resposta imune

celular. Os linfócitos Lth (linfócito T helper) secretam citocinas, estimulando mais formação de Lth. São secretados interferon gama pelos Lth-1 e interleucinas pelos Lth-2. Essas interleucinas estimulam os monócitos a modificarem a estrutura e se transformarem em células epitelióides que, após sucessivas duplicações sem divisão da membrana citoplasmática, formarão células gigantes multinucleadas do granuloma. Ocorre, na maioria das vezes, a formação de granulomas como resposta inflamatória a microorganismos persistentes, como *M. tuberculosis* e alguns fungos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003).

Em torno de 1h após início do processo inflamatório surgem os neutrófilos seguidos pelos monócitos; com o aumento na produção é detectada uma leucocitose na medula óssea. Há destruição quase imediata dos neutrófilos. Os monócitos são transformados em macrófagos móveis, que fagocitam tecidos danificados, neutrófilos destruídos e micróbios invasores. Podem morrer, formando pús junto com a coleção fagocitada (TORTORA e GRABOWSKI, 2002). São destruídos microorganismos fagocitados e extracelulares por ação de compostos secretados pelos macrófagos ativados, como intermediários reativos do oxigênio, NO (óxido nítrico) e enzimas lisossômicas. Os produtos microbicidas liberados podem lesar células e tecidos normais. Esse processo normalmente regride progressivamente com o término da infecção. Porém, pode ocorrer uma contínua produção de citocinas e fatores de crescimento, induzindo formação de fibrose por reposição do tecido conjuntivo (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; CARVALHO, 2004).

Na primeira fase da inflamação há liberação de substâncias vasodilatadoras como histamina, prostaglandinas, leucotrienos e complementos. Têm, nesse processo, a função de estimular liberação de histamina, atrair neutrófilos por quimiotaxia, estimular fagocitose e algumas podem destruir bactérias (TORTORA e GRABOWSKI, 2002). Basófilos e mastócitos podem ser ativados diretamente por uma variedade de substâncias biológicas, como compostos polibásicos, peptídeos, citocinas, anafilotoxinas e derivados do complemento (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003). Os mastócitos são células mononucleares localizadas no tecido, em superfície de contato com meio externo, como mucosas, serosas, e pele. Contém poderosos mediadores de reações inflamatórias agudas.

O efeito biológico dos mastócitos é causado, principalmente, pela liberação de aminas vasoativas. Essas aminas são compostos não-lipídicos, de baixo peso

molecular, liberadas de grânulos citoplasmáticos. A única desse grupo em quantidades significativas no ser humano é a histamina que foi descoberta no início do século XX, quando os estudos experimentais progrediram bastante. Após a descoberta da histamina, primeiro mediador da inflamação, os estudos tiveram impulso maior. A histamina é um mensageiro químico responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo reações alérgicas e inflamatórias, secreção de ácido gástrico e, possivelmente, neurotransmissão em partes do cérebro. Não possui aplicações clínicas, mas agentes inibidores de histamina têm aplicações terapêuticas importantes. Tem ação vasodilatadora pronunciada. É sintetizada no organismo a partir da descarboxilação da histidina. É secretada pelos mastócitos em reações alérgicas ou em traumas. Atua sobre receptores H_1 , H_2 e H_3 . Tem ação de curta duração. Inicia eventos intracelulares, tais como degradação do fosfatidilinositol em IP_3 e DAG. A exsudação do plasma é induzida pela ligação histamina-endotélio. A histamina induz síntese de PGI_2 e NO, que produzem vasodilatação. Provoca vasoconstrição dos músculos intestinais e brônquicos (CHAMPE e HARVEY, 2002; ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; CARVALHO et al., 2004; RANG et al., 2004).

A serotonina, denominada 5-hidroxitriptamina, representa igual ou maior importância que a histamina, apesar de ser encontrada em menor quantidade no ser humano. A síntese e armazenamento ocorrem em sítios distribuídos em todo o organismo, sendo encontrada em maior quantidade na mucosa intestinal e em menor quantidade nas plaquetas e sistema nervoso central (SNC). É importante na percepção da dor, distúrbios afetivos, regulação do sono, temperatura e pressão arterial. Aumenta a permeabilidade vascular, resposta quimiotáxica dos leucócitos e crescimento *in vitro* de fibroblastos. Estimula a vasodilatação e formação de colágeno. A serotonina é sintetizada a partir do triptofano, que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofânio e descarboxilado a serotonina (CHAMPE e HARVEY, 2002; ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; CARVALHO et al., 2004; RANG et al., 2004).

A partir do ácido araquidônico são formados os eicosanóides pelas vias ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase. Obtendo prostaglandinas, tromboxanos, fator ativador de plaquetas (PAF) e leucotrienos como principais mediadores da inflamação. Os tromboxanos e prostaglandinas são chamados prostanóides e obtidos pela via COX. As ciclooxigenases são COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutiva, ocorrendo na maioria das células, provável responsável pela

homeostasia normal. A COX-2 é induzida em células inflamatórias, sendo alvo de estudos para antiinflamatórios. Existe a COX-2, constitutiva, encontrada no SNC. Estudos mostram a importância da COX-2 na hemodinâmica real e provável envolvimento em processos neoplásicos. A COX-3 foi descrita recentemente por Chandrasekharan, em 2002. Nos seres humanos o RNAm da COX-3 é expresso em maior quantidade no córtex cerebral e no coração. O acetaminofeno (Paracetamol) e alguns analgésicos-antipiréticos têm ação seletiva sobre essa isoforma (RANG et al., 2004).

As prostaglandinas (PG) atuam sobre nociceptores polimodais (PMN), principais neurônios sensoriais periféricos que respondem aos estímulos nócicos. A maioria dos PMN é formada por fibras C não mielinizadas que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. As PGE_2 , PGI_2 e PGD_2 são potentes vasodilatadores intrínsecos. Fazem sinergia com histamina e bradicinina, contribuindo para aparecimento de eritema nas áreas inflamadas. Esses prostanóides não causam dor, mas potencializam a ação da bradicinina, que sensibiliza as fibras C aferentes. A PGE está envolvida na produção de febre. Tem concentração aumentada no líquido em processos inflamatórios. São liberadas por células lesadas e intensificam efeitos da histamina e cininas. Sua síntese é inibida no hipotálamo, causando ação antipirética. As PG podem apresentar ação moduladora em processos inflamatórios, agindo sobre células inflamatórias, diminuindo a atividade. A PGE_2 diminui a liberação de enzimas lisossomais e a produção de metabólitos tóxicos do oxigênio, tendo utilização clínica em medicamentos contra hemorragia pós-parto, prevenção de úlcera péptica, desobstrução artérias em recém-nascidos com malformações congênitas, inibição de agregação plaquetária, glaucoma de ângulo aberto e em outras patologias (RANG et al., 2004).

A maioria das prostaglandinas é produzida no rim, como PGI_2 e PGE_2 , que causam vasodilatação das arteríolas aferentes e eferentes. Têm ação moduladora do RBF (fluxo sanguíneo renal); sem essa ação protetora haveria falência renal após hemorragia. A PGD_2 tem ação vasodilatadora e broncoconstritora, promove quimiotaxia dos neutrófilos e acúmulo nos sítios inflamatórios. Têm síntese inibida por inibidores da COX, como aspirina e AINE. As prostaglandinas da série F são vasoconstritoras. As prostaglandinas estimulam a formação de AMPc em vários tipos de células inflamatórias, inibindo inúmeras respostas biológicas, como

liberação de mediadores nos mastócitos, blastogênese de linfócitos e reações citotóxicas mediadas por linfócitos. Em reações imunológicas a maior produção de PGE₂ é encontrada nos mastócitos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; CARVALHO, 2004).

Os tromboxanos são mediadores originados também da via ciclooxigenase. Nas plaquetas é sintetizado o tromboxano A₂. Seus efeitos principais são a vasoconstrição de arteríolas e veias, agregação plaquetária e alteração da resistência vascular dos pulmões junto a outras substâncias (CONSTANZO, 2004; RANG et al., 2004).

Os leucotrienos são produtos das vias de lipoxigenase que são enzimas solúveis localizadas no citosol e encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. Os leucotrienos estimulam a liberação de citocinas nos macrófagos e linfócitos. Podem causar aderência, quimiotaxia, ativação de polimorfonucleares e monócitose estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos. Causam broncoconstrição prolongada. A administração de aspirina exacerba essa broncoconstrição, sendo a causa mais provável a inibição de PGD₂ com aumento de leucotrienos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; RANG et al., 2004).

O fator ativador de plaquetas é rapidamente destruído pela PAF-hidrolase. Pode atuar como quimiotáxico. É importante agregante plaquetário. É um lipídeo biologicamente ativo. Possui ações em várias células-alvo e não apenas em plaquetas. É produzido e liberado pela maioria das células inflamatórias e plaquetas estimuladas por trombina. Quando aplicado localmente, causa eritema e edema, devido à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular. Em doses maiores pode provocar hiperalgesia. É importante quimiotático para neutrófilos e monócitos. Pode ativar a fosfolipase A₂ para produção de eicosanóides a partir de fosfolipídeos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003; CARVALHO, 2004; RANG et al., 2004).

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos liberados pelas células do sistema imune. Incluem interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de estimulação de colônias, fatores de crescimento e fatores de necrose tumoral (TNF). As citocinas pró-inflamatórias participam de reações inflamatórias agudas, crônicas e reparo tecidual. Podem desencadear cascatas de citocinas, como as quimiocinas. As citocinas antiinflamatórias inibem a reação inflamatória e podem inibir a produção de quimiocinas. São elas a, IL-4, IL-10 e IL-13. O TGF-β (fator de crescimento

transformador), encontrado nas plaquetas e produzido em linfócitos estimulados, inibem a divisão adicional de linfócitos, regulam a diferenciação de outras células e estimulam proliferação de fibroblastos, envolvendo reparação tecidual. No processo pirogênico há liberação da IL-1 nas células fagocitárias e, depois, essa interleucina age no hipotálamo, aumentando produção de prostaglandinas. As citocinas podem liberar mediadores da inflamação e estimular adesividade celular através da expressão de integrinas dos linfócitos. Uma das origens mais importantes das citocinas são os linfócitos T helper (CONSTANZO, 2004; RANG et al., 2004, CARVALHO, 2004). Gratchev et al. (2004) estudaram a ação da IL-4 e dexametasona na contra-regulação extracelular e fagocitose em macrófagos ativado tipo 2. Concluíram que a estimulação desses macrófagos com IL-4 e glicocorticóides regula a fagocitose de partículas opsonizadas ou não.

Os mediadores de complemento são originados da ativação de um grupo de proteínas plasmáticas pela via clássica ou alternativa através de cascata onde peptídeos são gerados por múltiplos passos enzimáticos. Essa cascata pode ser desencadeada por substâncias derivadas de microrganismos, sendo denominada “via alternativa”. A via clássica envolve anticorpos. Os principais componentes do sistema do complemento são nove, designados C1 a C9. O C3, a partir de clivagem enzimática, gera vários peptídeos. O C3a (anafilatoxina) pode estimular secreção de mediadores por mastócitos. O C3b (opsonina) pode fixar-se aos microrganismos facilitando a fagocitose por leucócitos. As frações C3a e C5a estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, degranulação de mastócitos e quimiotaxia (CARVALHO, 2004; RANG et al., 2004).

O óxido nítrico tem propriedades pró-inflamatórias, age como vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular e estimula produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Quando produzido em excesso, causa lesão tecidual por peroxidação lipídica. Apresenta atividades antiinflamatórias, pois ao ser liberado das células endoteliais, inibe a agregação plaquetária e adesão de neutrófilos e plaquetas. Inibidores de iNOS (forma induzível da NO sintetase) têm sido estudados para tratamento antiinflamatório (RANG et al., 2004). Cunha et al (2004) testaram propriedades antiinflamatórias do ácido caféico e derivados, *in vitro* e *in vivo*. Obtiveram resultados que confirmaram dados encontrados na literatura. Concluíram ser a atividade antiinflamatória devida, ao menos parcialmente, à capacidade desses compostos quelarem óxido nítrico e modularem a expressão de iNOS e,

provavelmente, de outros mediadores da inflamação. Lee et al. (2005) demonstraram o efeito antiinflamatório do inibidor de adenosinoquinase (ADKI) em células glia tratadas com IC51 (ADKI). Observaram a liberação extracelular de adenosina, redução na produção de LPS/IFN-gama mediador de NO e indução de iNOS e da expressão do gene do IFN-alfa. Gonzales et al. (2005) realizaram experimento em camundongos, onde houve indução de cistite intersticial empregando LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) com posterior cultura das células da bexiga. Verificaram aumento significativo na produção de TNF-alfa, substância P e fator de crescimento de nervo (NGF) nas células das bexigas que receberam o LPS, em comparação com as do grupo controle que receberam solução salina, assim como diminuição dessa inflamação e dos fatores neurotróficos nos grupos tratados com RDP58 (peptídeo sintético inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias).

3.3 Dor

Dor, como outras sensações, não é de fácil definição. Seu estudo também é difícil, sendo que o caminho mais seguro é utilizar a descrição verbal no homem, em experiências subjetivas da dor, sob condições experimentais controladas. Entretanto, manifestações fisiológicas de nocicepção medulares podem ser associadas com dor em animais experimentais e podem ser utilizadas na avaliação de substâncias com propriedades analgésicas (CARVALHO, 2004).

A dor é um sistema de alerta que informa ao hospedeiro que a parte lesada precisa ser protegida e que a retirada do agente da área pode ser uma medida prudente. A dor é uma sensação subjetiva. Com exceção do encéfalo, todos os tecidos do organismo possuem terminações livres, os nociceptores, que são ativados por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos. O impulso vai da área da agressão para o sistema nervoso central, mas, no final, são centros cerebrais superiores que determinam a extensão da dor, e estes centros podem receber outros sinais que podem modificar a dor. As disfunções fisiológicas levam a manifestações de hiperalgesia, onde o organismo reage de forma exacerbada a estímulos leves e alodinia, que é caracterizada por resposta a um estímulo não-nocivo. A dor pode persistir após a retirada do estímulo nocivo. A estimulação nociceptiva periférica é mediada por vários neurotransmissores como 5-HT, o mais ativo, histamina e acetilcolina. A bradicinina é potencializada pela liberação de

prostaglandinas, atua em receptores acoplados à proteína G, produzindo mensageiros intracelulares. A dor pode ser classificada em rápida ou lenta, dependendo das fibras condutoras do estímulo nocivo. A dor rápida envolve fibras A-delta (A δ) composta por neurônios mielinizados, chamada aguda. A dor lenta, pulsátil, crônica, aparece após 1 seg do estímulo nocivo, é conduzida por fibras C, não mielinizadas, encontradas na pele, tecidos profundos e órgãos internos. Existem sensações dolorosas que se manifestam em proporções inadequadas à função fisiológica havendo necessidade de administrar substâncias bloqueadoras, analgésicas (TORTORA e GRABOWSKI, 2002; RANG et al., 2004).

Quando acontece um estímulo doloroso, o organismo faz a transdução, transformando o estímulo nocivo em potencial de ação, que é captado por nociceptores (receptores nocivos). É feita liberação de substâncias químicas, genericamente denominada algogênicas, em decorrência de processos inflamatórios, isquêmicos e traumáticos. Essas substâncias são produzidas no local, como a histamina, serotonina, bradicinina, citocinas e derivados do ácido araquidônico. Existem substâncias que são produzidas antidromicamente, ou seja, no sentido contrário da transmissão dos nervos sensitivos, do corpo neuronal para a periferia, sendo a mais importante a substância P. Inicialmente acontece a hiperalgesia primária com sensibilidade local. Após liberação dos mediadores, há redução do limiar da sensibilidade dos terminais vizinhos e surge uma dor generalizada causada por estímulos dos receptores de fibras aferentes, caracterizando a hiperalgesia secundária (CONSTANZO, 2004; RANG et al., 2004).

O desenvolvimento de métodos para a medida de dor e seu alívio, em animais de laboratório, tem sido incrementado drasticamente nos últimos anos. O princípio da maioria deles se baseia na indução da dor através de um estímulo, supostamente doloroso, previamente escolhido, que determina uma resposta mensurável de preferência quantitativamente, com valores diretamente proporcionais à intensidade do estímulo que, com a introdução de um procedimento ou substância, é diminuída (analgésico) ou aumentada (hiperalgésico). Os principais métodos, ou pelo menos os de maior utilização, são os obtidos através do estímulo mecânico (compressão da pata) ou químico (teste da formalina e de contorções) (RANG et al., 2004).

3.4 Antiinflamatórios e analgésicos

Os medicamentos antiinflamatórios e analgésicos constituem um grupo heterogêneo de compostos que, em muitos casos, não estão relacionados quimicamente (embora a maioria deles seja de ácidos orgânicos), porém, compartilham de algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo é a aspirina que foi introduzida na medicina em 1899 por Dreser. O nome aspirina parece ter sido derivado da *Spiraea*, espécie de planta a partir da qual o ácido salicílico foi preparado durante algum tempo. Pouco tempo depois, os salicatos sintéticos substituíram os compostos mais dispendiosos obtidos das fontes naturais. Nos primeiros anos desse século, os principais benefícios terapêuticos da aspirina estavam demonstrados (GOODMAN e GILMAN, 2001; CARVALHO, 2004).

Muitos estudos indicam ser a inibição da síntese das prostaglandinas o principal mecanismo das ações terapêuticas dos AINE (antiinflamatórios não esteróidais). A indometacina é uma exceção notável porque ela é mais potente nos testes inflamatórios, do que no ensaio de inibição enzimática. Em sua maioria, inibem tanto a atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1; constitucional), quanto a ciclooxigenase-2 (induzida em presença da inflamação) e, desta forma, as sínteses das prostaglandinas e do tromboxano. A inibição da COX-2 parece mediar, pelo menos em parte, as ações analgésica e antiinflamatória desses medicamentos, porém, a inibição simultânea da COX-1 provoca efeitos colaterais indesejáveis, principalmente os que levam às úlceras gástricas resultantes de prostaglandinas e tromboxano (GOODMAN e GILMAN, 2001).

Rang et al. (2004) citam a COX-3 e descrevem como ocorre a inibição das ciclooxigenases por AINE. Os AINE não específicos causam bloqueio tanto na COX-1 como na COX-2, através da ligação de um hidrogênio com a arginina na posição 120, de forma reversível para a maioria, excluindo o araquidonato. A aspirina se liga de forma irreversível à serina na posição 530 e à acetila. A COX-2 apresenta uma bolsa lateral, pois possui uma valina na posição 523 em substituição à isoleucina que é mais volumosa. Esta bolsa lateral é o provável sítio de ligação para medicamentos COX-2 seletivos. O objetivo das pesquisas com antiinflamatórios COX-2 seletivos é diminuir efeitos adversos como transtornos gastrintestinais gerados pela inibição de prostaglandinas protetoras de mucosa.

A dor que acompanha a inflamação e lesão tecidual resulta provavelmente da estimulação local das fibras da dor e de aumento da sensibilidade. Essa hiperalgesia

é devida, em parte, à excitabilidade aumentada dos neurônios centrais da medula central. Os AINE, em geral, não alteram a hiperalgesia causada pela ação direta das prostaglandinas, o que é compatível com o conceito dos efeitos analgésicos resultarem da inibição de síntese das prostaglandinas. Entretanto, alguns dados têm sugerido que o efeito analgésico desses compostos possa ocorrer por outros mecanismos, como a antinocicepção dos neurônios periféricos ou centrais (CARVALHO, 2004).

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi obtido da empresa Santos Flora Ltda. (Ervas Medicinais e Aromáticas), situada na cidade de S. Paulo, Lote ALER 04/02, proveniente da Turquia, contendo autenticação botânica como *Rosmarinus officinalis* L..

4.2 Obtenção do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

O OERO foi obtido a partir de hidrodestilação das partes aéreas secas e trituradas, utilizando-se aparelho de Clevenger (FARM. BRAS., 1988). Para cálculo do rendimento do óleo essencial, tomou-se como base a quantidade da droga vegetal em gramas utilizada no processo extrativo inicial e o volume resultante de óleo.

4.3 Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *R. officinalis*

4.3.1 Animais

O Projeto inicial foi aprovado sob o número 05A/2003 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFENAS.

Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Unifenas. Nos diversos experimentos foram utilizados ratos wistar machos, pesando entre 180-200g, e camundongos swiss albinos machos, com peso entre 20-25 gramas. Os animais permaneceram em jejum durante 24 horas antes dos experimentos, com livre acesso à água em sala climatizada com exaustor para gases, obedecendo a períodos de claro e escuro de 12 h.

4.3.2 Determinação da DL₅₀

Para a determinação da dose letal média foram utilizados grupos de camundongos (n = 10/grupo) pesando 20 a 25 g e ratos (n = 10/grupo) pesando em

torno de 180g, que receberam, por via oral (v.o.), doses únicas de diferentes concentrações do óleo essencial (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 mg/kg). Foi realizada observação detalhada por um período de 72 horas, e posteriormente até o 7º dia após a administração. O número de animais mortos foi expresso em percentagem e a DL_{50} estabelecida pelo método dos probitos de acordo com o método descrito por Malone e Robichaud (1962).

4.3.3 Determinação da dose efetiva 50 (DE_{50})

A determinação da DE_{50} teve como base os ensaios de edema provocado por carragenina em ratos e o teste de contorções em camundongos. Nos dois ensaios, os animais foram tratados (v.o.) com o OERO trinta minutos antes das aplicações dos estímulos. A DE_{50} foi determinada utilizando-se o Programa Statistic Module Switcher, o qual consistiu na plotagem direta das doses utilizadas e as respectivas percentagens de inibições.

4.3.4 Edema de pata de rato

O edema de pata baseia-se na variação do volume das patas traseiras dos animais, após a aplicação de algum estímulo inflamatório (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962). Os grupos receberam os tratamentos com o OERO em diferentes doses (50, 100, 200 e 300 mg/kg, v.o.), com intuito de determinar-se a DE_{50} , trinta minutos antes da aplicação do agente inflamatório (carragenina 1000 μ g/pata, 01 mL). Foi aplicado na região plantar da pata posterior esquerda dos animais 0,1 mL de solução salina e mesmo volume desta contendo o agente inflamatório na pata direita. Para a medida do volume das patas utilizou-se o plestismômetro da Ugo Basile modelo 7540, o qual fornece a medida direta do volume a partir da imersão da pata do animal em uma cuba contendo solução transdutora. As patas foram medidas antes da aplicação da substância pró-inflamatória e de hora em hora durante 4 horas após a aplicação. Para o cálculo da DE_{50} consideraram-se apenas os resultados do pico máximo do edema, que aconteceu na 4ª hora após aplicação da carragenina.

4.3.5 Teste do granuloma

Em condições assépticas e sob anestesia com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p), realizou-se uma incisão longitudinal ventral em cada animal (ratos) e

implantaram-se, através de divulsão do tecido subcutâneo, quatro cilindros de algodão hidrófilo branco (Johnson & Johnson) de 5mm de comprimento, pesando 40 mg cada, em quatro pontos equidistantes da incisão. Os cilindros de algodão, previamente esterilizados por autoclavagem em lotes de quatro unidades pesando 160 mg, foram tratados com 0.4 mL de solução aquosa de ampicilina injetável 5% (Ariston), seguindo o método descrito por Méier, Schuler e Desaulles (1950) e Niemegeers et al. (1975) imediatamente antes do implante. Foi administrada, por via oral, diariamente, solução de tween 5% (4 mL/kg, grupo controle, n = 8), dexametasona (0,2 mg/kg, n = 8), (GERMANO et al., 1995) e OERO (300 mg/kg, dose determinada pelo edema de pata por carragenina, n = 8), começando o tratamento 2 horas depois da implantação dos peletes até o 6^o dia. No sétimo dia, os animais foram submetidos à eutanásia, os granulomas removidos por dissecação e submetidos à secagem por 24 horas em temperatura de 60°C. A seguir, seus pesos foram determinados em balança analítica (Explorer Ohaus – Marte) e o peso do granuloma calculado pela diferença entre os pesos secos inicial e final.

4.3.6 Dermatite induzida pelo óleo de croton

Utilizou-se o método descrito por Tubaro et al. (1985). A indução da dermatite ocorreu por aplicação de 0.1mL (1 mg/orelha) de uma solução de óleo de croton em acetona na superfície da orelha direita dos camundongos. Na orelha esquerda, aplicou-se o mesmo volume de acetona. Trinta minutos após aplicação deste estímulo, procedeu-se ao tratamento por via oral, sendo um grupo (n = 10) tratado com o OERO (300 mg/kg, v.o.), outro com dexametasona (n = 10) (0,5 mg/kg, v.o), e o grupo controle (n = 10) tratado com solução de tween 5% (0,5 mL, controle v.o.). A avaliação da resposta antiinflamatória ocorreu após 6 h da aplicação do estímulo. Os camundongos foram submetidos à eutanásia e uma amostra de 8 mm de diâmetro da orelha foi retirada com auxílio de um punch de biópsia, e estabelecida a diferença do peso entre a amostra da orelha controle (esquerda) e a orelha estimulada (direita), expressando os resultados obtidos em peso (mg).

4.3.7 Permeabilidade vascular em ratos

O método utilizado foi o descrito por Mustard et al. (1965) e Lykbe e Cummings (1969), consistindo na determinação espectrofotométrica da quantidade

de corante extravasado para o espaço intersticial por ação de um mediador inflamatório.

Diferentes grupos de ratos wistar, machos, (n = 5/grupo) foram tratados por via oral com o OERO (300 mg/kg, v.o), ciproeptadina (10 mg/kg, v.o), indometacina (10 mg/kg, v.o.), e solução de tween 5% (0,5mL, controle). Após trinta minutos do tratamento, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg), e a região dorsal depilada. Após este procedimento, os animais receberam injeção endovenosa de azul de Evans (25 mg/kg) e 10 minutos depois foram injetados intradermicamente com solução salina de histamina (50 µg/animal). Cada animal recebeu 5 injeções com volume de 0,1 mL de solução de histamina, variando os locais de aplicação. Trinta minutos após a última injeção, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de éter etílico, as suas peles retiradas e as áreas próximas aos locais das injeções removidas com auxílio de um punch de biópsia de 1,5 cm de diâmetro, sendo fragmentadas e colocadas, separadamente, em tubos de ensaio contendo 3 mL de formamida e mantidas na estufa a 37°C por 24 horas. Este material foi filtrado e centrifugado (2500 rpm) durante 10 minutos.

Determinou-se a quantidade de azul de Evans espectrofotometricamente, em espectrofotômetro UV-1201 (UV-Vis Spectrophotometer) utilizando comprimento de onda de 620 nm, obtendo-se as concentrações do corante a partir da densidade óptica (DO) multiplicada por um fator calculado através da curva padrão.

4.3.8 Avaliação da atividade analgésica

Avaliou-se a resposta analgésica correlacionando-a com o efeito antiinflamatório através dos seguintes testes:

4.3.8.1 Contorções em camundongos

O teste de contorções em camundongos foi realizado seguindo o método descrito por Koster, Anderson e Beer (1959). Os grupos de animais foram tratados com diversas doses do OERO (10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg) e o controle com 0,5 mL de solução de tween a 5%. Trinta minutos depois as contorções foram induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 1% (0,25 ml, i.p). As respostas contorsivas foram observadas e os resultados obtidos foram expressos pela Média ± EPM do número de contorções no intervalo de 20 minutos.

4.3.8.2 Teste da formalina

Utilizou-se o método descrito por Dubuisson e Dennis (1977), sendo que foi administrado a diferentes grupos de camundongos ($n = 5/\text{grupo}$), indometacina (10 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, i.p.), OERO (300 mg/kg, v.o) e solução de tween 5% (controle, 0,25 mL) 30 minutos antes da aplicação de formalina.

Foram aplicados, subcutaneamente, 20 μ L de solução de formaldeído a 1% na região plantar da pata traseira esquerda de camundongos. Durante 5 minutos, após a aplicação, observou-se o tempo que os animais levaram lambendo a pata que recebeu a solução de formalina, e por mais 5 minutos, após 20 minutos da aplicação do estímulo algogênico. Os resultados foram expressos pela Média \pm EPM do tempo que os animais permaneceram lambendo as patas nas fases I e II.

4.3.8.3 Placa quente em camundongos

Antes do tratamento, todos os animais foram submetidos ao estímulo térmico por um período de trinta minutos e a medida do tempo de latência estabelecida a cada dez minutos, sendo 30 segundos o tempo de exposição máxima (tempo de corte). Este procedimento foi realizado com intuito de estabelecer a linha de base de cada grupo, ou seja, o comportamento dos animais sobre a placa quente antes da administração das substâncias testes. Após a determinação da linha de base, trataram-se os diferentes grupos de animais ($n = 10/\text{grupo}$) com OERO (300 mg/kg, v.o.), morfina (4 mg/kg, i.p.) ou solução de tween 5% (0,2 mL, controle). Trinta minutos após o tratamento, submeteram-se os animais ao ensaio. Utilizou-se a técnica descrita por Jacob, Tremblay e Colombel (1974) e Jacob e Ramabadram (1978), colocando-se cada camundongo sobre uma placa quente (Ugo Basile - Mod. DS57, com cronômetro acoplado) à temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, registrando-se o tempo de latência até acontecer a reação de saltos (tempo de reação em segundos), considerando-se o tempo de corte de 30 segundos.

O índice de analgesia foi calculado expressando os resultados em porcentagem do efeito máximo possível (%MPE) utilizando-se a fórmula descrita por Pini et al. (1997):

$$\% \text{ MPE} = 100 (\text{TL} - \text{BL}) / (30 - \text{BL}) \text{ onde:}$$

TL corresponde ao tempo de latência após o tratamento;

BL à linha de base dos grupos analisados;

30 corresponde ao tempo de corte.

4.4 Teste para avaliação da potência em relação a lesão gástrica (lesões agudas induzidas por estresse)

A indução das lesões gástricas por estresse baseou-se no método descrito por Takagi, Kasuya e Watanabe (1964) e Takagi e Okabe (1968). Os ratos foram mantidos em jejum durante 24 horas. Após este período, tratara-se (v.o) os diferentes grupos com solução de tween 5% (0.5mL - controle), OERO (300 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg). Após trinta minutos, imobilizou-se cada rato em um compartimento individual (tubo contensor), seguindo o método descrito por Basile et al. (1990), imergindo-os, verticalmente, até a região xifóide, em reservatório contendo água corrente a temperatura de 25°C, onde permaneceram por 17 horas em ambiente iluminado. Após este período, retirou-se cada animal do tubo contensor, praticou-se eutanásia, retirando-se o estômago imediatamente, abrindo-o ao longo da grande curvatura, fixando cada estômago em lâmina de isopor e submetendo-o ao exame das lesões, usando lupa estereomicroscópica binocular com amplitude de 10 X. Contou-se o número e severidade das lesões induzidas pelo estresse classificando-as em:

Tipo I (N_1): Presença de edema, hiperemia e hemorragias puntiformes (Petéquias);

Tipo II (N_2): Presença de lesões hemorrágicas com pequenas erosões na submucosa;

Tipo III (N_3): Presença de erosões severas com bordas hemorrágicas e algumas lesões invasivas.

Determinou-se o índice de lesão (IL) a partir da seguinte fórmula descrita por Basile et al., 1990:

$$IL = \frac{(N_3 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_1 \times 1)}{n}$$

Onde: N_1 , N_2 , N_3 correspondem ao número de ulcerações encontradas de cada tipo, e n ao número de animais utilizados no experimento.

4.5 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados obtidos nos diversos experimentos, utilizou-se, para comparação das médias, os testes "t" de Student, e para múltiplas comparações ANOVA (análise de variância one-way) seguida do teste de Student-Newman-Keuls, considerando-se estatisticamente significativos resultados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* foi de 1,4%.

5.2 Determinação da dose letal média (DL₅₀)

Com a administração das doses (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 mg/kg) por via oral em ratos e camundongos, não foi possível estabelecer a DL₅₀, pois, com estas doses, não houve nenhuma morte no período de sete dias de observação e, nas primeiras 72 horas após a administração do OERO, não foram observados sinais toxicológicos tais como diminuição da deambulação, piloereção e vômitos.

5.3 Determinação da Dose Efetiva 50 (DE₅₀)

A aplicação de carragenina na pata dos ratos induziu edema gradativo, cujo pico máximo observado foi na 4^a. Hora. O tratamento com as doses crescentes do OERO (50, 100, 200, e 300 mg/kg) por v.o, sobre o edema de pata de rato, produziu efeito dose-dependente, em que o coeficiente de correlação linear obtido foi $r = 0,9986$ ($y = -13,93 X + 0,30$) e o efeito máximo foi observado para a dose de 300 mg/kg, e a DE₅₀ determinada foi de 212 mg/kg (Figuras 1 e 2).

No teste de contorções em camundongos, o tratamento com as doses do OERO de 10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg por v.o produziu efeito dose-dependente cujo coeficiente de correlação foi de $r = 0,93095$ ($y = 30,54x + 0,073$), e a DE₅₀ encontrada foi de 261 mg/kg (Figura 3 e 4).

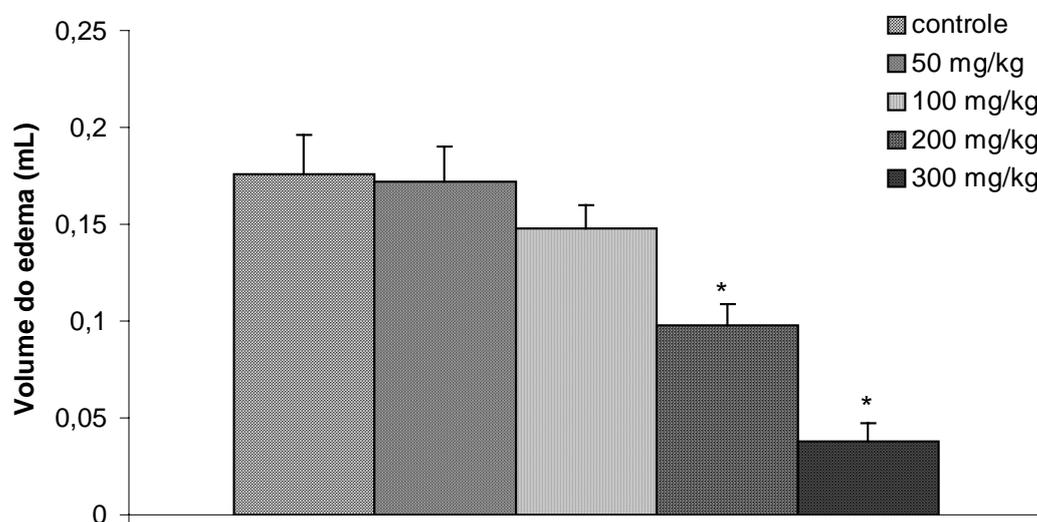


Figura 1. Efeito da administração (v.o.) do OERO (50, 100, 200 e 300 mg/kg) sobre o edema de pata de rato, induzido pela injeção intraplantar de carragenina (1000 μ g/pata). Cada valor representa a média \pm EPM de 5 animais do pico máximo do edema (3^a. hora). * $p < 0.05$ teste "t" de Student.

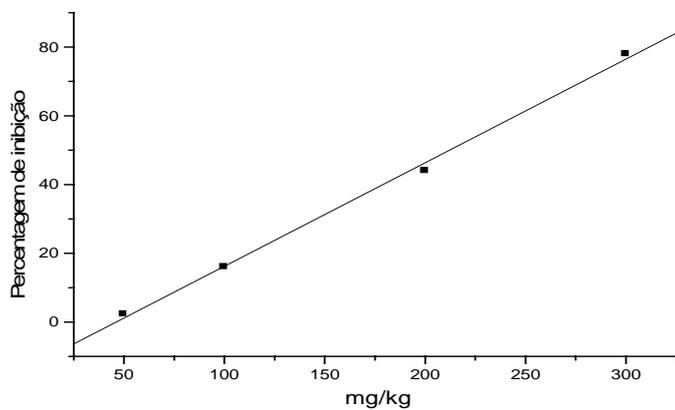


Figura 2. Regressão linear do efeito da administração (v.o.) do OERO (50, 100, 200 e 300 mg/kg) sobre o edema de pata de rato, induzido pela injeção intraplantar de carragenina (1000 μ g/pata). $DE_{50} = 212$ mg/kg, $R = 0,9986$ ($y = -13,93X + 0,30$).

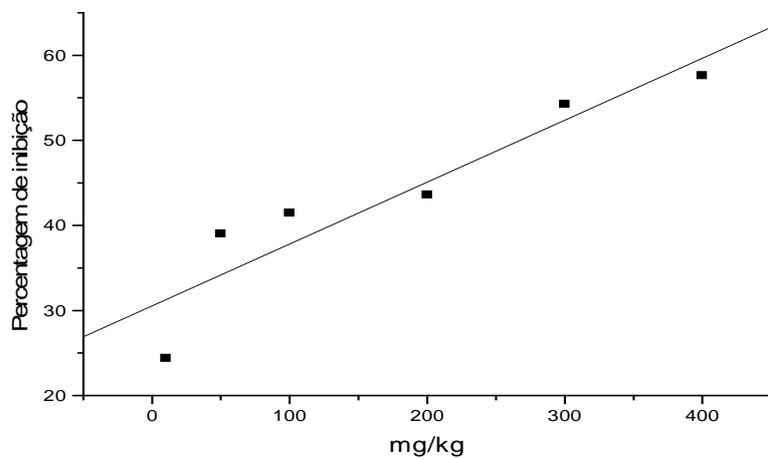


Figura 3. Regressão linear do efeito da administração (v.o.) do OERO (10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg) sobre contorções induzidas por ácido acético 1% (i.p.) em camundongos. $DE_{50} = 261$ mg/kg, $R = 0,93095$ ($y = 30,54x + 0,073$).

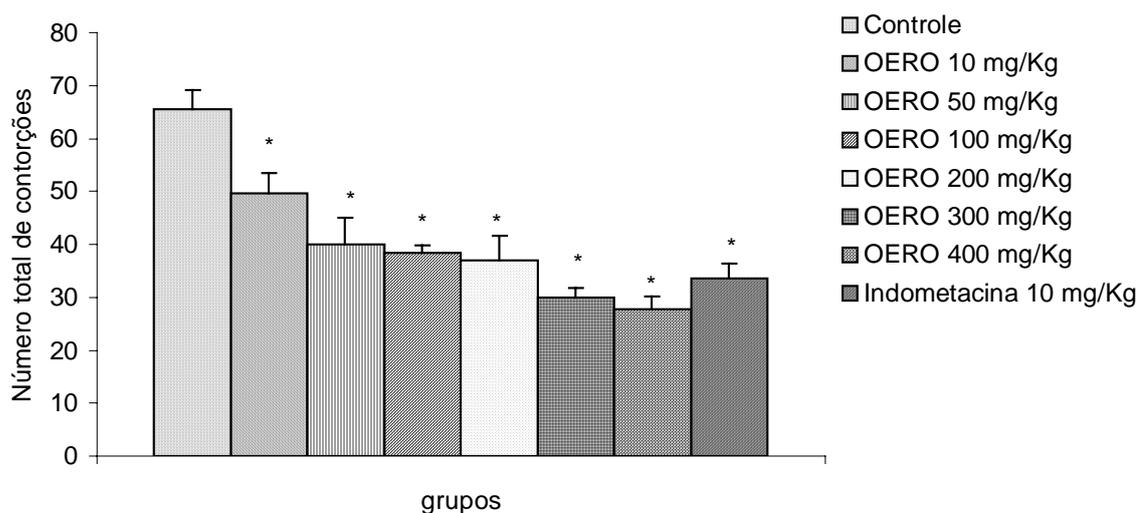


Figura 4. Efeito da administração (p.o.) de OERO (10, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre contorções induzidas por ácido acético 1% (i.p.).

5.4 Teste do granuloma

A administração diária de 300 mg/kg v.o do OERO, durante seis dias, inibiu a formação do tecido granulomatoso em 59%, enquanto que, no grupo tratado com dexametasona 0,2 mg/kg por via oral, a inibição foi de 78% .(Figura 4). Estes resultados foram significativos para $p < 0,001$ (Teste “t” de Student), quando comparados com o grupo controle entretanto, os resultados dos grupos OERO e dexametasona não foram estatisticamente diferentes (Figura 5).

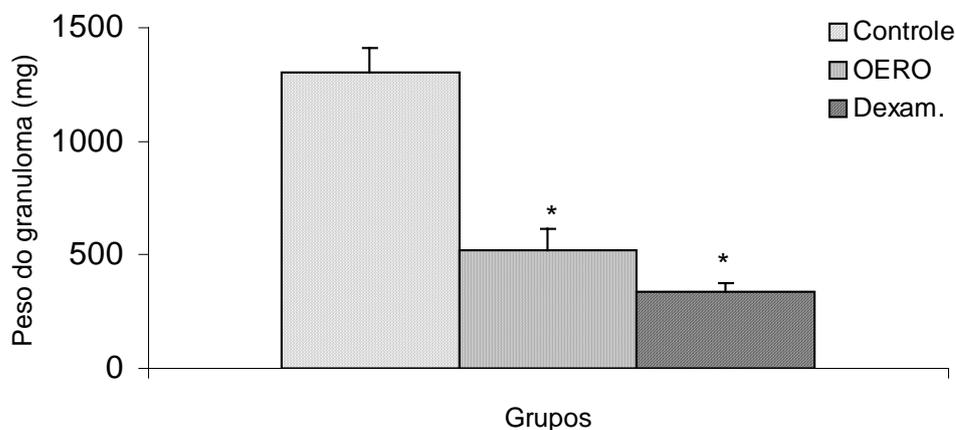


Figura 5. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg v.o.), dexametasona (0,5 mg/kg v.o.), durante seis dias, sobre a formação do tecido granulomatoso. As barras representam a média \pm EPM de 8 animais. * $p < 0.05$ teste “t” de Student.

5.5 Dermatite induzida pelo óleo de croton

A aplicação do óleo de croton (1 mg/orelha) produziu edema intenso por 6 horas. A figura 5 mostra que o OERO, na dose de 300 mg/kg v.o., provocou efeito inibitório significativo ($p < 0.05$) quando comparado com o grupo controle, inibindo o processo edematogênico em 77%, efeito este semelhante ao observado com 2,5 μ g/orelha de dexametasona, que foi de 72% (Figura 6).

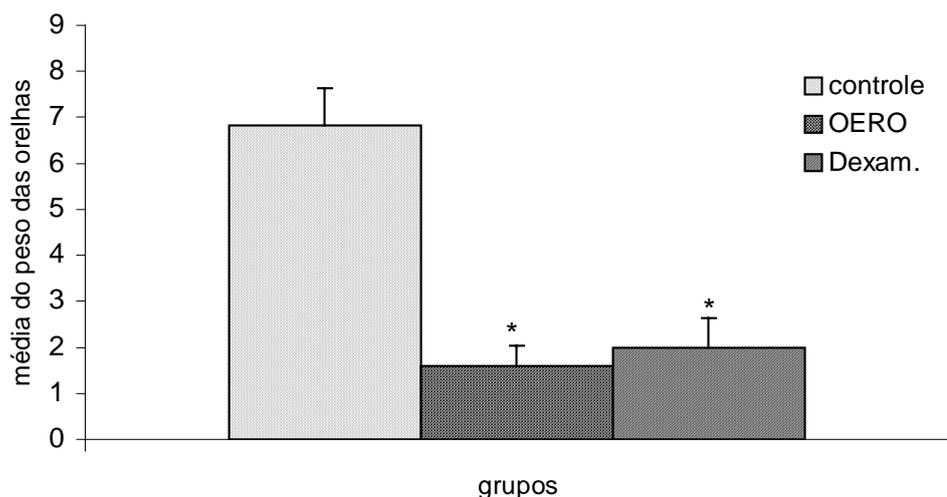


Figura 6. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg) e dexametasona (0,5 mg/kg), sobre o edema induzido por óleo de croton em camundongos. As barras representam média \pm EPM. * $p < 0.05$, teste “t” de Student.

5.6 Permeabilidade vascular em ratos

Pela aplicação da histamina foi possível observar o aumento da permeabilidade vascular, detectada pelo grande extravasamento do corante azul de Evans no grupo controle, tratado somente com solução de tween 5%. Entretanto, o tratamento por via oral com o OERO, trinta minutos antes da aplicação do mediador inflamatório, foi capaz de antagonizar a resposta à histamina. Esta resposta foi significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, teste “t” de Student), inibindo a permeabilidade vascular em 50%, enquanto que no grupo tratado com ciproceptadina a inibição foi de 70% (Figura 7).

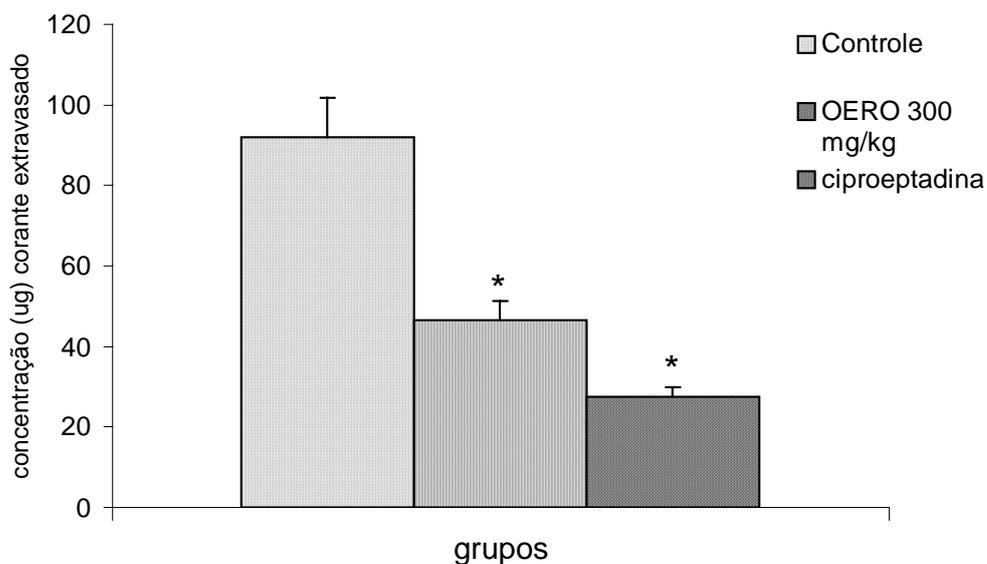


Figura 7. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o.) e ciproeptadina (10 mg/kg, v.o), sobre a permeabilidade vascular induzida por histamina em ratos. As barras representam média \pm EPM. * $p < 0.05$, teste “t” de Student.

5.7 Teste da formalina

O tratamento dos animais com o OERO (300 mg/kg, v.o.) produziu inibição da fase I do processo hiperálgico de 40% ($p < 0.05$, teste “t” de Student), enquanto a inibição da fase II foi de 48%. As inibições das fases I e II pelo OERO não foram estatisticamente diferentes, entretanto, foram diferentes das provocadas pelo tratamento com morfina (5 mg/kg, i.p), que foram de 83% e 92%, respectivamente (Figura 8).

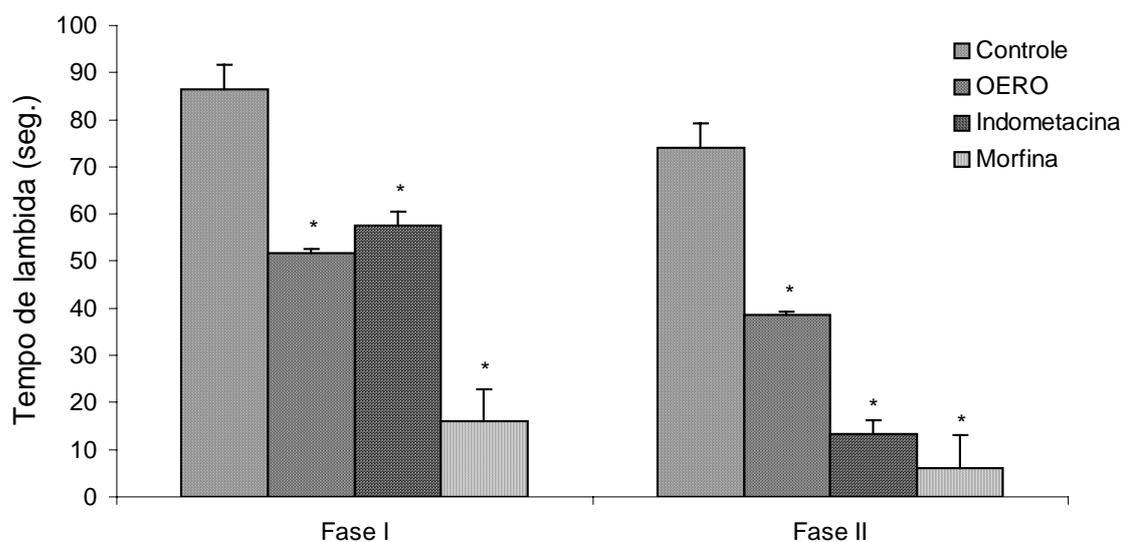


Figura 8. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, i.p), sobre a hiperalgesia induzida pela aplicação da formalina em camundongos. As barras representam média \pm EPM. * $p < 0.05$, teste “t” de Student.

5.8 Placa quente em camundongos

Neste teste, os animais tratados com o OERO (300 mg/kg, v.o.), apresentaram tempos de latência maior que os tempos basais, medidos antes da administração, como também em relação ao grupo controle (tratado somente com a solução de tween 5%), sendo tal diferença tal diferença, contudo, não significativa. Mas, a ação no grupo tratado com morfina (4 mg/kg, i.p) foi efetiva, aumentando o tempo de latência de maneira significativa (Figuras 9 e 10).

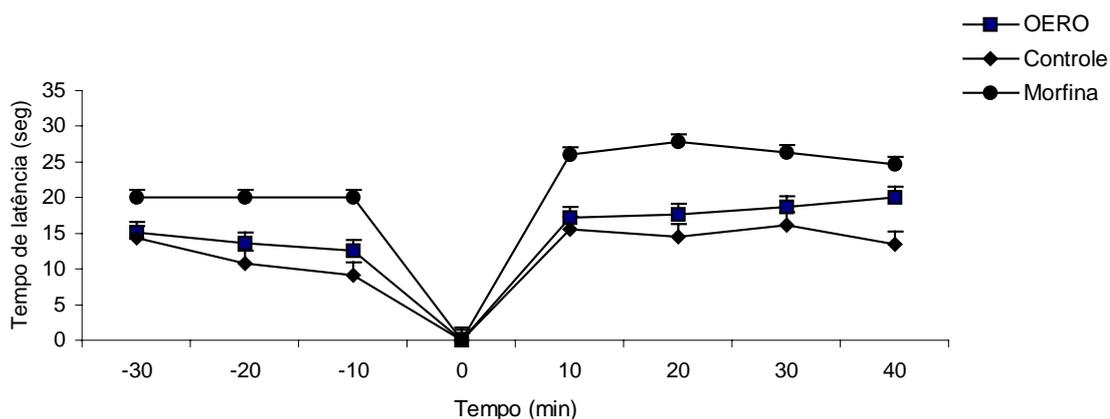


Figura 9. Efeito da administração do OERO (300 mg/kg, v.o) e morfina (4 mg/kg, i.p), sobre o tempo de latência em teste de placa quente em camundongos. Cada ponto representa a Média \pm EPM.

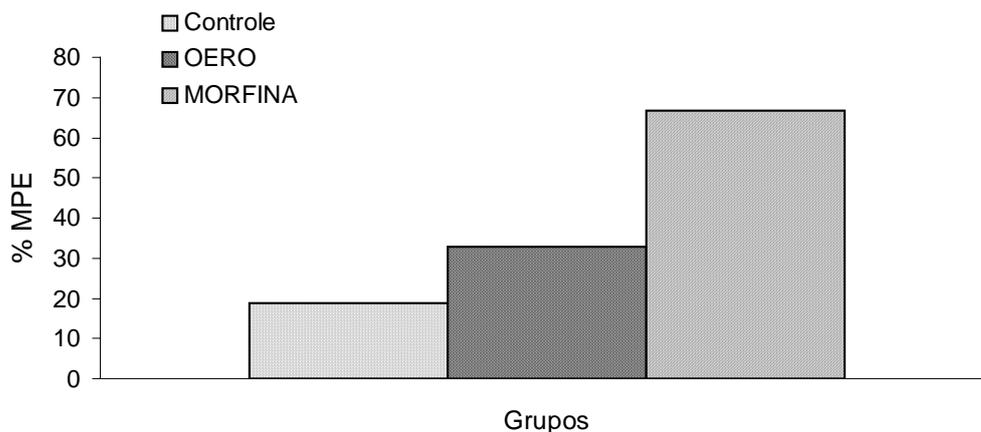


Figura 10. Índice de analgesia do tratamento com OERO (300 mg/kg, v. o.) e morfina (4 mg/kg, i.p.) , em teste de placa quente. As barras representam o índice %.

5.9 Teste para avaliação da potência em relação a lesão gástrica (lesões agudas induzidas por estresse)

Neste experimento, observou-se que o tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg, v.o.) produziu um maior número de lesões, quando comparado ao tratado com o OERO, na dose de 300 mg/kg (v.o) (Tabela 1). O grupo

tratado com o OERO inibiu em 44% o número de lesões gástricas por estresse quando comparado ao grupo controle (Tabela 1); entretanto esta inibição foi estatisticamente diferente da do grupo tratado com cimetidina (100 mg/kg), que foi de 79%.

Tabela 1. Efeito da administração de OERO (300 mg/kg, v.o), indometacina (10 mg/kg, v.o) e cimetidina (100 mg/kg, v.o), sobre a mucosa gástrica de ratos submetidos à restrição alimentar e estresse por imersão em água por 17h.

Tratamento	n	Dose (mg/kg)	Tipos de lesões			Índice de úlceras
			1+	2+	3+	
Tween 5%	5	0,5 mL	42 ± 1,6	46 ± 1,7	34 ± 1	47,2
OERO	5	300,0	18 ± 0,8	22 ± 1,5	23 ± 1,9	26,2
Indometacina	5	10,0	84 ± 2,4	62 ± 2,4	53 ± 1,7	73,4
Cimetidina	5	100,0	26 ± 0,97	7 ± 1,4	3 ± 0,6	9,8

6 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2004). A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento. Este fato também colabora para a sua concentração no vegetal (TEUSCHER, 1990). No caso da espécie estudada, *Rosmarinus officinalis*, o rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação foi de 1,4%. Angioni et al. (2004) extraíram óleo essencial de amostras de *Rosmarinus officinalis* L. coletadas na região de Sardenha, Itália, e obtiveram rendimentos que oscilaram de 0,48 a 1,75%; portanto, o resultado obtido para a amostra estudada encontra-se dentro dos padrões descritos para esta espécie.

Quanto à composição fitoquímica do óleo essencial, Carvalho & Almança (2003) relataram que o óleo essencial é composto principalmente por acetato de bornila, borneol, linalol. Já em 2000, Pappas identificou 41 componentes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., ecotipo verbenona da região da Córsega, Espanha, correspondentes a 96,37% do total detectado. Os componentes majoritários identificados foram: alfa-pineno (23,41%), bornil-acetato (12,31%), borneol (8,96%), cânfora (8,7%), verbenona (7,27%), e canfeno (7,11%). Angioni et al. (2004) identificaram trinta componentes no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* obtido por hidrodestilação e arraste de vapor, sendo que as amostras vegetais foram coletadas em diferentes latitudes e longitudes da Sardenha, Itália. Os principais componentes detectados foram alfa-pineno, (-) borneol, canfeno, cânfora, verbenona e bornil-acetato.

Há a necessidade de se caracterizar os padrões de toxicidade de óleos essenciais, principalmente pelo fato de tratar-se de uma mistura complexa de compostos apolares altamente lipossolúveis, o que facilita a ação sobre o sistema nervoso central (CARVALHO, 2004). Entretanto, quanto aos aspectos comportamentais tóxicos e de letalidade em camundongos, este produto mostrou-se

seguro, sendo que até a dose de 5000 mg/kg não levou os animais a óbito, não sendo possível a determinação da DL₅₀.

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas, que induz resposta inflamatória local mensurável. O teste do edema de pata de rato, induzido por carragenina, é o modelo mais utilizado para avaliar efeito antiinflamatório de drogas. Apresenta duas fases inflamatórias e uma terceira não caracterizada. Na primeira hora, logo após injeção da carragenina, há aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é ocasionado por cininas. Na terceira hora, o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido à ação das prostaglandinas (MELLO, 2002). O OERO, neste ensaio, produziu efeito dose-resposta, optando-se pela dose de 300 mg/kg para a aplicação em todos os outros experimentos pelo fato desta dose ter sido a mais adequada à dose efetiva.

O OERO, a partir da dose de 200 mg/kg, inibiu o edema por carragenina de forma significativa no pico máximo do edema, sugerindo interferir nos mecanismos desencadeados pela carragenina. Santos e Rao (2000) demonstraram os efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do 1,8-cineol, composto presente em grande quantidade nos óleos essenciais de diferentes quimiotipos de *Rosmarinus officinalis*, o que pode justificar a ação apresentada do OERO sobre o edema de pata por carragenina.

Quando são injetadas substâncias irritantes intraperitonealmente em camundongos, é manifestada uma síndrome caracterizada por contorções intermitentes do abdômen, torção do tronco e extensão das patas traseiras. Ocorre lesão tecidual e liberação de mediadores da inflamação, responsáveis pela indução do estímulo nociceptivo que pode ser bloqueado por anestésicos locais e substâncias analgésicas (GARCIA-GONZÁLEZ et al., 2000). O OERO, a partir da dose de 10 mg/kg até a dose de 400 mg/kg, apresentou efeito inibitório dose-dependente significativo sobre o processo hiperalgésico desencadeado pela aplicação de ácido acético. O fato relevante deste resultado é que a DE₅₀ de 261 mg/kg, determinada neste experimento, condiz com a encontrada no ensaio de edema de pata por carragenina, que foi de DE₅₀ = 212 mg/kg, demonstrando, assim, que os mesmos mecanismos estão envolvidos na inibição do edema e das contorções, já que no último processo estão envolvidas no desencadeamento do

processo de hiperalgesia as prostaglandinas do tipo $PGE_{2\alpha}$ e $PGF_{2\alpha}$ e sistema adrenérgico (CARVALHO et al., 2004).

As fases que caracterizam o ensaio de granuloma (fase transudativa, exsudativa e proliferativa) estão relacionadas com os fenômenos ocorridos durante o processo inflamatório (SWINGLE e SHIDEMAN, 1972). Os fenômenos básicos são comuns a qualquer tipo de inflamação, e independem do agente inflamatório. Dividem-se em cinco etapas, podendo ocorrer concomitantemente. A fase transudativa corresponde à fase irritativa e à vascular, onde há liberação de mediadores e aumento da permeabilidade vascular. A fase exsudativa caracteriza-se por exsudato celular e plasmático. Apresenta, ainda, uma 4ª fase, degenerativa-necrótica e uma 5ª, correspondente à proliferativa, que é a produtiva-reparativa (CORRÊA e NOVELLI, 2000).

No teste do granuloma, o tratamento com o OERO desencadeou inibição altamente significativa quando comparado com o grupo controle ($p < 0,001$). Foi demonstrado, assim, seu efeito antiinflamatório semelhante ao observado para os fármacos antiinflamatórios esteroidais, tais como a dexametasona utilizada neste experimento, cuja inibição foi de 78% (Figura 5).

O teste de eritema em orelha de camundongos, induzido por óleo de croton, é o mais utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória tópica de novas drogas. O óleo de croton é irritante vascular, causando infiltração leucocitária de polimorfonucleares, edema intracelular e dermatite tópica. Na fase inicial, há degranulação dos mastócitos. Em roedores, esses grânulos contêm mediadores inflamatórios com predominância de serotonina (MONTELLO e MARTINS, 2002). Todo este processo é inibido com o uso de um antiinflamatório esteroidal, o que foi demonstrado no experimento, em que a dexametasona foi usada como controle positivo inibindo em 72%, e o grupo tratado com o OERO, em 77%, demonstrando, assim, que este princípio ativo interfere sobre o processo de geração dos produtos da cicloxigenase, gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico presentes quando aplicado o óleo de croton (INOUE, MORI e SHIBATA 1989; YOUNG e DE YOUNG, 1989).

Zibetti et al. (2002) evidenciaram a participação da serotonina na hiperalgesia, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia de leucócitos. No teste da permeabilidade vascular realizado, foi utilizada somente histamina como agente

estimulante, e o tratamento com o OERO antagonizou a ação deste mediador inflamatório, inibindo o processo em 50% (Figura 7).

A inflamação aguda causa aumento da permeabilidade vascular, liberando substâncias mediadoras do processo inflamatório, sendo a histamina de grande importância no estágio inicial desse processo por ser mediadora da resposta monofásica da permeabilidade. Liga-se aos receptores H_1 da célula endotelial, provocando contração dessa célula e extravasamento de substâncias para o espaço intersticial (RANG et al., 2004). A ciproheptadina foi usada como fármaco padrão inibidor de receptor H_1 . A resposta apresentada pelo tratamento com o OERO demonstra a eficácia deste sobre processo inflamatório agudo.

O modelo da formalina é um método para estudar-se a antinocicepção central, que ocorre na fase aguda. Ao administrar a formalina intraplantar, as fibras C aferentes são estimuladas, ocorrendo dor aguda que persiste por cinco a dez minutos, com período de aquiescência de vinte a trinta minutos, quando acontece a fase tardia causada por inflamação e estimulação neuronal da medula espinhal (PINI et al., 1997). No mecanismo da geração da dor por formalina, há o envolvimento dos receptores pós-sinápticos NMDA (N-metil-*D*-aspartato), que respondem às fibras C e A delta. Esses receptores estão associados com processos de aprendizagem e memória, estados dolorosos agudos e crônicos. Quando o estímulo sobre as fibras C é repetitivo, ocorre o “wind-up”, havendo ampliação dos campos receptivos e da resposta dos neurônios nociceptivos espinhais, que liberam glutamato e substância P, que estimulam os receptores NMDA. Este complexo ativa a proteína C quinase, através da cascata de inositol, sendo sintetizados óxido nítrico e prostaglandinas. Esse processo leva à hiperalgesia secundária (WEI, F., 2001; SUÁREZ, I. et al., 2005).

O resultado do tratamento com o OERO no teste de formalina, na fase aguda, mostrou alta significância ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle, tratado com solução de tween 5%. Na fase tardia (fase II), que caracteriza a dor inflamatória, o tratamento com o OERO inibiu esta fase de maneira altamente significativa ($p < 0,001$). O efeito mostrou-se similar ao apresentado pela indometacina, confirmando o efeito analgésico periférico do OERO, sugerindo inibição da produção de prostaglandina, já que foi efetivo também no teste de contorções em camundongos.

O teste da placa quente não mostrou resultados significativos quando comparado o OERO com o grupo controle; apenas houve significância ($p < 0,001$) para os resultados obtidos com o tratamento com morfina, que apresentou tempo de latência superior ao OERO e ao controle.

A morfina é um analgésico opióide, que apresenta ação sobre o sistema nervoso central, aumentando o limiar da dor. Vários estudos têm sido realizados para verificar o mecanismo de ação de AINE. O Paracetamol-acetaminofen também apresenta ação central, diminuindo a concentração de PGE_2 no cérebro devido a inibição da terceira isoenzima ciclooxigenase (COX-3). Enquanto outros AINE, como a indometacina, apresentam ação periférica (BOTTING e AYOUB, 2005).

Sugere-se para o OERO um modo de ação semelhante ao indometacina, ou seja, periférica. O índice de analgesia para morfina foi de 66,8%, enquanto para o OERO foi de 32,72%. Este resultado, apresentado no ensaio de placa quente, não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, apesar de apresentar um tempo de latência superior a este; já a morfina, por aumentar o limiar da dor e agir ao nível central, diferentemente dos AINE foi efetiva (RANG et al., 2004).

O extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* promoveu diminuição de lesão gástrica ulcerativa produzida por indometacina, etanol e reserpina em ratos devido à atividade antioxidante dos compostos presentes neste extrato (DIAS et al., 2000). Estes pesquisadores sugeriram que o mecanismo farmacológico envolvido nesta ação não estaria relacionado com óxido nítrico nem com prostaglandinas, mas com aumento de radicais sulfidríla não protéico ou com a atividade antioxidante dos compostos presentes neste extrato.

Em 2002, Repetto e Llesuy mostraram a evidência da participação da espécie reativa do oxigênio na etiologia e fisiopatologia de doenças humanas como desordens neurodegenerativas, inflamações, infecções virais, doenças auto-imunes e distúrbios do sistema digestivo (inflamação gastrintestinal e úlcera gástrica), assim como a proteção conferida por compostos naturais com atividade antioxidante. Experimentos demonstraram efeito citoprotetor de determinadas espécies vegetais impedindo, ou reduzindo, o efeito do estresse oxidativo na úlcera gástrica induzida por etanol.

A citoproteção gástrica é conferida por algumas substâncias, como as prostaglandinas. Os AINEs desencadeiam ação inibitória sobre a ciclooxigenase

inibindo a formação de prostaglandinas, tendo como efeito adverso os danos gástricos, principalmente quando não são COX-específicos, inibindo tanto COX-1 como COX-2 (CARVALHO, 2004). A indometacina é um potente analgésico e antiinflamatório, porém causa grandes danos na mucosa gástrica, como foi confirmado nesse experimento. O tratamento com o OERO produziu 64% menos danos ulcerativos que a indometacina.

A COX-1 está constitutivamente presente em muitos tecidos e é responsável pela produção fisiológica de prostanóides homeostáticos e citoprotetores da mucosa gástrica, endotélio, plaquetas e rins. O OERO, nas condições do experimento, mostrou efeitos menos danosos à mucosa gástrica, apresentando menor índice de lesões com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado à indometacina e diferença não significativa quando comparado à cimetidina que é um fármaco protetor da mucosa gástrica. Esses resultados sugerem uma ação protetora da mucosa gástrica, como a encontrada para o extrato desta espécie vegetal por Dias et al. (2000), e sustenta-se a hipótese de que, apesar do OERO atuar sobre os processos inflamatórios experimentais semelhantes a inibidores da COX, entretanto, neste óleo deve estar presente algum marcador farmacológico que induz uma citoproteção, já que a inibição da geração de úlcera gástrica foi somente de 44%. Outro fato importante é que o OERO apresenta propriedades antioxidativas podendo auxiliar no processo preventivo da formação de úlceras induzidas por estresse.

Carvalho et al. (2004) descreveram as atividades antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*. Este estudo realizado com o OERO confirma as propriedades antiinflamatória e analgésica do espécime estudado.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos diversos experimentos, sugerem-se as seguintes hipóteses:

a) O OERO apresenta atividade antiinflamatória sobre processos inflamatórios agudo e crônico;

b) A ação antiinflamatória do OERO é similar à dos antiinflamatórios inibidores da COX;

c) O OERO apresenta atividade analgésica;

d) A ação analgésica do OERO é caracterizada como ação antiálgica, já que não atuou sobre os modelos que caracterizam uma possível ação sobre o sistema nervoso central;

e) Apesar da atividade antiinflamatória do OERO ser característica de compostos não esteroidais, este provoca pouca interferência deletéria sobre a mucosa gástrica;

f) O OERO por via oral apresenta alto grau de segurança;

g) A atividade antiinflamatória e analgésica da espécie *Rosmarinus officinalis* deve-se a compostos terpênicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S.. Imunologia Celular e Molecular. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 302 p.
- ABE, F. et al.. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. Biol Pharm Bull, v.11, p. 1485-1487, nov. 2002.
- ALBU, S. et al.. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrason Sonochem, v. 11, n. 3 - 4, p. 261-265, may 2004.
- ANGELINI, L. G. et al.. Essential Oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. J Agric Food Chem., v. 51, n. 21, p. 6158 - 6164, oct. 2003.
- ANGIONI, A. et al.. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. J Agric Food Chem., v. 52, n.11, p. 1297-1301, june 2004.
- BACKLEH, M.; LEUOLD, G. ; PARLAR, H.. Rapid quantitative enrichment of carnósic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. J agric food Chem, v.51, n. 5, p.1297-1301, feb. 2003.
- BASILE, A. C. et al.. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. In: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. Journal of Ethnopharmacology, v. 30, p. 185 – 1977, 1990.
- BECKETT, K. A.. Hierbas Aromáticas. Barcelona : Ediciones Folio, 1988. 76 p.
- BESSETE, S. M.L; LINDSAY, A. D.; ENAM, E. E.. Pesticidal compositions containing rosemary oil and wintergreen oil. United States Patent Application 20030194454; Kind Code A1, October 16, 2003.
- BOTTING R.; AYOUB S. S.. Cox-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. V. 72, n. 2, p. 85 - 87, 2005.
- CARVALHO, J. C. T. ; ALMANÇA C. C. J.. Formulário de Prescrição Fitoterápica. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 49 - 65.
- CARVALHO, J. C. T.. Fitoterápicos Antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmed, 2004. 480 p.
- CARVALHO, J. C. T.; et al. Untersuchung der antiinflammatorischen und analgetischen Aktivität des hydroalkoholischen Rohextraktes von Rosmarin. Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren. v. 45, n.11, 2004.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.. Bioquímica Ilustrada. Trad. Ane Rose Bolner. 2 ed., Porto alegre: artes Médicas Sul (ARTMED), p. 271, 2002.
- CERVELLATI, R, et al. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. J Agric Food Chem, v. 50, n. 26, p. 7504 -7509, dec. 2002.

CONSTANZO, L. S.. Fisiologia.. Tradução Antônio José Magalhães da Silva Moreira; Adilson Dias Salles; João Paulo de Campos. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 464 p., 2004

CORRÊA, L. ; NOVELLI, M. D.. Patologia Geral: Inflamação. São Paulo: Faculdade de Odontologia, USP, 2000. acesso em <www.fo.usp.br/lido/patoartegeral>.

CUNHA F. M. da, et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. Free Radic Res., Florianópolis, v. 38, n.11, p.1241 -1253, 2004.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N. & POLISSIOU ,M. G.. GC-MS. Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J Agric Food Chem, v. 48, n. 6, june 2000.

Del BANO, M. J.; LORENTE, J, et al. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*, postulation of a biosynthetic pathway. J Agric Food Chem. v. 52, n.16, p. 4987 - 92, 2004.

DIAS, P. C, et al. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. J Ethnopharmacol, v. 69, n. 1, p. 57 - 62, jan.2000.

ESTEVEZ M, et al. Analysis of volatiles in porcine liver with added sage and rosemary essential Oil by using SPME-GC-MS. J Agric Food Chem, v. 52, n. 16, p. 4992, aug. 2004.

FLAMINI, G, et al. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. J Agric Food Chem, v. 50, n. 12, p. 3512 - 3517, jun. 2002.

GALEY, G. I, et al. Modulation of phospholipid metabolism in murine keratinocytes by tumor promoter, 12-O-tetradecanoyl-13-acetate. Journal of Investigation in Dermatology. v.85,p. 319-323, 1985.

GARCIA-GONZÁLEZ, A, et al. Superoxid dismutase and naproxen in the very late phase of carragenin induced edema in rats. Ver. Invest. Clin, v. 52 , n. 2, p. 56 -160, 2000.

GEDNEY, J. J.; GLOVER, T. L. ; FILLINGIM, R. B.. Sensory and affective pain discrimination after inhalation of essential oils. Psychosom Med., v. 66, n. 4, p. 599 - 606, jul/aug 2004.

GEMTCHÚJNICOV,I. D. de.. Manual de Taxonomia Vegetal:plantas de interesse econômico,16 ed. São Paulo: Ed.Agronômica Ceres, 1976. p. 268 - 269.

GERMANO, D. H. P.; SERTIÉ, J. A.; BACCHI, E. M.. Pharmacological assay of *Petivaria alliaceae*. II: Oral anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a hidroalcoholic root extract. Fitoterapia. v. 66, p. 195 – 202, 1995.

GOODMAN ; GILMAN. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman, 2001. 1825 p.

- GRATCHEV A, et al. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. Scand J Immunol. v. 61, n. 1, p.10 -17, 2005.
- HALOUI, M, et al. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *e erytrea*. J Ethnopharmacol, v. 71, n. 3, p. 465 - 472. 2000.
- HOSSEINZADEH, H. ; NOURBAKHS, M.. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. Phytother Res., v. 17, n. 8, p. 938 - 941, 2003.
- IBANEZ, E, et al. Performance liquid cromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis l*). J Agric Food Chem, v. 48, n. 9, p. 4060 - 4065, 2000.
- INOUE, H.; MORI, T.; SHIBATA, Y.. Modulation by glyceric acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. British Journal of Pharmacology, v. 96, p. 204 - 210, 1989.
- JACOB, J. J. C.; RAMABADRAN, K.. Enhancement of a nociceptive reaction by opiate antagonist mice. British Journal of Pharmacology, V. 64, p. 91 – 98, 1978.
- JACOB, J. J. C.; TREMBLAY, E. C.; COLOMBEL, M. C.. Facilitation the reaction nociceptives by naloxone in mices and rats. Psychopharmacology. V. 37, p. 213 – 223, 1974.
- JOHNSON, B. M.; BOLTON, J. L. ; VAN BREEMEN, R. B.. Screening botanical extracts for quinoid metabolites. Chem Res Toxicol, v. 14, n. 11, p. 1546 -1551, nov. 2001.
- JOLY, A. B.. Família Labiatae. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Cia Editora Nacional, p. 582 - 586, 1987.
- KIEFER, W. ; DANNHARDT, G.. Novel insights and therapeutical application in the field of inhibitors of COX-2. Curr Med Chem, v. 11, n. 24, p. 3147 - 3161, dec. 2004.
- KIM, H. Y. ; KIM, K.. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. J Agric Food Chem, v. 51, n. 6, p. 1586 - 91, mar. 2003.
- KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. 4ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan. 2001. 127 p.
- KOSAKA, K. ; YOKOI, T.. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes syntesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. Biol harm Bull, v. 26, n. 11, p. 1620 - 1622, 2003.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M. ; BEER, E. J.. Acetic for analgesic screening. Federation Proceedings, v. 18, p. 4112, 1959.
- LEE JK, WON JS, SINGH AK, SINGH I.. Adenosine kinase inhibitor attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. Neuropharmacology, v. 48, n.1, p. 151 - 160, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas no Brasil. São Paulo: Instituto Plantarum de Estados da Flora LTDA, 2002. 261 p.

LYKBE, A. M. J.; CUMMINGS, R.. inflammation an healing. 1. Time – course and meditation of exsudation in wound healing in the rat. British Journal of Experimental Pathology, v. 50, p. 309 – 318, 1969.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C.. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. Lloydia. V. 25, p. 320 – 332, 1962.

MATOS, F. J. A.. Plantas medicinais. Fortaleza :Imprensa universitária, 2000.

MEIER, R.; SCHULER, W.; DESAULLES, P. L.. Usnic Acid: tumor inibitor isolated from lichens. Experimentia, v. 6, p. 469 – 471, 1950.

MELLO, C. B.. Inibição de edema de pata de camundongos induzida por carragenina. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia. Resumos, SBFTE, 2002. 36 p.

MONTELLO, M. S. A.G.; MARTINS, R. A. B. L.. Efeito da terapia com laser de baixa potência na dermatite induzida por óleo de croton em orelha de camundongo. São José dos Campos: UNIVAP. 2002. 67 p.

MORETTI, M. D. L. et al.. Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. AAPS Pharma Sci Tech, v. 3, n. 2, 2002.

MOSS, M, et al.. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. Int J Neurosci, v. 113, n. 1, p. 15 - 38, jan. 2003.

MUNNE-BOSCH, S.; ALEGRE, L.. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. Plant Physiol, v. 125, n. 2, p. 1094 –102, feb. 2001.

MUNE-BOSCH, S.; ALEGRE, L.. Drought-induced changes in the redox state of alpha-tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in cloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. Plant Physiol., v. 13, n. 4, p. 816 - 825, aug. 2003.

MUSTARD, J. F. et al.. Release of permeability factors from blood platelet. Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine, v. 119, n. 4, p. 981 – 988, 1965.

NAKATANI, N.. Phenolic antioxidants from herbs and spices. Biofactors, v. 13, n. 1-4, p. 141 -146, 2000.

NIEMEGEREERS et al.. The activity of suprofen on nystatin – induced paw oedema in rats. Arzneimittel Forschung, v. 23, p. 1516 – 1519, 1975.

NOGUES, S.; BAKER, N. R.. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. J Exp Bot, v. 51, n. 348, p. 1309 - 1311, july; 2000.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S.. Antibacterial and resistance modifying of *Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry, v. 65, n. 24, p. 3249 - 3254, dec. 2004.

OZCAN, M.. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. J Med Food., v. 6, n. 3, p. 267-270, 2003.

PAPPAS, R. S.. Certificate of Analysis- Certified Organic Rosemary verbenone Oil (ECOCERT, DEMETER). Journal of Experimental Botany, v. 51, n. 348, p. 1309 - 1317, July, 2000. Oxford University Press. Disponível em: <http://www.essentialoils.org/rosemary_verbenone.htm>. Acesso em: www.google.com.br

PINI, L. A. et al.. Reversible antinociception by paracetamol in the rat. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. v. 280, p. 934 - 940, 1997.

PRUSAKIEWICZ, J. J. et al.. Molecular basis of the time-dependent inhibition of cyclooxygenase by indometacin. Biochemistry, v. 43, n. 49, p. 15439 -15445, 2004.

RABABAH, T. M.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger rosemary, gotu kola and ginkgo extracts, vitamin E and tert-butylhydroquinone. J Agric Food Chem, v. 52, n. 16, p. 5183 - 5186, 2004.

RAMIREZ, P. et al.. Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. J Chromatogr A, v. 19, n. 1 - 2, p. 241 - 245, nov. 2004.

RANG, H. P. et al.. Farmacologia. Tradutores: Patrícia Lydie Voeux, Antônio José 904p., Magalhães da Silva Moreira. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004. 904 p.

REPETTO, M. G. ; LLESUY, S. F.. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Braz J Med Biol Res, v. 35, n. 5, p. 523 - 534, may 2002.

SANCHES-BLANCO, M. J. et al.. Effects of irrigation and air humidity preconditioning on water relations, growth and survival of *Rosmarinus officinalis* plants during and after transplanting. J Plant Physiol, n. 161, v.10, p. 1133 -1142, oct. 2004.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother. Res, v. 14, n. 4, p. 240 - 244, jun. 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 664 p.

SOTELO-FELIX, J. L. et al.. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. J Ethnopharmacol, v. 81, n. 2, p. 145 – 154, jul. 2002 a.

SOTELO-FELIX, J. L. et al.. Protective effect of carnosol on CCL(4) – induced acute liver damage in rats. Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 14, n. 9, p. 1001 - 1006, sept. 2002 b.

STAHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; MARTINEZ, J. R.. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in –vitro antioxidant activity. Anal Bional chem., v. 373, n. 1 - 2, p. 70 – 74, may 2002.

SUAREZ, I. et al.. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. Brain Res, v. 1047, n. 2, p. 205 – 213, jun. 2005.

SWINGLE, K. F. ; SHIDEMAN , F.E .Phases of the inflammatory response to subcutaneous of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. p. 226 - 234, 1972.

TAKAGI, K. ; KASUYA. ; WATANABE . K .. Studios on the drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcer in rats. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 12, p. 465 - 472, 1964.

TAKAGI, K., OKABE, S.. The effects of drugs on tho prodution and recovery processos processes of stress ulcer. Janese Journal of Pharmacology, v. 18, p. 9 - 18, 1968.

TEUSCHER, E.. Pharmazeutische Biologie. Braunschweig; Vieweg, 1990.

TORRE, J, et al. Simple high-performance liquid chromatography method for alpha-tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves. New data on alpha-tocopherol content. J Chromatogr A, v. 919, n. 2, p. 305 - 311, june 2001.

TORTORA, G. J. ; GRABOWSKI, S. R.. Princípios de Anatomia e Fisiologia. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

VALENZUELA, A, et al. Inhibitory action of conventional food-grade natural antioxidants and of natural antioxidants of new development on the thermal-induced oxidation of cholesterol. Int J Food Sci Nutr., v. 55, n. 2, p.155 - 162, mar. 2004.

VIJAYAN, P, et al. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. Indian J Med Res. V. 120n n.1, p. 9 -11, july 2004.

WEI, F.. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain. NBR2B over expression. Nature Neuroscience, p.164 - 169, 2001.

WELLWOOD, C. R. ; COLE, R. A.. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis L.*, accessions for optimization of antioxidant yield. J Agric Food Chem, v. 52, n. 20, p. 6101 - 6107, oct. 2004.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W.. Carragenin – induced oedema in the hind paw of the rat as na assay for anti – inflammatory drugs. Proceeding of the Society of experimental Biology and Medicine, n. 111, p. 544, 1962.

YODFAT, Y.. Is there a future for COX-2 inhibitors? Harefuah. v. 143, n. 11, p. 820 – 824 - 837, nov. 2004.

YOUNG, J. M. ; YOUNG, L. M.. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. Alan R. Liss. In: Pharmacological Methods in the control of inflammation, New York, p. 215 – 231, 1989.

ZIBETI, et al.. Estudo da resposta nociceptiva relacionada ao sistema serotoninérgico em camundongos através do teste da chapa quente. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Resumos, SBFTE, p. 3, Águas de Lindóia, 2002.

ZENG, H. H; et al. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. Acta Pharmacol Sin, v. 22, n. 12, p.1094 - 1098, dec., 2001.

ZHENG, Z. ; SHETTY, K.. Azo dye-mediated regulation of total phenolics and phenolics and peroxidases activity in thyme (*Thymus vulgaris L.*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) clonal lines. J Agric Food Chem, v. 48, n. 3, p. 932 - 937, mar., 2000.