



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

CAMILA CAROLINA DE MENEZES PATRÍCIO SANTOS

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO FITOL
EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

JOÃO PESSOA
2011

CAMILA CAROLINA DE MENEZES PATRÍCIO SANTOS

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO FITOL
EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

**JOÃO PESSOA
2011**

S237a Santos, Camila Carolina de Menezes Patrício.
Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol
em modelos in vivo e in vitro / Camila Carolina de
Menezes Patrício Santos.-- João Pessoa, 2011.
124f. : il.
Orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Produtos Naturais. 2. Fitol. 3. Diterpenos. 4.
Atividade antinociceptiva. 5. Atividade antioxidante.

CAMILA CAROLINA DE MENEZES PATRÍCIO SANTOS

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO FITOL
EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovado em: 04 de novembro de 2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida – Orientador – UFPB

Prof.^a Dr.^a Leônia Maria Batista – Examinadora interna – UFPB

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior – Examinador externo – UFS

Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior – Examinador interno – UFPB

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio – Examinador externo – UFPB

*Aos meus pais, Paulo e Goretti, por tudo que sou hoje
e pelo exemplo de amor, fé e união.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, razão de toda minha existência, por todas as bênçãos e vitórias que me proporcionou ao longo de toda minha vida, por ter me dado serenidade, coragem e sabedoria.

Aos meus pais, **Paulo Luis** e **Maria Gorett**, e minha avó **Valdelene** (Leninha), os pilares da minha família, por todo amor e dedicação, apoio e orgulho por todas as vitórias alcançadas.

Aos meus sobrinhos, **Ana Beatriz** e **Paulo Neto**, pelos sorrisos, alegrias e todo amor que sempre me deram força para enfrentar os obstáculos.

A toda minha “**Família Buscapé**”, em especial, meus irmãos, **Sabrina Sávia** e **Filipe Diego**, que fazem parte da minha vida, por todo carinho e por torcerem sempre por mim.

Ao meu amor, **Bruno Bertozzo**, pelo imenso apoio, compreensão, paciência e amor, por todos os momentos estar presente, mesmo com a distância, em todos os dias da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, que depositou toda confiança em mim e que acreditou na minha capacidade. Pela imensa orientação, não só acadêmica, mas principalmente, servindo como exemplo de dignidade ética e honestidade.

À Prof^a. Dr^a. **Liana Clébia S. L. de Moraes**, por ter me acolhido carinhosamente e por todos os ensinamentos de vida.

Ao Prof. Dr. **Damião Pergentino de Sousa**, pelo fornecimento da substância estudada e por todo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. **Rivelilson Mendes de Freitas**, que na reta final desta jornada, contribuiu imensamente para o sucesso deste momento.

A todos os professores desta Pós-graduação, pelos ensinamentos científicos e dedicação. Em especial à Prof^a. Dr^a. **Bagnólia Araújo**, que fez a diferença em minha vida, pois contribuiu com meu crescimento não só em nível acadêmico, mas profissional e pessoal.

À minha turma de doutorado, em especial, aos amigos: **Adriana e Sócrates Golzio**, **Vanine Mota**, **Egberto Carmo**, **Steno Lacerda**, **Vivianne Marcelino**, **Danielle**

Serafim, Aline Macedo, Gabriela Lemos e Anna Cláudia, pela amizade verdadeira que construímos desde o mestrado. Esta vitória conseguimos juntos!

Aos amigos da **psicofarmacologia**, em especial: **Paula Salgado, Rubens Benedito, Mirian Salvadori e Vanine Mota**, amigos fundamentais para a concretização deste momento, e também pelo companheirismo, dedicação e carinho. A duas mulheres que foram companheiras, irmãs, mães e acima de tudo, minhas amigas, **Leandra Oliveira e Marilene Rocha**, que ficarão para sempre no meu coração.

Aos **membros da banca de qualificação e membros da banca da defesa**, pela imensa contribuição dada com as correções e sugestões.

Ao meu amigo, **José Crispim**, que foi fundamental nesta minha jornada, não só pelo apoio técnico, mas principalmente, pelo carinho e amizade cultivados nestes anos de convivência.

Aos funcionários, em especial, **Luis Cordeiro, Tânia Alves e Raquel Régis**, pelo apoio e amizade.

A todos os animais utilizados durante a realização dos testes, meu profundo respeito.

A todos que acreditaram no meu sucesso e torceram por mim!

MUITO OBRIGADA!

*“...Em muita sabedoria, há muita aflição:
quem aumenta o saber, aumenta a dor.”
Eclesiastes 1,8*

RESUMO

SANTOS, Camila Carolina de Menezes Patrício. **Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos *in vivo* e *in vitro***. 2011. 124 p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de traçar um perfil da atividade farmacológica do fitol, um diterpeno álcool. O estudo foi realizado em três etapas: (1) avaliação da toxicidade aguda, (2) avaliação da atividade do fitol sobre o SNC, com enfoque na atividade analgésica, e (3) avaliação da atividade antioxidante. Nas duas primeiras etapas, o estudo foi realizado *in vivo* e na terceira, o estudo foi *in vitro*. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), sendo considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Na primeira etapa, o fitol apresentou baixa toxicidade, sem causar alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais, apresentando uma DL_{50} de 1.153,39 (944,56 – 1.408,40) mg/kg. Nos testes seguintes, o fitol foi administrado intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg. O fitol apresentou perfil de droga depressora do SNC, sem comprometer a coordenação motora dos animais. A atividade antinociceptiva do fitol foi investigada através de modelos químicos (teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e o teste da formalina) e térmico (teste da placa quente) de nocicepção em camundongos. Em todos os testes, o fitol apresentou um efeito antinociceptivo significativo, tanto em nível central como periférico. Contudo, o efeito antinociceptivo do fitol não foi revertido pelos antagonistas naloxona (via opióide) e glibenclamida (canais de K^{+}_{ATP}), indicando que o fitol não atua por esses mecanismos, pelo menos diretamente. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do fitol, foram empregadas três metodologias, sendo uma para avaliar o efeito do fitol sobre a peroxidação lipídica, no teste de TBARS, e as outras duas para investigar se agia como substância sequestradora de radicais livres, para o radical hidroxila (OH) e o óxido nítrico (NO). Em todos os testes, o fitol demonstrou forte atividade antioxidante, a qual pode ser atribuída a sua característica estrutural, uma vez que o fitol é um álcool insaturado de cadeia ramificada, e a propriedade antioxidante pode estar relacionada com o grupo hidroxila (OH) presente na sua molécula. Provavelmente, o fitol, ao reagir com um radical livre, doa átomos de hidrogênio com um elétron desemparelhado ($H^{\cdot}$),

convertendo os radicais livres em espécies menos reativas. Como várias evidências mostram a participação destas espécies reativas no mecanismo da dor, a atividade antioxidante do fitol pode estar contribuindo com o seu efeito antinociceptivo.

Palavras-chave: fitol, diterpenos, atividade antinociceptiva, atividade antioxidante.

ABSTRACT

SANTOS, Camila Carolina de Menezes Patrício. **Antinociceptive and antioxidant activity of phytol in vivo and in vitro models.** 2011. 124 p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

This study was conducted in order to draw a profile of pharmacological activity of phytol, a alcohol diterpene. The study was conducted in three steps: (1) evaluation of acute toxicity, (2) evaluation the activity of phytol on the CNS, focusing on the analgesic activity, and (3) evaluation of antioxidant activity. In the first two stages, the study was conducted *in vivo* and in third, the study was *in vitro*. The results were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (S.E.M.), were considered significant when $p < 0.05$. In the first step, the phytol showed low toxicity, causing no changes in biochemical and hematological parameters of the animals, have been determined the LD₅₀ in 1153.39 (944.56 – 1.408.40) mg/kg. In the following tests, the phytol was administered intraperitoneally (i.p.) at doses of 25, 50, 100 and 200 mg/kg. The phytol showed profile of depressant drugs CNS, without compromising the motor coordination of animals. The antinociceptive activity of phytol was investigated by chemical models (test of abdominal contortions induced by acetic acid and formalin test) and thermal (hot plate test) of nociception in mice. In all tests, the phytol showed a highly significant antinociceptive effect at both the central and peripheral. However, the effect of phytol was not reversed by the antagonists naloxona (opioid system) and glibenclamida (K^{+}_{ATP} channels), demonstrating that at least directly, the phytol does not act by these mechanisms. In the antioxidant activity *in vitro* of phytol through three methodologies, one for evaluating the effect of phytol on lipid peroxidation in the TBARS test, and other two to investigate if the phytol acted as substance scavenging of free radicals to hydroxyl radical (OH) and nitric oxide (NO). In all tests, the phytol showed strong antioxidant activity, which can be attributed to their structural feature, since phytol is a unsaturated alcohol of branched-chain, and antioxidant properties may be related to the hydroxyl group (OH) present in its molecule. Probably the phytol, by reacting with a free radical, donates hydrogen atoms with an unpaired electron ($H^{\cdot}$), converting free radicals into less reactive species. Since several evidences show the involvement of these reactive species in

the mechanism of pain, the antioxidant activity of phytol may be contributing to its antinociceptive effect.

Keywords: phytol, diterpenes, antinociceptive activity, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Vias de transmissão da dor.....	26
Figura 2 –	Mecanismo da peroxidação lipídica.....	35
Figura 3 –	Estrutura química do isopreno.....	40
Figura 4 –	Estrutura química do fitol.....	41
Figura 5 –	Estruturas químicas da clorofila (A), fitol (B) e ácido fitânico (C).....	42
Figura 6 –	Camundongo Swiss albino.....	47
Figura 7 –	Aparelho do <i>rota-rod</i>	50
Figura 8 –	Caixa de observação.....	50
Figura 9 –	Aparelho da placa quente.....	51
Figura 10 –	Representação esquemática do estudo realizado com o fitol.	52
Figura 11 –	Representação esquemática da provável reação entre a molécula do fitol e um radical lipídico (L•) durante a peroxidação lipídica.....	75
Figura 12 –	Representação esquemática da provável reação entre a molécula do fitol e um radical livre (R•), demonstrando a atividade seqüestradora.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Principais antioxidantes e suas funções.....	37
Quadro 2 –	Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental.....	55
Quadro 3 –	Alterações comportamentais observadas em camundongos após a administração do fitol.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses do fitol.....	64
Tabela 2 –	Efeito do tratamento agudo com fitol sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos.....	65
Tabela 3 –	Efeito do tratamento agudo com fitol sobre os parâmetros hematológicos de camundongos.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Efeito do fitol e diazepam sobre o tempo de permanência (s) dos camundongos na barra giratória.....	68
Gráfico 2 –	Efeito do fitol, indometacina e morfina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	69
Gráfico 3 –	Efeito do fitol, indometacina e morfina na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	70
Gráfico 4 –	Efeito do fitol, indometacina e morfina na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	70
Gráfico 5 –	Efeito do fitol e morfina no teste da placa quente em camundongos.....	71
Gráfico 6 –	Efeito do fitol e morfina no teste do ácido acético em camundongos, na presença de naloxona.....	72
Gráfico 7 –	Efeito do fitol e morfina no teste do ácido acético em camundongos, na presença de glibenclamida.....	73
Gráfico 8 –	Efeito do fitol nos níveis de TBARS <i>in vitro</i>	74
Gráfico 9 –	Efeito do fitol na atividade seqüestradora de radicais hidroxila (OH).....	76
Gráfico 10 –	Efeito do fitol na atividade seqüestradora de óxido nítrico (NO).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
° C	Graus Celsius
®	Marca registrada
β	Beta
δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mu
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
AAPH	2,2'-azobis [2metilpropionamidina] diidrocloride
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Receptor ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canais iônicos sensíveis a ácidos
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	Colesterol total
DL ₅₀	Dose letal que mata 50% dos animais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íons ferro
g	Gramas
g/kg	Gramas por quilogramas
GABA	Ácido γ-amino-butírico
GP	Glutathione peroxidase
h	Hora
H ⁺	Íons hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> – lipoproteínas de alta densidade
HO ₂ •	Hidroperoxila
IF-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina 1β

i.p.	Intraperitoneal
K⁺	Íon potássio
K⁺_{2P}	Canal de potássio de dois poros
K⁺_{ATP}	Canal de potássio ativado por ATP
K⁺_{Ca}	Canal de potássio ativado por cálcio
K⁺_{ir}	Canal de potássio retificador de entrada
K⁺_V	Canal de potássio dependente de voltagem
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i> – lipoproteínas de baixa densidade
LOOH	Peróxidos lipídicos
M	Concentração molar
MDA	Malonaldeído
mg/kg	Miligramas por quilogramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
m/s	Metros por segundo
n°	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ng/mL	Nanogramas por mililitros
nm	Nanômetro
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NKI	Receptores de neurocinina I
•NO	Óxido nítrico
•NO₂	Dióxido de nitrogênio
Ns	Nanosegundos
¹O₂	Oxigênio singlete
O₂	Oxigênio
O₂•	Ânion superóxido
O₃	Ozônio
•OH	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PGE₂	Prostaglandina E2
PGF_{2α}	Prostaglandina F2-alfa
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR-α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
RO•/LO•	Alcoxila
ROO•/LOO•	Peroxila
r.p.m.	Rotações por minuto
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
s.c.	Subcutânea
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Species</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1. Dor	25
2.1.1. Conceito e classificação	25
2.1.2. Vias de transmissão da dor	26
2.1.2.1. Vias periféricas de transmissão	26
2.1.2.2. Vias centrais de transmissão	28
2.1.2.2.1. Vias ascendentes	28
2.1.2.2.2. Vias descendentes	30
2.1.3. Tratamento farmacológico da dor	30
2.2. Estresse oxidativo	32
2.2.1. ERO / ERN	32
2.2.2. Antioxidantes	36
2.2.3. Dor, inflamação e estresse oxidativo	38
2.3. Terpenos	39
2.3.1. Fitol	41
3. OBJETIVOS	45
3.1. Geral	45
3.2. Específicos	45
4. MATERIAL	47
4.1. Animais	47
4.1.1. Condições experimentais	47
4.2. Substâncias utilizadas	48

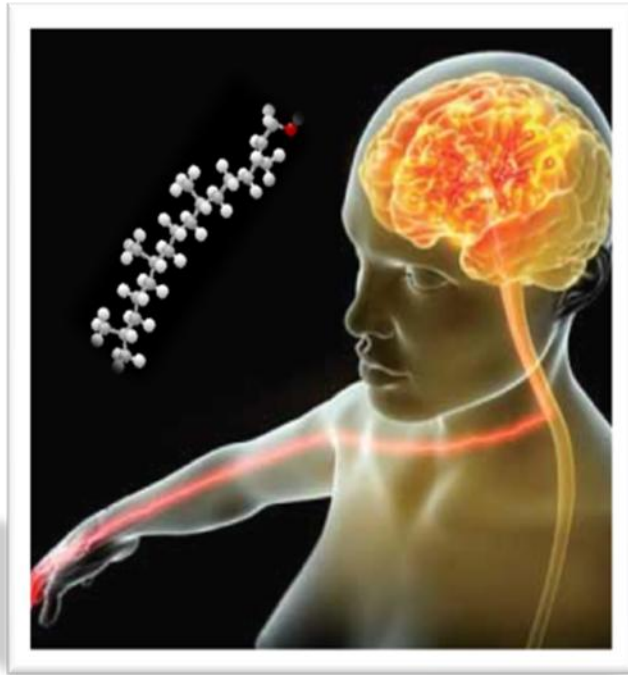
4.3. Aparelhagem	49
4.3.1. Aparelho do <i>Rota-rod</i>	49
4.3.2. Caixa de observação para o teste da formalina	50
4.3.3. Aparelho da Placa Quente	50
4.3.4. Outros aparelhos utilizados	51
5. MÉTODOS	52
5.1. Avaliação da toxicidade do fitol	53
5.1.1. Toxicidade Aguda / DL ₅₀	53
5.1.1.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos	53
5.1.1.2. Avaliação dos parâmetros hematológicos	54
5.2. Avaliação da atividade do fitol no SNC	54
5.2.1. Triagem Farmacológica Comportamental	54
5.2.2. Teste do <i>Rota-rod</i>	56
5.3. Avaliação da atividade antinociceptiva do fitol	56
5.3.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	56
5.3.2. Teste da formalina	57
5.3.3. Teste da placa quente	58
5.3.4. Investigação dos mecanismos de ação do fitol	58
5.3.4.1. Participação da via opióide	58
5.3.4.2. Participação dos canais de K ⁺ _{ATP}	59
5.4. Avaliação da atividade antioxidante do fitol	59
5.4.1. Avaliação do fitol sobre a peroxidação lipídica – TBARS	59
5.4.2. Atividade sequestradora de radicais livres	60
5.4.2.1. Radical hidroxila (•OH)	60
5.4.2.2. Óxido nítrico (•NO)	61

5.5. Análise estatística	62
6. RESULTADOS	64
6.1. Avaliação da toxicidade do fitol	64
6.1.1. Determinação da toxicidade aguda / DL ₅₀	64
6.1.1.1. Efeito do fitol sobre os parâmetros bioquímicos	64
6.1.1.2. Efeito do fitol sobre os parâmetros hematológicos	65
6.2. Avaliação da atividade do fitol no SNC	66
6.2.1. Efeito do fitol na triagem farmacológica comportamental	66
6.2.1. Efeito do fitol no teste do <i>rota-rod</i>	67
6.3. Avaliação da atividade antinociceptiva do fitol	68
6.3.1. Efeito do fitol no teste das contorções abdominais induzida pelo ácido acético	68
6.3.2. Efeito do fitol no teste da formalina	69
6.3.3. Efeito do fitol no teste da placa quente	71
6.3.4. Investigação dos mecanismos de ação do fitol	72
6.3.4.1. Participação da via opióide	72
6.3.4.2. Participação dos canais de K ⁺ _{ATP}	73
6.4. Avaliação da atividade antioxidante do fitol	74
6.4.1. Efeito do fitol sobre a peroxidação lipídica – TBARS	74
6.4.2. Efeito do fitol sobre a atividade sequestradora de radicais livres ..	75
6.4.2.1. Radical hidroxila (•OH)	75
6.4.2.2. Óxido nítrico (•NO)	76
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÕES	95
9. PERSPECTIVAS	97

10. REFERÊNCIAS 99

ANEXOS 120

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A sensação da dor normalmente acompanha a maioria das doenças que acometem os seres humanos, alertando o organismo para a presença de estímulos danosos (WOOLF; SALTER, 2000). A dor pode ser modulada por uma série de eventos comportamentais, uma vez que abrange, além da transmissão do estímulo nocivo, diferentes fatores emocionais, ambientais e cognitivos (RUSSO; BROSE, 1998; JULIUS; BASBAUM, 2001).

A nocicepção envolve a ativação de neurônios sensoriais que transmitem o estímulo nociceptivo em níveis espinhais e supra-espinhais (MILLAN, 1999; JESSE; SAVEGNAGO; NOGUEIRA, 2008). Além disso, a ativação dos nociceptores ocorre a partir de um dano tecidual, através da liberação de vários mediadores, tais como aminoácidos excitatórios, prótons, peptídios e citocinas que, por sua vez, atuam em receptores específicos, ativando várias cascatas de sinalização (SAWYNOK, 2003; BAGGIO et al., 2010). Substâncias capazes de bloquear estas vias de sinalização, tanto em nível central como periférico, são importantes ferramentas para o controle da dor (MEOTTI et al., 2007).

A terapêutica farmacológica atual para o tratamento da dor é composta, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides (HOSKIN, HANKS, 1991) e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (CASHMAN, 1996). O uso destes medicamentos, por sua vez, está relacionado com o aparecimento de muitos efeitos adversos, bem como com a falta de responsividade ao tratamento, o que representa um fator limitante para o sucesso da terapia analgésica convencional.

Os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2), por exemplo, são bastante efetivos, sendo utilizados por uma grande parcela da população, no entanto, o aumento do risco de ataques cardíacos é preocupante (GROSSER; FRIES; FITZGERALD, 2006). A morfina e outros analgésicos opióides são os fármacos mais eficientes no tratamento tanto da dor aguda como da dor crônica, contudo, sua utilidade clínica é comprometida pelo desenvolvimento de tolerância analgésica, bem como de hipersensibilidade (ARNER; RAWAL; GUSTAFSSON, 1988; MAO; PRICE; MAYER, 1995; OSSIPOV et al., 2003). Outros efeitos atribuídos ao uso dos analgésicos são: sedação, redução das atividades físicas, depressão

respiratória, constipação, entre outros. Desta forma, estes fatores contribuem significativamente para a diminuição da qualidade de vida dos indivíduos acometidos com a dor (FOLEY, 1995; SALVEMINI; NEUMANN, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) estão implicadas em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação e dor (SALVEMINI; DOYLE; CUZZOCREA, 2006). A produção de EROs/ERNs e a sua alta reatividade química com biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, pode causar algumas alterações danosas, como a destruição das membranas celulares por peroxidação lipídica, bem como a desnaturação do DNA, resultando em alterações da síntese de proteínas e duplicação celular (FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007). Dessa forma, substâncias capazes de retardar ou inibir o efeito danoso dessas espécies reativas podem ser promissoras para o tratamento e o alívio desses estados patológicos, de modo que, podem se tornar potentes drogas analgésicas e/ou antiinflamatórias.

O desenvolvimento de novos fármacos para esta finalidade tem sido importante objeto de estudo, e as plantas medicinais surgem como uma fonte muito diversificada de compostos bioativos que possuem inúmeras atividades biológicas.

A grande maioria das novas drogas é derivada de produtos naturais (metabólitos secundários) ou de compostos derivados dos produtos naturais. Desde a descoberta da morfina, o primeiro composto puro, farmacologicamente ativo, isolado de uma planta (*Papaver somniferum*) (HAMILTON; BASKETT, 2000), iniciou-se uma era em que compostos derivados de plantas puderam ser purificados, estudados e administrados em dosagens precisas e estáveis (LI; VEDERAS, 2009).

Dentro deste contexto, as plantas medicinais contêm uma variedade de compostos bioativos, como os terpenos, que são constituintes dos óleos essenciais, que possuem várias propriedades farmacológicas, como analgésica e antiinflamatória. (DA SILVA et al., 2008; DE SOUSA; ALMEIDA, 2005; DE SOUSA, 2011). Os terpenos mais abundantes nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos, no entanto, os diterpenos podem estar presentes quando os óleos essenciais são extraídos com solventes orgânicos (DE SOUSA, 2011).

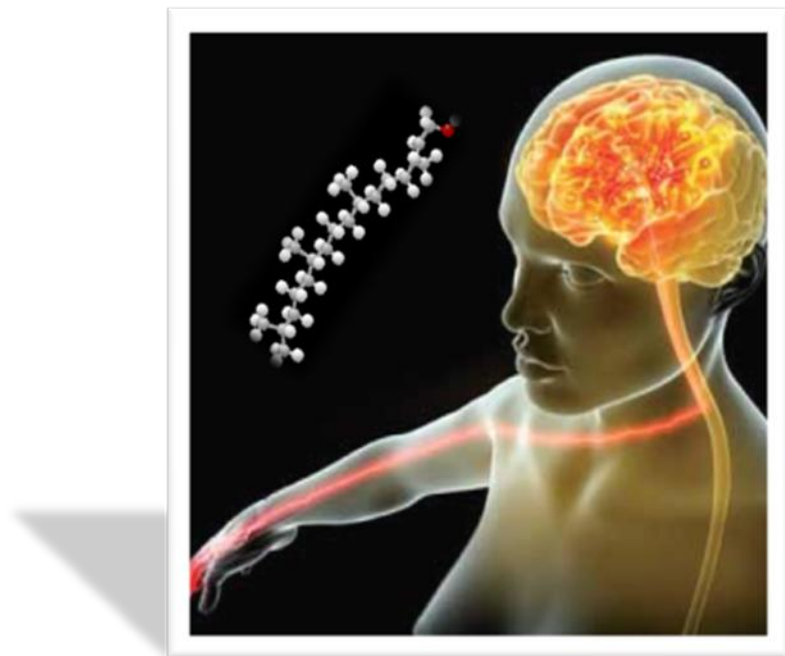
Diversos estudos indicam que uma substância pode apresentar uma relação entre suas propriedades antinociceptiva e antioxidante (SALVEMINI et al., 2011). Neste sentido, vários compostos de origem vegetal encontrados em abundância na natureza têm sido estudados. Entre os terpenos com comprovada

atividade antinociceptiva e antioxidante estão os monoterpenos carvacrol (GUIMARÃES et al., 2010) e o citronelal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011b), bem como o diterpeno andrografolida (LIN et al., 2009).

O fitol é um diterpeno alcoólico insaturado de cadeia ramificada (GLOERICH et al., 2007; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010) constituinte da molécula da clorofila e, portanto, está presente abundantemente na natureza. Algumas atividades biológicas do fitol já foram demonstradas, no entanto, não há relatos sobre a ação do fitol no Sistema Nervoso Central (SNC).

O aumento do interesse sobre a atividade antinociceptiva e antioxidante de vários diterpenos, bem como a escassez de pesquisas sobre os efeitos psicofarmacológicos do fitol incentivaram a realização deste estudo, direcionado para a investigação da toxicidade e das atividades antinociceptiva e antioxidante desta substância. Este trabalho busca contribuir com a ciência, aumentando o conhecimento sobre os efeitos psicofarmacológicos dos diterpenos, e despertando o interesse dos pesquisadores para investigações adicionais sobre o fitol, o qual poderá ser um importante candidato ao desenvolvimento de um novo medicamento.

Fundamentação teórica



2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. DOR

2.1.1. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*), a dor é definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional, associada com um dano tecidual real ou potencial”. Esta definição deixa claro que a dor envolve, além de um componente discriminativo-perceptivo, responsável pela quantificação do estímulo nocivo, um componente psicológico afetivo-cognitivo, responsável pelas diferentes respostas comportamentais à dor (CASEY, 2000). Dessa forma, é importante distinguirmos entre dois termos: dor e nocicepção. Enquanto a *nocicepção* refere-se às manifestações fisiológicas geradas pelo estímulo nocivo, a *dor* envolve a percepção da nocicepção, contando com um componente subjetivo emocional (MILLAN, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

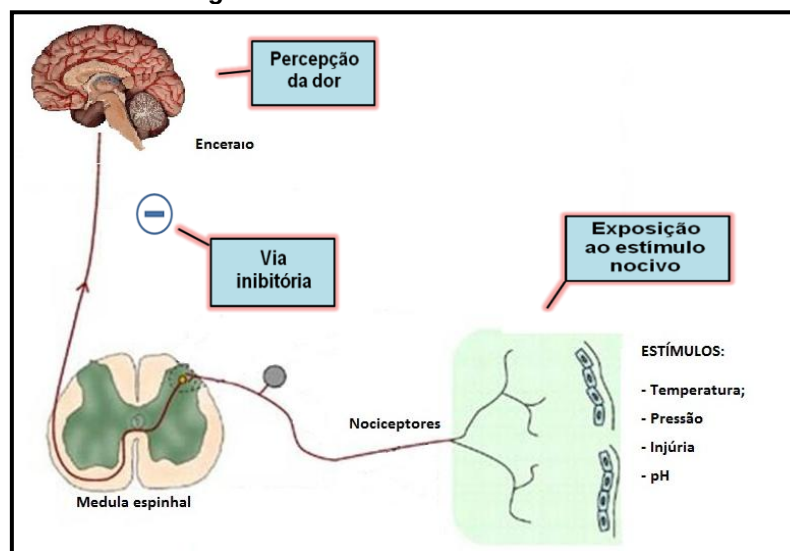
A dor é uma sensação complexa e, por isso, há várias classificações que dividem os processos dolorosos em várias categorias, de acordo com a intensidade e a natureza do estímulo, duração, entre outros aspectos. Dentre as várias classificações, sem dúvida, a mais importante é a que divide a dor em dor aguda e dor crônica. A *dor aguda* é uma resposta fisiológica normal a um estímulo nocivo (CARR; GOUDAS, 1999), sendo pouco duradoura e desaparecendo com a eliminação desse estímulo. A *dor crônica*, por sua vez, persiste por um tempo maior, e está associada com processos patológicos crônicos (MERSKEY; BOGDUK, 1994; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

Uma das principais manifestações da dor crônica é denominada dor neuropática, sendo causada por uma disfunção ou um dano no nervo (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Ela representa um impacto considerável na qualidade de vida do indivíduo acometido.

2.1.2. VIAS DE TRANSMISSÃO DA DOR

A exposição da pele e outros órgãos a um estímulo nocivo provoca uma desagradável sensação de dor. Entre esta exposição inicial ao estímulo até a percepção da dor, há uma série de mecanismos extremamente complexos envolvidos, os quais reconhecem o estímulo através de receptores específicos (nociceptores), o convertem em potencial de ação que, por sua vez, é transmitido até o Sistema Nervoso Central (SNC), onde é processado e é gerada a percepção da dor (MILLAN, 1999). Para garantir a homeostasia do organismo, uma via descendente inibitória é ativada, inibindo a transmissão excitatória nociceptiva, representando, assim, o mecanismo de antinocicepção (Figura 1).

Figura 1 – Vias de transmissão da dor.



FONTE: Adaptado de http://www.medicina.ufmg.br/inct/?page_id=29. Acessado em: 11/07/2011

2.1.2.1. Vias periféricas de transmissão

Os nociceptores são receptores sensoriais que respondem a um estímulo nocivo. Consiste em um neurônio primário sensorial (terminação nervosa livre) que é ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001). Ao contrário de outros receptores sensoriais que só respondem a um estímulo específico, os nociceptores podem ser ativados por estímulos térmicos (frio e calor), mecânicos (pressão intensa) e químicos (substâncias irritantes) (BURGESS; PERL,

1967; JULIUS; BASBAUM, 2001). Quando um receptor responde a mais de um estímulo, ele é denominado polimodal. Os nociceptores apresentam um limiar de ativação bem maior que outros receptores sensoriais e respondem progressivamente, de acordo com a intensidade do estímulo (MENSE, 1983; MILLAN, 1999).

A localização dos nociceptores é bem difusa, sendo encontrados em toda a superfície da pele, mucosa, membranas, tecidos conectivos de órgãos viscerais, ligamentos e articulações, músculos, tendões e vasos arteriais (MENSE, 1983; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

Os neurônios aferentes primários são classificados de acordo com a estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: C, A δ e A β . Enquanto as fibras tipo C são amielínicas, as fibras tipo A possuem bainha de mielina em diferentes proporções. A presença de mielina aumenta a velocidade de condução do impulso nervoso.

As fibras tipo C são finas (0,4 – 1,2 μ m de diâmetro) e por serem amielínicas, conduzem o impulso nervoso numa velocidade baixa (0,5 – 2,0 m/s) (MILLAN, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). A maioria destas fibras são nociceptores polimodais, respondendo a estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Elas são responsáveis por induzir as manifestações da dor crônica.

As fibras tipo A δ têm um diâmetro médio (2 – 6 μ m) e apresentam uma velocidade de condução intermediária (12 – 30 m/s), sendo classificadas em dois grupos: tipo I (respondem a um estímulo mecânico de alta intensidade, mas respondem fracamente aos estímulos térmicos e químicos) e tipo II (respondem a altas temperaturas e ao frio intenso e fracamente ao estímulo mecânico). As fibras tipo A δ são responsáveis por promover a sensação durante a dor aguda (CASEY, 2000).

As fibras A β são as de maior diâmetro (maior que 10 μ m), com uma grande quantidade de mielina, portanto, apresentando alta velocidade de condução (30 – 100 m/s). Ao contrário das fibras tipo C e A δ , as fibras A β têm um baixo limiar de ativação e, por isso, não transmitem a informação nociceptiva (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

2.1.2.2. Vias centrais de transmissão

2.1.2.2.1. VIAS ASCENDENTES

Após a transdução do estímulo nocivo em impulso nervoso, a propagação desta informação ocorre através da interação de vários sistemas de neurotransmissores na medula espinhal, estando sujeitos à plasticidade e alterações, especialmente, durante condições patológicas (D'MELLO; DICKENSON, 2008).

O principal neurotransmissor excitatório liberado pelos neurônios aferentes primários é o glutamato, um aminoácido excitatório que tem um papel essencial na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (CHIZH, 2002; OKUSE, 2007).

O glutamato exerce suas ações ao se ligar a dois tipos de receptores glutamatérgicos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos, os quais estão presentes nos terminais pré-sinápticos e na membrana pós-sináptica no encéfalo e na medula espinhal (PINHEIRO; MULLE, 2008; KALIA; KALIA; SALTER, 2008). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos permitem a entrada de sódio e cálcio na célula, e são de três subtipos principais: receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionico (AMPA) e receptor 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina, também denominado Kainato (DINGLE et al., 1999; KEW; KEMP, 2005; KALIA; KALIA; SALTER, 2008). A família de receptores glutamatérgicos metabotrópicos atuam na ativação da fosfolipase C, aumentando os níveis de cálcio intracelular (OKUSE, 2007).

Outros dois neurotransmissores também são importantes nesta etapa da transmissão nociceptiva: a substância P, que atua em receptores de neurocinina I (NK1) (TODD, 2002) e peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), que pode potencializar o efeito despolarizante da substância P (DRAY, 1996; FURST, 1999).

Os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios no corno dorsal da medula espinhal. A medula espinhal está organizada em diferentes lâminas, que se estendem desde a superfície até a profundidade do corno dorsal. A maioria das fibras tipo A δ e C terminam superficialmente nas lâminas I-II, enquanto as fibras tipo A β terminam predominantemente nas lâminas III e VI (TODD, 2002).

Na medula espinhal, encontram-se vários tipos de interneurônios que fazem sinapse com as fibras aferentes primárias e, dependendo da especificidade, possuem propriedades diferentes e respondem a tipos diferentes de informação sensorial. Além destes neurônios, as células da glia, tais como astrócitos e microglias, responsáveis por manter a integridade e a sobrevivência dos neurônios, também são capazes de influenciar a transmissão da dor na medula espinhal, especialmente sob condições patológicas (WATKINS et al., 1997; COYLE, 1998; D'MELLO; DICKENSON, 2008).

A informação nociceptiva, após ter alcançado a medula espinhal, deve ser conduzida até o encéfalo, por meio de vias ascendentes que transmitem o impulso nervoso a estruturas do tronco encefálico e do diencefalo, incluindo o tálamo, substância periaquedutal, região parabraquial, formação reticular, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999).

O tálamo representa a principal estrutura de controle (relé) das informações sensoriais destinadas ao córtex, estando envolvidas em diversas funções, entre elas, recepção, integração e transferência do estímulo nociceptivo através de diferentes projeções até o córtex, compreendendo um circuito funcional de processamento da dor (MILLAN, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

Neste circuito entre o tálamo e o córtex, dois sistemas de projeção nociceptiva atuam em paralelo: o sistema lateral e o medial, os quais envolvem três importantes regiões corticais, sendo elas, o córtex somatossensorial primário (S-I), córtex somatossensorial secundário (S-II) e córtex anterior cingulado.

O sistema lateral atua diretamente na discriminação sensorial da nocicepção, realizando uma caracterização topográfica do estímulo nocivo, envolvendo S-I e S-II. Já o sistema medial compreende projeções da região média do tálamo às áreas S-I e S-II (incluindo o sistema límbico) e o córtex anterior cingulado. Por causa disto, este sistema contribui, principalmente, para o comportamento motivacional-afetivo da dor, embora também participe no circuito discriminativo-sensorial (TREEDE; KENSHALO; GRACELY, 1999; TIMMERMANN; PLONER; HAUCKE, 2001).

2.1.2.2.2. VIAS DESCENDENTES

Após a percepção da dor nas regiões superiores do encéfalo, o organismo ativa um sistema de antinocicepção através de vias descendentes inibitórias que vão influenciar a transmissão do estímulo nociceptivo dos neurônios aferentes primários para o SNC. Este mecanismo representa a restauração da homeostasia (RIEDEL; NEECK, 2001).

É importante ressaltar que, além das vias descendentes inibitórias, há também vias descendentes facilitatórias, que estão envolvidas na manutenção, mas não na iniciação da dor induzida por uma injúria neuronal (KOVELOWSKI; OSSIPOV; SUN, 2000; BURGESS; GARDELL; OSSIPOV, 2002), estando, provavelmente, envolvidas no mecanismo de alodínia, que consiste numa condição patológica persistente que é provocada por um estímulo inócuo (não-nocivo) (BASBAUM; WOOLF, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

A modulação da dor através das vias descendentes inibitórias consiste na redução da liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P e CGRP) a partir dos neurônios aferentes primários, por meio da liberação de neurotransmissores inibitórios a partir de interneurônios. Tais neurotransmissores inibitórios são principalmente o ácido γ -amino-butírico (GABA), noradrenalina e serotonina. Além disso, as endorfinas (opiídeos endógenos) também participam da antinocicepção (HARRIS; WESTBROOK, 1995; MALCANGIO; BOWERY, 1996; RIEDEL; NEECK, 2001).

A função exata do córtex e suas projeções para estruturas envolvidas na antinocicepção ainda é pouco conhecida, mas é evidente que a área S-I, o tálamo e outras regiões superiores não estão envolvidos simplesmente com o recebimento e integração das informações vindas da medula espinhal (RIEDEL; NEECK, 2001).

2.1.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR

Analgesia é o termo empregado para designar o alívio ou fim da sensação dolorosa, sem perda da consciência. Substâncias capazes de causar analgesia são denominadas analgésicas e são divididas em três grupos principais: analgésicos

periféricos, fármacos adjuvantes e analgésicos de ação central (BRAINER-LIMA, 1997; ALMEIDA, OLIVEIRA, 2006).

Os analgésicos periféricos são representados pelos AINEs, sendo geralmente usados para o controle tanto da dor aguda como da dor crônica e são efetivos em pacientes com dor moderada à severa (MOORE, 2009). O mecanismo de ação dos AINEs consiste na inibição das enzimas ciclooxigenases (COX), responsáveis pela produção de prostaglandinas, as quais medeiam o processo inflamatório (MARTINI et al., 1984; TROULLOS; HARGREAVES; DIONNE, 1997), sensibilizando os nociceptores. Há vários representantes desta classe, sendo o mais utilizado o ácido acetil salicílico (AAS). Os AINEs diferem entre si quanto à potência e eficácia, farmacocinética e efeitos colaterais. Embora não causem dependência psíquica, os AINEs apresentam vários efeitos colaterais, entre eles, alterações gástricas, hepáticas e renais, reações alérgicas e alterações hematológicas (SAKATA; GOZZANI, 1994). AINEs que apresentam uma seletividade pela COX-2 são mais toleráveis, apresentando menos efeitos colaterais.

O segundo grupo de analgésicos, representado pelos fármacos adjuvantes, é formado por medicamentos que normalmente são indicados para outras condições patológicas, tais como epilepsia e depressão, mas que atuam como fármacos analgésicos, particularmente, no tratamento da dor neuropática em pacientes que respondem mal aos analgésicos convencionais. Os medicamentos incluídos neste grupo são: (1) *antidepressivos tricíclicos* (imipramina e amitriptilina), que são inibidores da recaptação da noradrenalina; (2) *anticonvulsivantes* (carbamazepina, gabapentina e fenitoína), que atuam sobre os canais de sódio ou cálcio dependentes de voltagem; (3) *anestésicos locais* (lidocaína), que bloqueiam descargas espontâneas de terminações nervosas lesadas (RANG et al., 2007; BENEDITO, 2009).

Os analgésicos centrais, tendo como principal representante os opióides, são usados para o tratamento da dor não responsiva a outros analgésicos, particularmente na dor neuropática moderada à severa (MOORE, 2009). O mecanismo de ação desses fármacos envolve a ativação de receptores opióides (μ , δ , κ) localizados tanto em nível central como periférico. Estes receptores são receptores acoplados à proteína $G_{i/o}$ que inibem a ativação de canais de Ca^{2+} por meio da diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Além disso, os canais de K^+ são abertos, promovendo a hiperpolarização da célula,

bloqueando, assim, a liberação dos neurotransmissores e da transmissão da dor em diversas vias neuronais (MACHELSKA, 2007).

Os analgésicos opióides mais potentes (morfina, fentanil) são usados mais freqüentemente como anestésicos ou para o tratamento da dor crônica sob estrita supervisão, por causa do alto potencial de abuso e dependência, além de tolerância (MOORE, 2009). Já os opióides fracos como a codeína, são comumente usados para dor moderada (HARGREAVES; ABBOTT, 2005; SALERNO; HERMANN, 2006).

Outros tipos de receptores incluindo os serotoninérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e adrenérgicos também estão envolvidos no processo de analgesia, sendo tais receptores responsivos ao tratamento com opióides (PINTO, 2000).

Segundo Kissin (2010), de 1960 a 2009, foram introduzidos no mercado cinquenta e nove fármacos identificados como analgésicos, os quais ainda permanecem em uso. A morfina e a aspirina são, há mais de um século, os analgésicos mais utilizados para o tratamento da dor, e continuam a dominar as publicações em revistas biomédicas. Seus efeitos adversos e a ineficácia em alguns tipos de dor são os principais fatores que impulsionam até hoje a pesquisa e o desenvolvimento de novos analgésicos.

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO

2.2.1. ERO / ERN

Os organismos aeróbicos necessitam do oxigênio (O_2) atmosférico para sobreviverem, uma vez que o O_2 é fundamental para a produção de energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP), através da cadeia respiratória da mitocôndria (NATHAN; SINGER, 1999; REITER et al., 2001; MELOV, 2002).

Apesar de ser essencial à vida, o O_2 pode causar danos ao organismo porque cerca de 5% do O_2 inalado segue uma via alternativa e é destinado à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que podem ser potencialmente tóxicas (REITER; TAN; BURKHARDT, 2002).

EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) são moléculas altamente reativas, formadas por oxigênio e/ou nitrogênio. Elas podem ser de duas formas:

- (A) *Radicais livres* – contém um ou mais elétrons desemparelhados. Ex: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), alcóxila ($RO\cdot/LO\cdot$), peróxila ($ROO\cdot/LOO\cdot$), hidroperóxila ($HO_2\cdot$), óxido nítrico ($\cdot NO$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$).
- (B) *Não radicais livres* – não contém elétrons desemparelhados, mas são também altamente reativos. Ex: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), peróxidos lipídicos ($LOOH$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (VALKO et al., 2007).

Uma das principais EROs é o radical hidroxila ($\cdot OH$) que representa a forma neutra do íon hidróxido, sendo, provavelmente, o radical mais agressivo e mais prejudicial *in vivo*. O $\cdot OH$ é altamente reativo e apresenta uma meia-vida muito curta (menor que 1 ns), dessa forma, sua ação oxidativa ocorre de maneira parácrina, ou seja, próximo ao local onde é formado. A produção de $\cdot OH$ ocorre por vários mecanismos, entre eles: as radiações ionizantes que causam a decomposição da H_2O em $\cdot OH$ e H^+ e metais de transição que promovem a quebra de H_2O_2 . (PASTOR et al., 2000; REITER et al., 2001; VALKO et al., 2006).

Entre as reações que resultam na formação de $\cdot OH$, a reação de Fenton é bem característica. Ela consiste na reação entre Fe^{2+} e H_2O_2 , gerando os radicais $\cdot OH$ com alto potencial de oxi-redução (AGUIAR et al., 2007):



Entre as ERNs, a mais importante é o óxido nítrico ($\cdot NO$), uma pequena molécula hidrofóbica que atravessa facilmente a membrana celular, sendo produzida a partir da L-arginina, em um processo que requer cinco elétrons e é dependente da enzima *óxido nítrico sintase* (SYNDER; BREDT, 1992; REITER et al., 2001). Tem uma meia-vida curta de apenas poucos segundos, sendo mais estável em um ambiente com baixa concentração de O_2 (CHIUEH, 1999; VALKO et al., 2007). O

•NO atua como uma molécula oxidativa importante na sinalização celular, estando envolvida numa variedade de processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e relaxamento do músculo liso (BERGENDI, et al., 1999; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). No entanto, em altas concentrações, causa danos às proteínas e ao DNA. Além disso, sua toxicidade é aumentada quando se combina com o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para produzir o peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante que pode causar fragmentação do DNA e peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1994; REITER et al., 2001).

As fontes para a produção de EROs/ERNS são tanto endógenas como exógenas. Entre as fontes endógenas, está a principal fonte de geração dessas espécies reativas, a mitocôndria. Além desta organela, temos ainda os peroxissomos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, o citocromo P450, bem como a via da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase NADPH oxidase (CONNER; GRISHAM, 1996; INOUE et al., 2003; RABÊLO et al., 2010). Já as fontes exógenas incluem: radiações ionizantes, metais iônicos, xenobióticos, inseticidas, tabaco, infecções e alguns medicamentos, como os barbitúricos (KLAUNIG et al., 1997; VALKO et al., 2006).

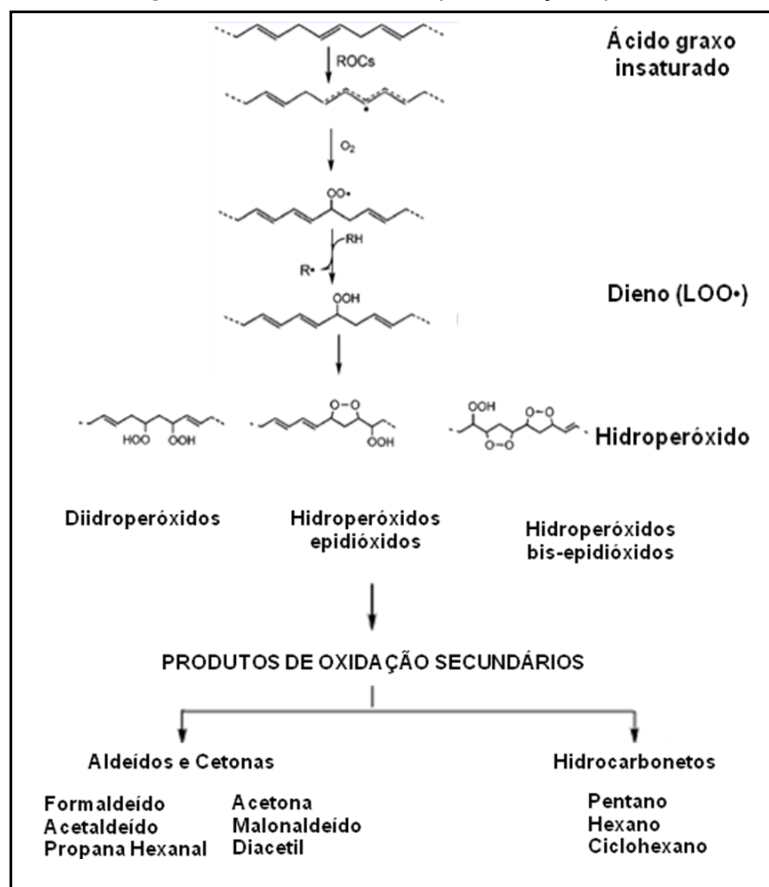
As EROs/ERNS têm um papel duplo: exercem tanto efeitos benéficos como prejudiciais. Estas espécies reativas são produzidas normalmente pelo metabolismo celular e seus efeitos benéficos ocorrem em baixas concentrações, tendo uma função fisiológica na resposta celular a um agente nocivo, participando da defesa contra agentes infecciosos, bem como nas vias de sinalização celular (VALKO et al., 2004; 2007). No entanto, em altas concentrações, as EROs/ERNS têm efeito prejudicial, sendo responsáveis por danos causados às estruturas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (POLI et al., 2004).

Os danos causados pelas espécies reativas aos lipídios, especialmente, aos ácidos graxos poliinsaturados, são denominados peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica de LDL (*Low Density Lipoproteins* – lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (*High Density Lipoproteins* – lipoproteínas de alta densidade) provoca alterações conformacionais dessas lipoproteínas, alterando suas funções. O mesmo acontece com os fosfolipídios das membranas celulares, que são extremamente sensíveis à oxidação, de modo que a peroxidação lipídica promove sérias alterações nas membranas celulares (SIEMS; GRUNE; ESTERBAUER, 1995;

FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007; VALKO et al., 2007), causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana, além de perda da seletividade nas trocas iônicas, causando a liberação do conteúdo intracelular, o que leva à morte celular (BEZERRA et al., 2004).

O mecanismo pelo qual as EROs promovem a peroxidação lipídica consiste na retirada de um átomo de hidrogênio do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, formando, conseqüentemente, radicais livres, como o radical peroxila e, em seguida, vão sendo formados vários produtos chamados de produtos de oxidação secundários, como aldeídos, hidrocarbonetos e cetonas, sendo alguns desses produtos usados como biomarcadores para investigar a relação de uma substância com os estágios finais da peroxidação lipídica, como é o caso do malonaldeído (MDA) (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 2 – Mecanismo da peroxidação lipídica.



FONTE: Adaptado de MOON; SHIBAMOTO, 2009.

O MDA, um dialdeído de 3 carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (ANGELO, 1996; OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005), é um

dos principais produtos de degradação dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante a peroxidação lipídica (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; OLIVEIRA et al., 2010; ANGELO, 1996; OSAWA FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). O MDA é capaz de causar prejuízos a vários processos fisiológicos através de sua capacidade de reagir com moléculas como proteínas e DNA (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; LIM et al., 2003).

Os ácidos nucleicos também são alvos das EROs/ERNs. O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), por exemplo, reage com todos os componentes da molécula do DNA, danificando tanto as purinas e pirimidinas como o açúcar desoxirribose. Tais lesões resultam em mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998; WHITEMAN et al., 2002; FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007). É importante ressaltar que o DNA mitocondrial é mais susceptível à oxidação do que o DNA nuclear, porque a capacidade de reparação do DNA mitocondrial é limitada e, além disso, ele não é protegido por histonas, que são as principais proteínas presentes no núcleo que protegem o DNA (INOUE et al., 2003).

A principal espécie reativa responsável pela oxidação de proteínas é também o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas, principalmente resíduos de cisteína e metionina, são susceptíveis à oxidação pela ação de EROs/ERNs (STADTMAN, 2004; VALKO et al., 2007). Provavelmente, estes danos às proteínas são reparáveis, sendo considerado um evento não-letal para a célula, no entanto, alguns estudos mostraram que proteínas mitocondriais podem ser alvos importantes do dano oxidativo em longo prazo (STADTMAN, 2004).

2.2.2. ANTIOXIDANTES

O organismo dispõe de mecanismos homeostáticos que promovem um controle dos níveis de EROs/ERNs, evitando que seu acúmulo cause danos às células. As substâncias capazes de retardar ou inibir os efeitos prejudiciais da oxidação causada pelas espécies reativas são denominadas *antioxidantes* (HALLIWELL, 2001; ASOLINI et al., 2006), que podem ser enzimáticos (superóxido dismutase – SOD, glutathiona peroxidase e catalase) ou não-enzimáticos (vitaminas C e E, glutathiona, carotenóides, flavonóides e outros) (MATES; GOMEZ; DE

CASTRO, 1999; McCALL; FREI, 1999; VALKO et al., 2006). No quadro 1, estão listados os principais antioxidantes e suas funções.

Quadro1. Principais antioxidantes e suas funções.

Antioxidantes enzimáticos	Funções
SOD	Catalisa a dismutação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
Catalase (CT)	Degrada H_2O_2 em O_2 e H_2O
Glutathiona peroxidase (GP)	Remove H_2O_2 através da oxirredução da glutathiona
Antioxidantes não-enzimáticos	Funções
Ácido ascórbico	Seqüestra $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 1O_2 Reduz H_2O_2 a H_2O
Tocoferol	Seqüestra 1O_2 Reage com $RO\cdot/LO\cdot$, $ROO\cdot/LOO\cdot$ e $L\cdot$, oxidando-os.

FONTE: Adaptado de BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003

Para ser um bom antioxidante, a substância deve apresentar várias características, entre elas: atacar preferencialmente os radicais livres; quelar metais; interagir com outros antioxidantes, regenerando-os; ser rapidamente absorvidos; ter uma concentração relevante nos fluidos e tecidos biológicos; e ter a capacidade de agir tanto em meio hidrofóbico como hidrofílico (VALKO et al., 2006). Além disso, um antioxidante pode seqüestrar as EROs/ERNs, impedindo a continuidade das etapas na cadeia de reações destas espécies. Uma vez seqüestrados, os radicais livres são convertidos a espécies menos reativas (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Em condições normais, os antioxidantes controlam o efeito oxidativo das EROs/ERNs, havendo um equilíbrio nas concentrações destas espécies reativas. No entanto, quando há um desequilíbrio neste balanço, quer seja por aumento de EROs/ERNs ou por diminuição de antioxidantes, ocorre o chamado **ESTRESSE OXIDATIVO** ou **NITROXIDATIVO** (GULÇIN; ALICI; CESUR, 2005). Esse estresse devido ao acúmulo de EROs/ERNs causa, então, injúrias em diversas estruturas celulares (DNA, lipídios e proteínas) como mencionado anteriormente.

2.2.3. DOR, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo está intimamente relacionado com o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, entre elas, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, câncer, artrite reumatóide, dor e inflamação, bem como doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esquizofrenia e envelhecimento (WITZUM, 1994; SOUTHOM; POWIS, 1998; FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007).

O estresse oxidativo afeta predominantemente o cérebro e esta vulnerabilidade é devido, principalmente, ao intenso metabolismo aeróbico e perfusão sanguínea, o que gera grande quantidade de EROs/ERNs (HALLIWELL, 1992; MAHADIK; EVANS; LAL, 2001).

EROs/ERNs estão também associadas com o desenvolvimento de estados de dor persistente, incluindo dor neuropática e dor inflamatória (SALVEMINI et al., 1999; KIM et al., 2004; WANG et al., 2004; GAO et al., 2007). Vários estudos mostraram que antioxidantes, como a vitamina E, são muito eficientes em aliviar a hiperalgesia mecânica em ratos, num modelo de dor neuropática (KIM et al., 2004; YOWTAK et al., 2011). Os antioxidantes também foram bastante efetivos na redução da hiperalgesia e de indicadores da inflamação após a injeção de carragenina (WANG et al., 2004; GAO et al., 2007), capsaicina (LEE et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2009) e formalina (HACIMUFTUOGLU et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2008), por via intraplantar em ratos e camundongos, sugerindo a relação das EROs com o desenvolvimento e manutenção da dor através de vários mecanismos. Gao e colaboradores (2007) demonstraram que EROs têm relação com a neurotransmissão glutamatérgica, estando envolvidas no aumento da fosforilação do receptor NMDA na medula espinhal em modelos animais de dor, o que resulta na sensibilização central e, conseqüentemente, na dor, de maneira rápida e reversível. Já Yowtak e colaboradores (2011) demonstraram que EROs contribuem para a dor neuropática via neurotransmissão GABAérgica, através da redução da liberação espinhal de GABA. Contudo, o mecanismo fundamental pelo qual a redução de EROs promove alívio da dor ainda não é bem esclarecido (SCHWARTZ et al., 2009).

Já em relação à inflamação, é bem descrito que EROs/ERNs produzidas em excesso estão implicadas na fisiopatologia da inflamação (KATAOKA et al., 1997; MICKALAD et al., 2000; FERNANDES et al., 2003), inclusive, tem sido

sugerido que a atividade antiinflamatória dos AINEs pode ser, em parte, devido a sua capacidade de interferir com as reações mediadas pelos radicais livres (MAFFEI et al., 1993; MICKALAD et al., 2000; FERNANDES et al., 2003).

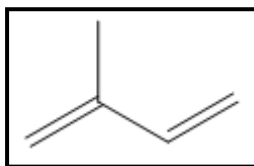
As EROs/ERNs são produzidas durante a resposta inflamatória como consequência da atividade das COXs (NIKOLIC; BREEMEN, 2001; FERNANDES et al., 2004), sendo produzidas, ainda, pelas células endoteliais, células de Kupffer, neutrófilos e macrófagos (MICKALAD et al., 2000; FERNANDES et al., 2003). Embora a inflamação associada com a produção de radicais livres tenha efeitos nocivos ao hospedeiro, estes processos também têm um papel fisiológico, especialmente na eliminação de patógenos invasores (ROBERTS et al., 2010).

Uma das principais espécies reativas envolvidas na inflamação é o NO•. A sua produção pode ser induzida por agentes pró-inflamatórios, tais como, endotoxinas, interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IF- γ) (CUZZOCREA et al., 2001), e seus efeitos pró-inflamatórios incluem aumento da permeabilidade vascular em tecidos inflamados, produção de outros radicais livres potencialmente danosos, bem como a indução de COXs e citocinas inflamatórias (MIYASAKA; HIRATA, 1997; FERNANDES et al., 2003).

2.3. TERPENOS

As plantas medicinais contêm uma variedade de compostos bioativos, incluindo os constituintes dos óleos essenciais (DA SILVA et al., 2008; DE SOUSA; ALMEIDA, 2005; DE SOUSA, 2011), os quais são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas e lipofílicas que, à temperatura ambiente, têm aparência oleosa (SIMÕES; SPITZER, 2004; CUNHA, 2006).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados terpenóides (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os terpenos, de fórmula química geral (C₅H₈)_n, constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (Figura 3). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico.

Figura 3 – Estrutura química do isopreno.

Os terpenos podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos, como também aromáticos. Suas propriedades químicas, físicas e biológicas dependerão do tamanho de suas estruturas, bem como dos grupos funcionais nelas presentes.

De acordo com o número de unidades de isopreno, ou unidades C5 presentes, os terpenos são classificados como: hemiterpenos (C5); monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); triterpenos (C30); tetraterpenos (C40) e politerpenos (unidades maiores) (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os compostos terpênicos majoritários nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos, sendo os diterpenos detectados quando os óleos essenciais são extraídos com solventes orgânicos (DE SOUSA, 2011).

Os diterpenos, constituídos por 20 átomos de carbono, são bastante comuns em plantas e são biossintetizados nos plastídeos pela via ou rota do metil-eritritol fosfato. São conhecidos, aproximadamente, 5.000 membros deste grupo. Geralmente possuem baixo peso molecular, não são voláteis e são insolúveis em água, porém suas propriedades físico-químicas são decorrentes do tipo de esqueleto e dos grupos funcionais presentes. Por exemplo, podem apresentar caráter ácido quando possuem grupamento carboxila; podem ser visíveis no ultravioleta se são aromáticos ou possuem ligações duplas conjugadas; podem ser solúveis em água na forma de glicosídeos. Alguns podem possuir átomos de nitrogênio em seu esqueleto, sendo chamados de "diterpenos alcaloídicos", apresentando caráter básico (SIMÕES; SPITZER, 2004).

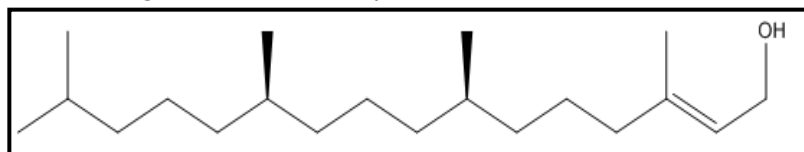
Alguns diterpenos são bastante conhecidos e importantes, como o Taxol (paclitaxel), utilizado pra tratamento de câncer de mama, o esteviosídeo de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), os ginkgolídeos da planta medicinal *Ginkgo biloba* L. e os ácidos resinosos de coníferas ou da copaíba. Os diterpenos são precursores das giberelinas que regulam o crescimento de plantas, além da vitamina E e vitamina K, sendo estas vitaminas formadas a partir do fitol (SAMUELSSON;

BOHLIN, 2010). Entre os diterpenos com comprovada atividade antinociceptiva estão o mirsinol, isolado de *Euphorbia decipiens* (AHMADI et al., 2005), taxóide e lignanas, isolados de *Taxus baccata* L. (KUPELLI et al., 2003). O diterpeno andrografolida (LIN et al., 2009) mostrou comprovada atividade antinociceptiva e antioxidante.

2.3.1. FITOL

O fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), de fórmula molecular $C_{20}H_{40}O$ é um diterpeno membro do grupo dos alcoóis alifáticos insaturados de cadeia ramificada longa (Figura 4) (GLOERICH et al., 2007; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). É constituinte da molécula da clorofila e, uma vez que todos os organismos fotossintéticos possuem clorofila, o fitol está presente abundantemente na natureza (BRINK; WANDERS, 2006).

Figura 4 – Estrutura química do fitol.

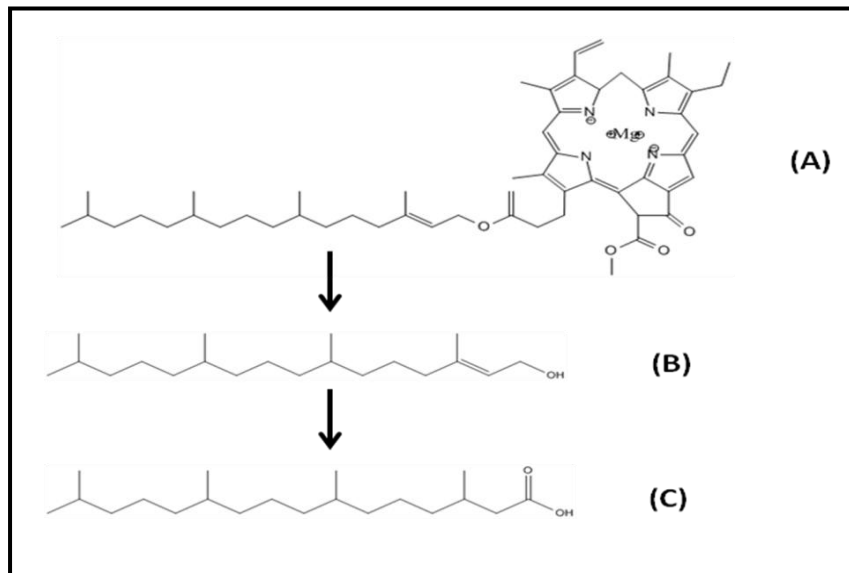


A molécula da clorofila é formada de duas partes: (1) uma estrutura chamada porfirina, formada por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, que são ligados entre si por pontes metilênicas, contendo um átomo de magnésio no seu interior; e (2) um álcool acíclico de cadeia longa, o fitol, ligado por uma ligação éster a uma carboxila do anel IV (Figura 5 A). Esta ligação pode ser quebrada pela ação da enzima *clorofilase*. A presença do fitol confere à molécula da clorofila uma maior lipossolubilidade (LANFER-MARQUEZ, 2003; BRINK; WANDERS, 2006).

O fitol é o precursor do ácido fitânico (Figura 5 B e C), um ácido graxo de cadeia ramificada que tem importantes implicações tanto fisiológicas como patológicas. A liberação do fitol da molécula de clorofila ocorre no sistema digestório de animais ruminantes, pela ação de bactérias presentes no intestino (GLOERICH et al., 2007). Entretanto, em humanos, a principal fonte de ácido fitânico não é proveniente do fitol ligado à clorofila, mas sim, a partir de produtos alimentícios, tais

como gordura animal, produtos derivados do leite ou de pescados (LANFER-MARQUEZ, 2003; BRINK; WANDERS, 2006).

Figura 5 – Estruturas químicas da clorofila (A), fitol (B) e ácido fitânico (C).



FONTE: Adaptado de BRINK; WANDERS, 2006.

Fisiologicamente, o fitol e o ácido fitânico regulam a expressão gênica e a diferenciação dos adipócitos, através da sua ligação aos PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor- α*), tendo efeito preventivo sobre as disfunções metabólicas (HOSTETLER; KIER; SCHROEDER, 2006; HELLGREN, 2010). Além disso, também se ligam ao RXR (*retinoid X receptor*), o que resulta na prevenção da teratogênese proveniente do retinol (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002).

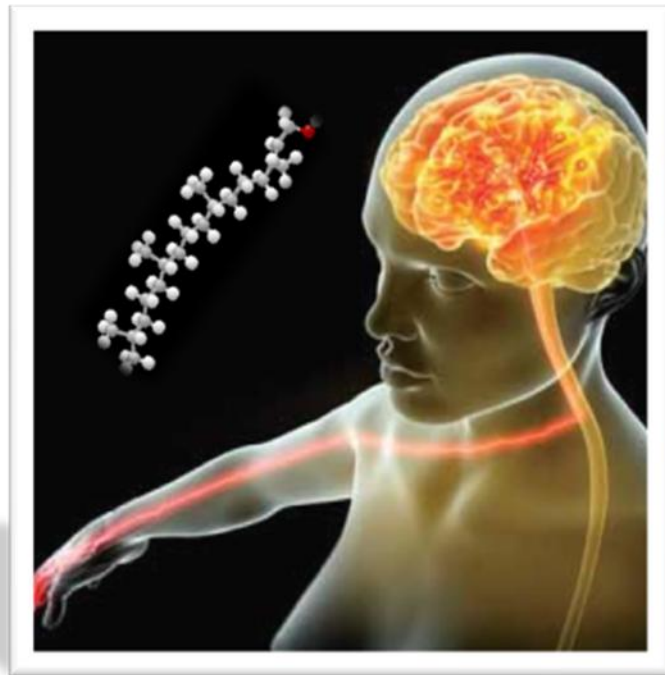
Entretanto, níveis elevados do ácido fitânico são associados com danos neurológicos e anormalidades cerebrais graves, numa desordem genética metabólica muito rara, denominada “Síndrome de Refsum”, na qual o paciente é incapaz de metabolizar o ácido fitânico, resultando no acúmulo deste ácido graxo no sangue e em vários órgãos, como fígado e rins (VERHOEFEN et al., 1998; LANFER-MARQUEZ, 2003; BUSANELLO et al., 2010).

O fitol é usado na indústria como componente de cosméticos, xampus, sabonetes, detergentes, entre outros (McGINTY; LETIZIA; API, 2010). Na literatura, existem diversos estudos de toxicidade que asseguram o uso do fitol nessas formulações. Em relação à toxicidade aguda, a DL_{50} (dose letal que mata 50% dos animais) do fitol foi determinada em ratos, por via oral, e em coelhos, por via dérmica, como sendo maior que 5 g/kg, o que demonstra uma baixa toxicidade

(RIFM, 1977; McGINTY; LETIZIA; API, 2010). No entanto, não foi relatada a DL₅₀ em camundongos por nenhuma via de administração.

Do ponto de vista terapêutico, o fitol e seus análogos demonstraram atividade antimicobacteriana (RAJAB et al., 1998) e antituberculose (SAIKIA et al., 2010). Além disso, o fitol inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2005). Recentemente, Leite (2010), demonstrou que o fitol atua como ativador de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), apresentando efeito antiinflamatório e antinociceptivo em modelos de artrite reumatóide. Entretanto, não há relatos sobre o efeito do Fitol no SNC.

Objetivos



3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ▶ Avaliar a toxicidade aguda e as atividades antinociceptiva e antioxidante do fitol, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

3.2. Específicos

- ▶ Determinar a DL₅₀ do fitol em camundongos por via intraperitoneal;
- ▶ Analisar as alterações bioquímicas e hematológicas de camundongos decorrentes do tratamento agudo com fitol;
- ▶ Investigar os efeitos comportamentais decorrentes do tratamento com fitol, em modelos animais;
- ▶ Estudar o efeito antinociceptivo do fitol por meio de metodologias comportamentais específicas em camundongos;
- ▶ Caracterizar os mecanismos de ação antinociceptiva do fitol, por meio de técnicas farmacológicas com uso de antagonistas específicos;
- ▶ Estudar a atividade antioxidante do fitol por meio de técnicas *in vitro*.

Material e Métodos



4. MATERIAL

4.1. ANIMAIS

No presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, albinos da linhagem *Swiss* (Figura 6), pesando entre 25 a 35g, com, aproximadamente, 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba e do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

No Biotério, os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, sob condições monitoradas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso a uma dieta controlada à base de ração tipo *pellets* (Purina®) e água, disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 as 18h00.

Figura 6 – Camundongo *Swiss* albino.



FONTE: Laboratório da psicofarmacologia, LTF/UFPB

4.1.1. Condições Experimentais

Na sala de experimentação comportamental, onde foram realizados os testes, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 4 animais cada, com pelo menos 60 minutos de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal, bem como permitir

uma adaptação dos mesmos ao novo ambiente. Os animais foram privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

Todos os experimentos foram executados no período compreendido entre 12h00 e 17h00, sendo os animais utilizados uma única vez e, após os experimentos, eutanasiados por deslocamento cervical. Os observadores foram os mesmos em todos os experimentos, para evitar possíveis interferências durante a observação dos parâmetros.

Os experimentos foram realizados no Biotério Prof. Dr. Thomas George (UFPB) e no Biotério do Centro de Ciências Agrárias (UFPI). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFPB, sob a certidão nº 0104/11 e pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (certidão nº 003/11).

O bem-estar dos animais no laboratório foi levado em consideração, de modo que o sofrimento e o estresse dos animais experimentais foram minimizados ao máximo, sendo respeitados, por exemplo, os tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes, como descrito nas metodologias citadas, dessa forma, evitando lesão tecidual. Esta preocupação ocorreu tanto durante o experimento quanto ao final, no momento da eutanásia, obedecendo aos Princípios Éticos em Pesquisa Animal.

4.2. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- ▶ 2-deoxirribose (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Ácido Acético Glacial (Reagen - Brasil);
- ▶ Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Ácido tricloroacético (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Anticoagulante HB (Laborlab[®]);
- ▶ AAPH (2,2'-azobis[2metilpropionamidina]diidrochloride) (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Cloridrato de Morfina (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Diazepam (Merck – Brasil);
- ▶ Fitol (97% de pureza) (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);

- ▶ Glibenclamida (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical - EUA);
- ▶ Indometacina (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Nitroprussiato de sódio (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Padrão fosfato (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Pentobarbital sódico (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Peróxido de hidrogênio (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Reagente de Griess (Sigma – E.U.A.);
- ▶ Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- ▶ Tween 80 (Sigma – E.U.A.).

A preparação das doses foi realizada minutos antes de sua utilização, sendo dissolvidas em água destilada, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do animal, com a exceção da formalina que foi injetada, por via intraplantar, sempre na quantidade de 20 µL.

4.3 APARELHAGEM

4.3.1. APARELHO DO ROTA-ROD

O aparelho de *rota-rod* utilizado foi o modelo EFF 412, fabricado pela Insight®, Brasil. Trata-se de um aparelho de acrílico resistente (450 mm de altura x 540 mm de largura x 350 mm de profundidade), que possui uma barra giratória suspensa, dividida em quatro compartimentos iguais, separados por paredes plásticas, com velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.) (Figura 7). Este aparelho ainda dispõe de um mecanismo automático capaz de contabilizar o tempo de permanência do animal na barra giratória, por meio de uma prancha acoplada a um sistema de detecção de queda do animal, que por meio do impacto, interrompe automaticamente o contador digital de tempo.

Figura 7 – Aparelho do *rota-rod*.



FONTE: <http://insightltda.com.br>. Acessado em: 12/07/2011

4.3.2. CAIXA DE OBSERVAÇÃO PARA O TESTE DA FORMALINA

Este aparato é formado de um encaixe de metal que forma uma caixa triangular em ângulo de 45°, com os lados e altura medindo 25 cm cada, sendo duas paredes formadas por espelho e uma de vidro transparente, que possibilita ao observador um maior campo de visão (Figura 8).

Figura 8 – Caixa de observação.



FONTE: Laboratório da psicofarmacologia, LTF/UFPB

4.3.3. APARELHO DA PLACA QUENTE

O modelo do aparelho utilizado foi o HOT PLATE LE 7406, do fabricante L Si Letica - Scientific Instruments (Panlab S.L. - Espanha). Consiste em uma

superfície plana aquecida, cuja temperatura pode ser controlada até 62°C. É acoplada a um sistema de contador de tempo acionado e parado com o uso de um pedal, e para evitar que o animal fuja, a placa é envolta por um cilindro de acrílico transparente, que permite a observação do animal (Figura 9).

Figura 9 – Aparelho da placa quente.



FONTE: Laboratório da psicofarmacologia, LTF/UFPB

4.3.4. OUTROS APARELHOS UTILIZADOS

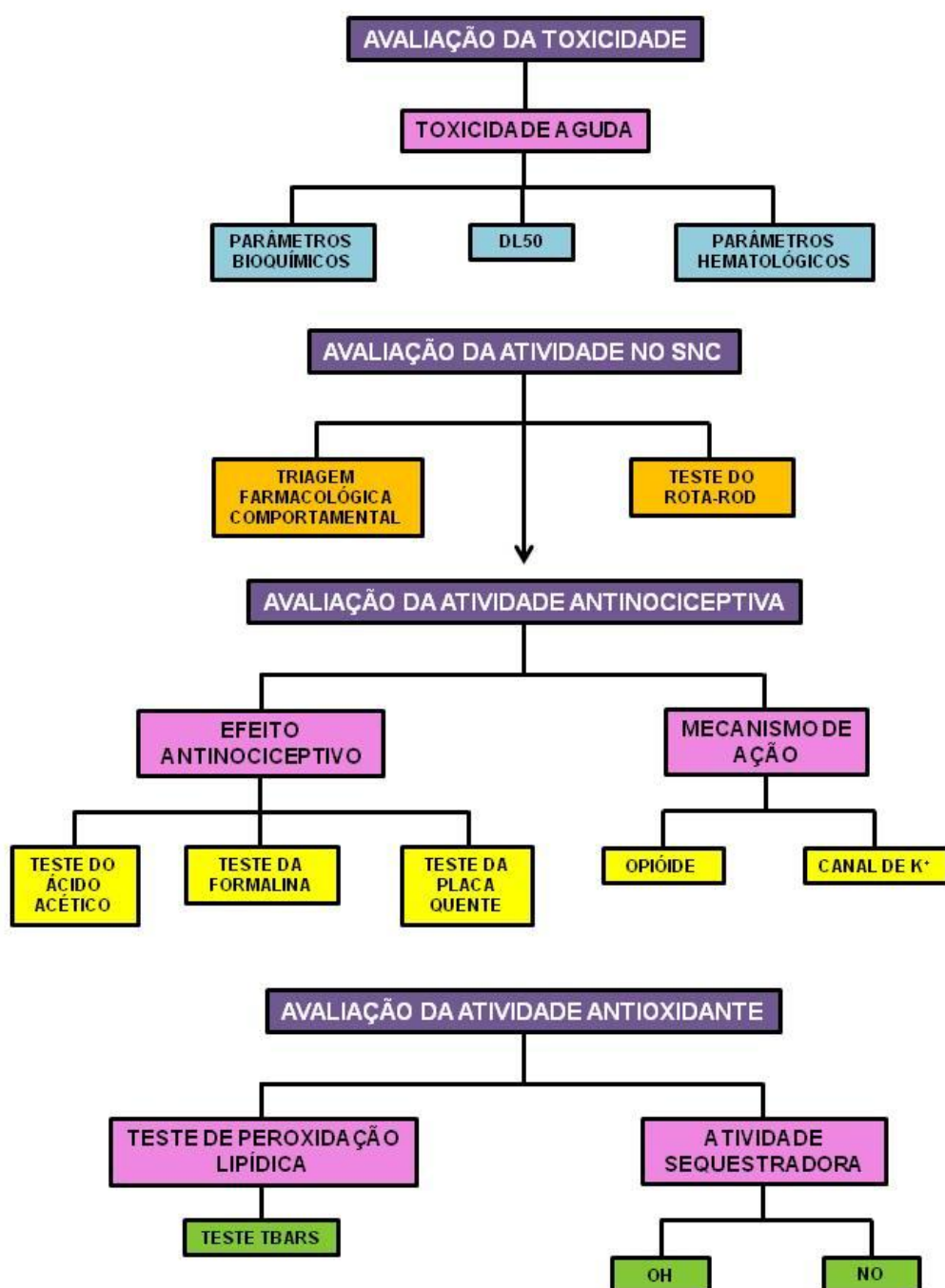
Além dos aparelhos especificados acima, foram utilizados:

- ▶ Centrífuga;
- ▶ Aparelho automático Labmax 240 (Labtest);
- ▶ Espectrofotômetro.

5. MÉTODOS

Todos os métodos utilizados para o estudo das atividades do fitol estão esquematizados na figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática do estudo realizado com o fitol.



5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FITOL

5.1.1. TOXICIDADE AGUDA – DL₅₀

A avaliação da toxicidade aguda compreende uma etapa fundamental, que antecede os ensaios farmacológicos, sendo desenvolvida com o objetivo de fornecer dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância e seus efeitos adversos num organismo submetido a um tratamento de curta duração (SÁ; ALMEIDA, 2006).

Para a realização desse teste, o fitol foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) em quatro doses diferentes, estabelecidas através de progressão geométrica: 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg, em grupos de 10 camundongos, além do grupo controle, tratado com o veículo utilizado para preparar as doses do fitol (água destilada e tween 80 a 0,2%). O volume administrado nos animais obedeceu à proporção de 0,1 mL/10g de peso corporal.

Após a administração, os animais foram observados continuamente por um período de 4h e, após 24h, foram observados uma vez ao dia durante 14 dias, a fim de registrar a mortalidade causada pelo fitol (TWAIJ et al., 1983; RHIOUANI et al., 2008).

A DL₅₀ (dose letal que mata 50% dos animais) foi paralelamente investigada, levando-se em consideração a mortalidade ocorrida até o período de 14 dias da administração do fitol, de acordo com o método de Litchfield e Wilcoxon (1949).

5.1.1.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para a análise bioquímica, imediatamente após o tratamento (via i.p.) com veículo ou fitol nas doses 100 e 200mg/kg, o soro dos camundongos foi retirado e centrifugado a 3.500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os seguintes parâmetros: glicose, uréia, creatinina, colesterol total (CT), triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Os ensaios

foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest) com kits de diagnóstico padrão da Labtest®.

5.1.1.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para a determinação dos parâmetros hematológicos, os valores para hemácias, leucócitos totais, linfócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FITOL NO SNC

5.2.1. TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

A triagem farmacológica comportamental, descrita por Almeida e colaboradores (1999) e Almeida e Oliveira (2006), é uma metodologia preliminar para avaliar o possível efeito de uma droga no SNC, na qual são observados alguns parâmetros comportamentais no animal que possibilitam sugerir o efeito central da droga em estudo.

Através desta metodologia é realizada uma avaliação qualitativa dos efeitos, sendo bastante útil na detecção preliminar de novos agentes com potencial atividade psicotrópica. O protocolo da triagem agrupa os comportamentos, pela sua predominância, em depressores ou estimulantes do SNC ou manifestações autonômicas (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Para este teste, os animais foram divididos em grupos de 8 sendo tratados com fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg e o grupo controle recebeu

o veículo. Em seguida, os parâmetros comportamentais foram observados até os primeiros 30 minutos da administração e com 1h, 2h, 3h e 4h, seguindo-se o protocolo experimental padrão (Quadro 2) (ALMEIDA et al., 1999).

Quadro 2 – Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30´	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

FONTE: ALMEIDA et al., 1999.

5.2.2. TESTE DO ROTA-ROD

O teste da barra giratória (*Rota-rod*) foi inicialmente proposto por Dunham e Miya (1957). Através desta metodologia, é possível detectar o efeito de relaxamento muscular ou de incoordenação motora produzido por várias drogas depressoras do SNC (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANCA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). Consiste em colocar camundongos sobre uma barra que gira a uma velocidade constante e verificar a capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma, durante um intervalo de tempo pré-estabelecido (MATTEI; FRANCA, 2006).

Os camundongos foram pré-selecionados 24h antes do teste, através das mesmas condições usadas no teste (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). Uma vez selecionados, os animais receberam fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg, veículo ou diazepam (4 mg/kg, i.p.), sendo avaliado o tempo total de permanência sobre a barra giratória, com até 3 reconduções, em três intervalos de tempo (30, 60 e 120).

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO FITOL

5.3.1. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Esta metodologia baseia-se na indução de nocicepção através da administração intraperitoneal da solução de ácido acético a 0,85% (DERARDT et al., 1980; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006), o que gera reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Para este experimento, grupos de 8 camundongos receberam os seguintes pré-tratamentos: veículo, fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg,

indometacina (AINE, 10 mg/kg), e morfina (opióide, 6 mg/kg), sendo estas duas últimas drogas padrões. Transcorridos 30 minutos dos tratamentos, os animais foram tratados com ácido acético a 0,85% (0,1 mL/10 g) por via i.p. e, após 10 minutos foi procedida a contagem do número de contorções abdominais por um período de observação de 10 minutos.

5.3.2. TESTE DA FORMALINA

O teste da formalina foi realizado como descrito por Vaz e colaboradores (1996) que representa uma modificação do modelo original de Hunskaar, Fasmar e Hole, (1985).

Nessa metodologia, uma solução de formalina a 2,5% é injetada na região subplantar da pata posterior do camundongo, o que leva à estimulação dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata injetada do animal considerado indicativo de resposta nociceptiva. São observadas duas fases: a primeira fase, que normalmente ocorre nos cinco primeiros minutos após a injeção da formalina, levando a uma resposta neurogênica; em seguida há uma interfase de aproximadamente 10 minutos caracterizada por mecanismos inibitórios da dor; e a segunda fase (15-30 minutos) é conhecida principalmente por uma resposta inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Foram utilizados grupos de 8 camundongos, os quais receberam por via i.p. os seguintes pré-tratamentos: veículo (grupo controle), fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg, morfina (6 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg). Após 30 minutos, 20µL de solução de formalina 2,5% (que consiste em 0,92% de formaldeído em solução salina) foi injetada na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos, e imediatamente foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo total de lambida da pata que recebeu a formalina durante 5 minutos (1ª fase). Após um período de 10 minutos, novamente contabilizou-se o parâmetro citado por mais 15 minutos (2ª fase).

5.3.3. TESTE DA PLACA QUENTE

Descrito inicialmente por Woolfe e MacDonald (1944), neste método é quantificado o tempo de reação do animal ao estímulo térmico fornecido pela placa aquecida a 53 ± 1 °C, baseando-se no limiar para a dor que, dependendo do tipo de fibra, varia de 43 a 53 °C (JULIUS; BASBAUM, 2001). O efeito nociceptivo é caracterizado pelo comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambear uma das patas (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). O parâmetro avaliado é a latência, ou seja, o tempo entre a colocação do animal na placa e um dos comportamentos citados.

Após uma pré-seleção, na qual os animais que respondiam num limiar muito baixo (até 15 segundos) foram descartados do teste, os animais aptos foram agrupados (N=8) e receberam veículo, fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg, ou morfina (droga padrão), na dose de 10 mg/kg e, em seguida, foram submetidos à avaliação decorridos 30, 60 e 120 minutos da administração. É importante ressaltar que a latência foi quantificada num tempo máximo de 30 segundos, para evitar lesão tecidual nos animais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

5.3.4. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO FITOL

Depois de realizados os testes antinociceptivos descritos acima, foram investigados possíveis mecanismos pelos quais o fitol poderia estar causando o efeito encontrado. Estes estudos se basearam na utilização de ferramentas farmacológicas que atuam especificamente em receptores envolvidos com a transmissão da dor. Para a realização desta investigação, foi escolhido o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, uma vez que este teste envolve respostas centrais e periféricas.

5.3.4.1. PARTICIPAÇÃO DA VIA OPIÓIDE

Para investigar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do fitol, foi utilizada a naloxona como ferramenta, um antagonista

não-seletivo dos receptores opióides (JIN et al., 2010). O princípio deste teste baseia-se na possível competição entre agonistas e antagonistas pela ligação ao receptor opióide. Uma vez que a substância-teste atue no receptor estudado, o seu efeito antinociceptivo será revertido pela ligação da naloxona ao receptor.

Grupos de 8 camundongos foram tratados com: veículo, fitol (100 mg/kg), morfina (6 mg/kg) ou naloxona (5 mg/kg, s.c.). Outros dois grupos foram injetados, inicialmente, com naloxona e, após 15 minutos, receberam fitol (100 mg/kg) ou morfina (6 mg/kg). Em seguida, foi quantificado o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, como descrito anteriormente.

5.3.4.2. PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K^+_{ATP}

O envolvimento dos canais de K^+_{ATP} na atividade antinociceptiva do fitol também foi investigada, uma vez que é evidente a participação destes canais com o processo de antinocicepção.

Para investigar se o fitol exerce seu efeito antinociceptivo ativando este canal, foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia que bloqueia especificamente estes canais (OCANA et al., 1990; 2004).

Grupos de 8 camundongos foram tratados com: veículo, fitol (100 mg/kg), morfina (6 mg/kg) ou glibenclamida (5 mg/kg, s.c.). Outros dois grupos foram injetados, inicialmente, com glibenclamida e, após 15 minutos, receberam fitol (100 mg/kg) ou morfina (6 mg/kg). Em seguida, o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, foi quantificado como descrito anteriormente.

5. 4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FITOL

5.4.1. AVALIAÇÃO DO FITOL SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA – TBARS

O método utilizado para avaliar a ação do fitol sobre a peroxidação lipídica, um dos principais danos causados pelas EROs/ERNs foi a determinação

das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecido como método *TBARS* (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*) (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991).

Este método foi usado para medir a capacidade antioxidante do fitol num meio rico em lipídios (GUIMARÃES et al., 2010). O substrato rico em lipídios adotado foi a gema de ovo homogeneizada (1% p/v) em 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Um mL do substrato foi sonificado e então homogeneizado com 0,1 mL de fitol, em diferentes concentrações (0,9 – 1,8 – 3,6 – 5,4 – 7,2 ng/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis [2metilpropionamidina] diidrocloride) (0,12 M). O controle recebeu apenas o veículo (0,05% tween 80 dissolvido em salina 0,9%). As reações foram realizadas por 30 minutos a 37°C. Após resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 x g por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturado com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67%) e aquecido a 95°C por 30 minutos. Após resfriamento, a absorbância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de TBARS formada a partir do AAPH apenas (controle induzido). O Trolox foi utilizado como droga-padrão.

5.4.2. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

Para avaliar a atividade antioxidante do fitol, foram adotadas, ainda, duas outras metodologias que se baseiam na capacidade de uma substância seqüestrar radicais livres, através da interação direta de uma substância com moléculas reativas, convertendo os radicais livres em espécies menos reativas e, portanto, mais estáveis (HOELZL et al., 2005).

5.4.2.1. RADICAL HIDROXILA ($\bullet$ OH)

A formação do radical hidroxila ($\bullet$ OH) a partir da reação de Fenton foi quantificada usando a degradação oxidativa do açúcar 2-desoxirribose (LOPES; SCHULMAN; LIMA, 1999).

O princípio do teste é a quantificação do produto de degradação deste açúcar, o malonaldeído (MDA), pela sua condensação com o TBA. Reações típicas foram iniciadas pela adição de Fe^{2+} (FeSO_4 6 mM concentração final) à solução contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 e 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Para medir a atividade antioxidante do fitol contra o radical hidroxila, diferentes concentrações do fitol (0,9 – 1,8 – 3,6 – 5,4 – 7,2 ng/mL) foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe^{2+} . As reações foram realizadas por 15 minutos em temperatura ambiente, e foram estacionadas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de TBA (w/v, em 50 mM NaOH). As soluções foram fervidas por 15 minutos a 95 °C, e então resfriadas em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes MDA formados pelo Fe^{2+} e H_2O_2 .

5.4.2.2. ÓXIDO NÍTRICO (•NO)

Neste teste, o óxido nítrico (NO) foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP) em 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Uma vez formado, o NO interagiu com o oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006).

A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de SNP em padrão fosfato e fitol, nas diferentes concentrações (0,9 – 1,8 – 3,6 – 5,4 – 7,2 ng/mL) foi incubada a 37 °C por 1h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. O percentual de inibição da produção de NO foi determinado por comparação dos valores de absorbância do controle negativo (apenas 10 mM SNP e veículo) e as preparações testes. Os resultados foram expressos como percentagem de nitritos formados por SNP apenas.

5. 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

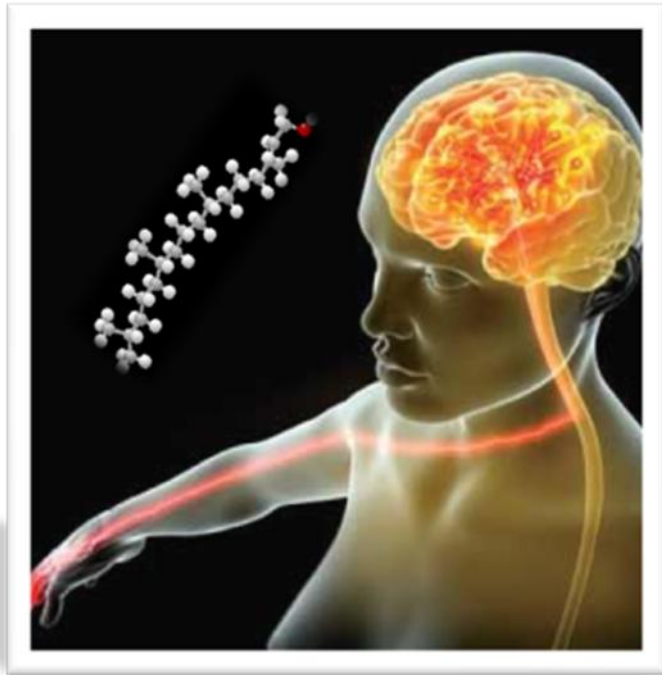
Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação “*one-way*”, seguido do teste de Dunnett ou teste “t” de Student não pareado, ou ainda utilizando-se o teste de Neuman-Keuls. Os valores obtidos, exceto os da DL₅₀ foram expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.

Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA). O programa Trimmed Spearman-Kärber Method, versão 1,5, foi utilizado para calcular a DL₅₀.

A percentagem de inibição foi determinada usando a seguinte fórmula (REANMONGKOL et al., 1994):

$$\% \text{ inibição} = 100 \times (\text{controle} - \text{experimental}) / \text{controle}$$

Resultados



6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FITOL

6.1.1. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA / DL_{50}

A toxicidade aguda do fitol foi observada por um período de 14 dias após o tratamento, contabilizando-se o número de mortes em cada dose, como mostra a tabela 1, para determinar a DL_{50} . Nos 14 dias de observação, a mortalidade nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg foram, respectivamente, de: 10%, 20%, 60% e 100%.

A partir dos resultados obtidos, a DL_{50} foi calculada em 1153,39 mg/kg, apresentando um intervalo de confiança entre 944,56 e 1408,40 mg/kg.

Tabela 1 – Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses do fitol.

DOSES DO FITOL (mg/kg)	% DE MORTES ATÉ 14 DIAS
250	10
500	20
1000	60
2000	100

(n = 10 animais/grupo)

6.1.1.1. EFEITO DO FITOL SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

De acordo com a tabela 2, o tratamento dos animais com fitol, nas doses de 100 e 200 mg/kg, não alterou os parâmetros bioquímicos analisados, em comparação aos animais do grupo controle.

Tabela 2 – Efeito do tratamento agudo com fitol sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos.

PARÂMETROS	CONTROLE	FITOL 100	FITOL 200
Glicose (mg/dL)	93.67 ± 1.69	91.67 ± 3.77	96.83 ± 5.99
Uréia (mg/dL)	50.89 ± 1.45	47.33 ± 4.60	45.50 ± 4.53
Creatinina (mg/dL)	0.36 ± 0.01	0.28 ± 0.07	0.32 ± 0.08
Triglicerídeos (mg/dL)	100.6 ± 3.12	152.5 ± 9.12	158.5 ± 19.38
CT (mg/dL)	86.07 ± 0.57	81.83 ± 2.44	82.33 ± 8.20
AST (U/mL)	49.67 ± 3.62	56.50 ± 13.32	59.50 ± 4.98
ALT (U/mL)	91.67 ± 1.92	144.0 ± 20.13	122.7 ± 12.1

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 10) vs grupo controle (ANOVA e teste t-Student e Newman-Keuls).

6.1.1.2. EFEITO DO FITOL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A tabela 3 mostra que o tratamento dos animais com fitol, nas doses de 100 e 200 mg/kg, também não alterou os parâmetros hematológicos analisados, em comparação aos animais do grupo controle.

Tabela 3 – Efeito do tratamento agudo com fitol sobre os parâmetros hematológicos de camundongos.

PARÂMETROS	CONTROLE	FITOL 100	FITOL 200
Hemácias (mm ³)	8.00 ± 0.23	7.84 ± 0.83	9.20 ± 0.80
Hemoglobina (g/dL)	14.00 ± 0.15	13.80 ± 0.85	10.60 ± 0.73
Hematócrito (%)	43.33 ± 0.28	39.38 ± 2.39	38.00 ± 1.30
VCM (fL)	48.78 ± 0.27	52.60 ± 1.40	50.68 ± 1.70
HCM (pg)	19.44 ± 1.58	21.20 ± 1.39	22.16 ± 1.02
CHCM (g dL)	38.11 ± 2.08	38.18 ± 1.53	40.19 ± 2.12
Plaquetas (mm ³)	292.40 ± 0.83	296.2 ± 39.47	263.2 ± 15.32
Linfócitos (%)	69.98 ± 3.60	66.98 ± 4.15	61.88 ± 6.34
Leucócitos (mm ³)	8.63 ± 0.03	7.91 ± 0.54	8.00 ± 0.28

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 10) vs grupo controle (ANOVA e teste t-Student e Newman-Keuls).

6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FITOL NO SNC

6.2.1. EFEITO DO FITOL NA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

Os resultados obtidos a partir da triagem farmacológica comportamental com os animais tratados com fitol nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg, estão apresentados no quadro 3.

Até os 30 minutos após a administração do fitol, foi observada a diminuição da ambulação e da resposta ao toque, além da presença de analgesia em todas as doses. A ambulação diminuída e a analgesia foram observadas ainda aos 60 minutos.

Na dose de 50 mg/kg, a analgesia não foi observada aos 120 minutos, mas aos 180 minutos este parâmetro voltou a ser observado. Na dose de 100 mg/kg, a analgesia persistiu até os 120 minutos, enquanto que na dose de 200 mg/kg foi registrada até os 180 minutos.

Quadro 3 – Alterações comportamentais observadas em camundongos após a administração do fitol.

DOSES (mg/kg)	TEMPO DE OBSERVAÇÃO	EFEITOS OBSERVADOS
25	Até 30	Resposta ao toque (–); Ambulação (–); Analgesia (+)
	60'	Analgesia (+); Ambulação (–).
	120'	-
	180'	-
	240'	-
50	Até 30	Resposta ao toque (–); Ambulação (–); Analgesia (+).
	60'	Ambulação (–); Analgesia (++)
	120'	-
	180'	Analgesia (+).
	240'	-
100	Até 30	Resposta ao toque (–); Ambulação (–); Analgesia (++)
	60'	Ambulação (–); Analgesia (+).
	120'	Analgesia (+).
	180'	-
	240'	-
200	Até 30	Resposta ao toque (–); Ambulação (–); Analgesia (++)
	60'	Ambulação (–); Analgesia (++)
	120'	Analgesia (+).
	180'	Analgesia (+).
	240'	-

[(–) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso] (n=8).

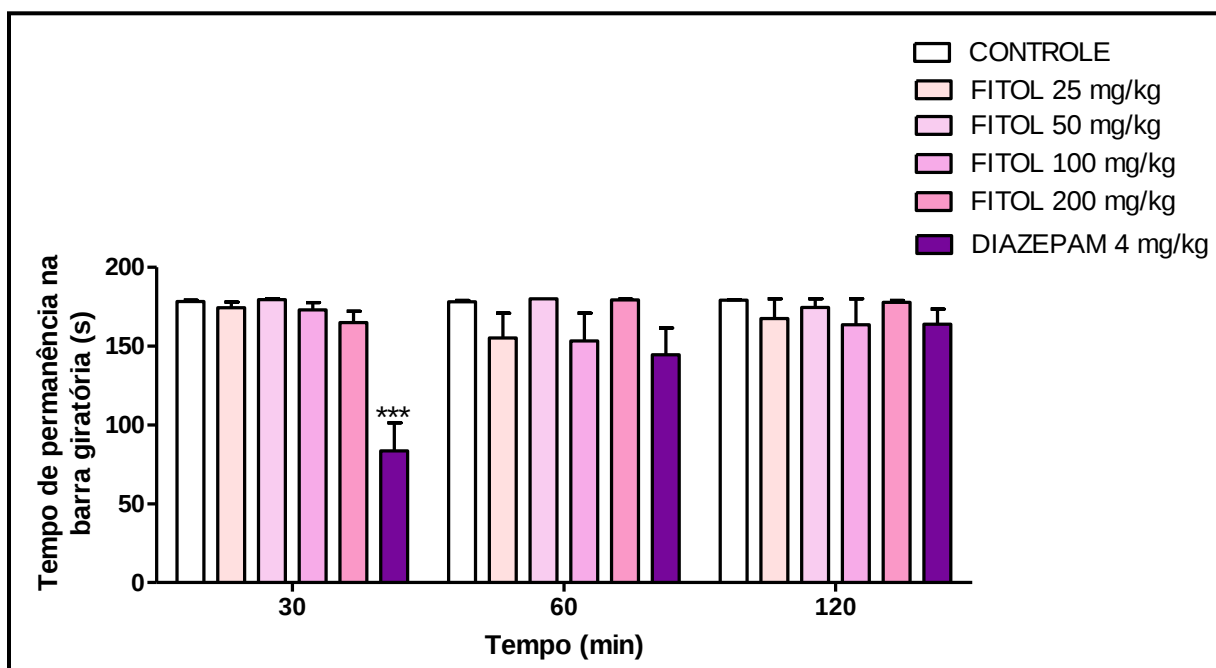
6.2.1. EFEITO DO FITOL NO TESTE DO ROTA-ROD

Não foram observadas alterações significativas no desempenho dos animais tratados com fitol, nas doses de 25, 50, 100 ou 200 mg/kg durante a avaliação aos 30 ($174,3 \pm 3,6$; $179,5 \pm 0,5$; $173,0 \pm 4,5$; $165,0 \pm 7,1$), aos 60 ($155,1 \pm 15,8$; $180,0 \pm 0,0$; $153,3 \pm 17,6$; $179,3 \pm 0,5$) ou aos 120 ($167,6 \pm 12,4$; $174,6 \pm 5,4$; $163,6 \pm 16,4$; $177,8 \pm 1,2$) minutos no aparelho de *rota-rod*, comparados ao grupo controle, nos mesmos períodos de avaliação, aos 30 ($178,3 \pm 0,9$), 60 ($178,1 \pm 0,9$) e 120 ($179,1 \pm 0,4$) minutos (Gráfico 1).

O grupo tratado com diazepam (4 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais na barra giratória ($83,5 \pm 17,9^{***}$) durante a

avaliação aos 30 minutos. No entanto, aos 60 e 120 minutos não houve alteração significativa ($144,5 \pm 17,1$; $164,0 \pm 9,5$, respectivamente) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Efeito do fitol e diazepam sobre o tempo de permanência (s) dos camundongos na barra giratória.



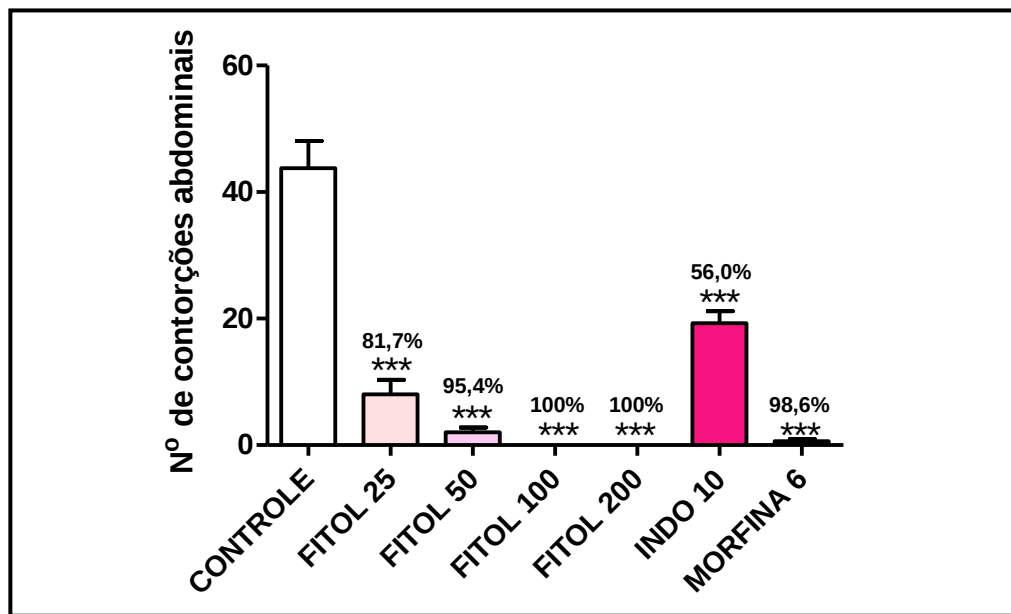
Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8), ***p<0,001 vs controle (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett).

6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO FITOL

6.3.1. EFEITO DO FITOL NO TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Como mostrado no gráfico 2, em todos os grupos tratados com fitol ocorreu diminuição significativa das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). A percentagem de inibição das contorções foi de: 25: 81,7% ($8,0 \pm 2,3$); 50: 95,4% ($2,0 \pm 0,8$); 100 e 200 mg/kg: 100% ($0,0 \pm 0,0$) de inibição. Nos grupos tratados com indometacina (10 mg/kg) e morfina (6 mg/kg), a inibição foi de 56,0% ($19,3 \pm 2,0$) e 98,6% ($0,6 \pm 0,3$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($43,8 \pm 4,3$).

Gráfico 2 – Efeito do fitol, indometacina e morfina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.



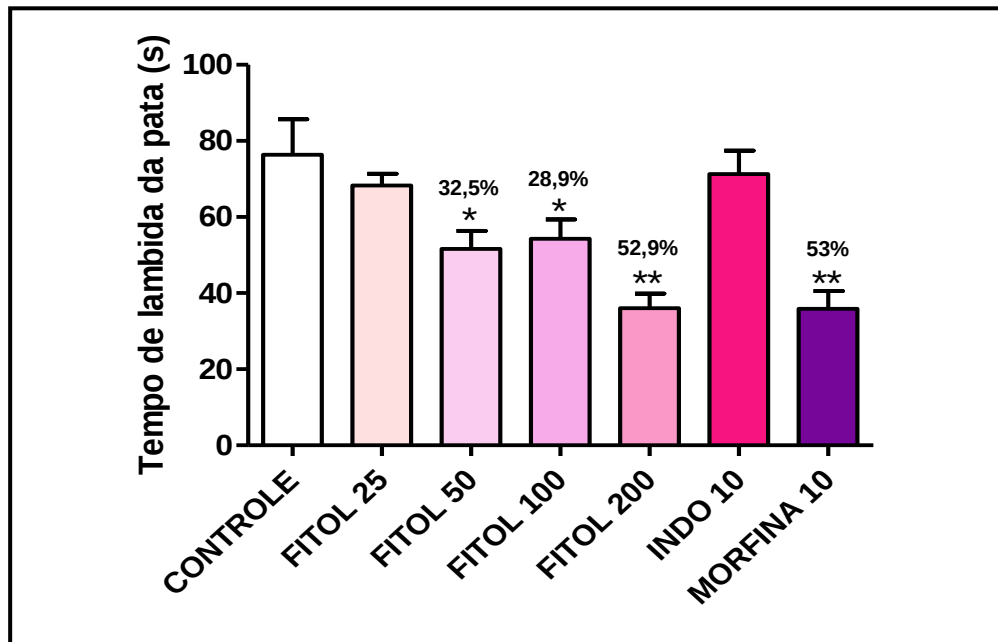
Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett) (INDO = indometacina).

6.3.2. EFEITO DO FITOL NO TESTE DA FORMALINA

Os resultados obtidos durante a primeira fase do teste da formalina podem ser observados no gráfico 3. Os camundongos tratados com fitol na dose de 25 mg/kg ($68,3 \pm 3,1$) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($76,4 \pm 9,4$), no entanto, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg houve diminuição do tempo de lambida da pata de forma significativa, apresentando valores de inibição de 32,5% ($51,6 \pm 4,7$), 28,9% ($54,3 \pm 5,1$), e 52,9% ($36,0 \pm 3,9$), respectivamente, comparados ao grupo controle. A indometacina não foi capaz de reduzir este parâmetro ($71,3 \pm 6,2$), mas a morfina diminuiu significativamente, apresentando 53,0% ($35,9 \pm 4,7$) de inibição.

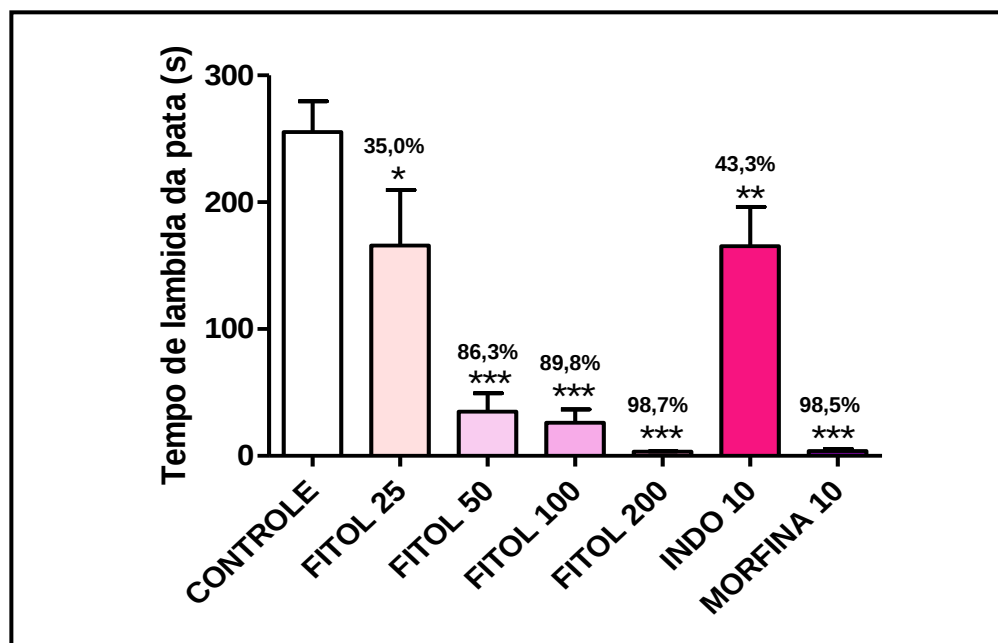
Na segunda fase do teste da formalina (Gráfico 4), a dose de 25 mg/kg apresentou 35,0% ($165,8 \pm 44,0$) em relação ao grupo controle ($255,3 \pm 24,3$), enquanto as doses de 50, 100 e 200 mg/kg apresentaram, respectivamente, 86,3% ($34,9 \pm 14,6$), 89,8% ($26,0 \pm 10,6$) e 98,7% ($3,3 \pm 0,3$) de inibição do tempo de lambida da pata. Os grupos tratados com indometacina e morfina também reduziram significativamente este parâmetro, com 43,3% ($165,4 \pm 31,0$) e 98,5% ($3,8 \pm 1,6$) de inibição, respectivamente.

Gráfico 3 – Efeito do fitol, indometacina e morfina na primeira fase do teste da formalina em camundongos.



Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). *p<0,05; **p<0,01 vs controle (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett) (INDO = indometacina).

Gráfico 4 – Efeito do fitol, indometacina e morfina na segunda fase do teste da formalina em camundongos.



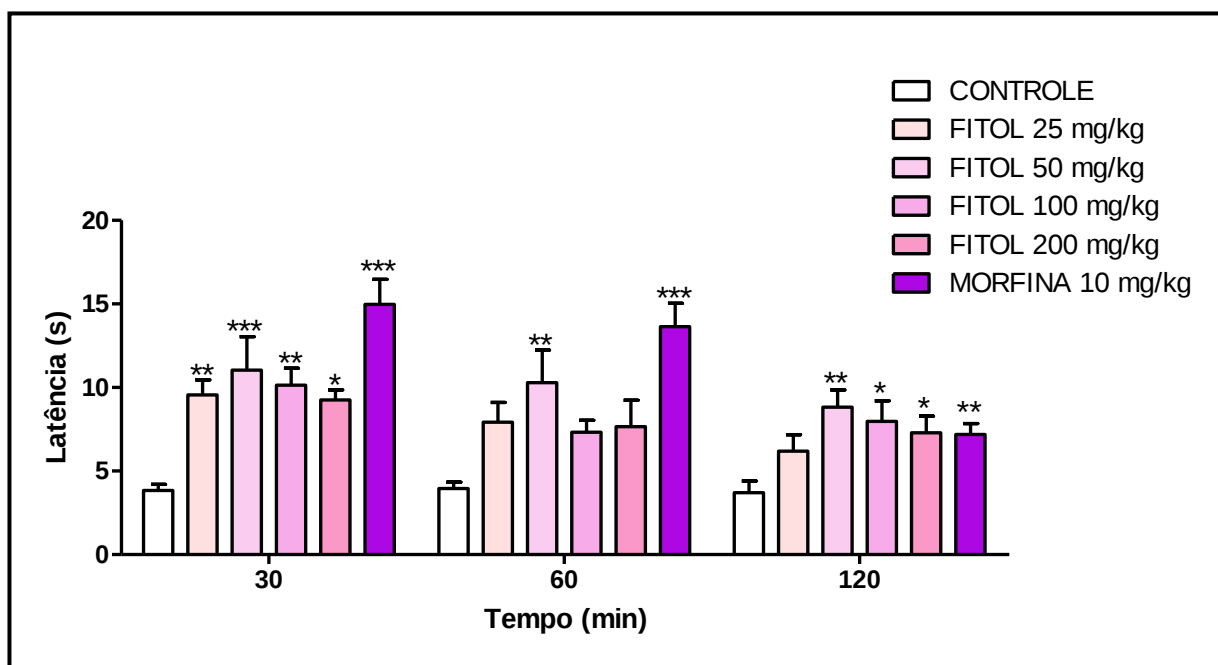
Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs controle (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett) (INDO = indometacina).

6.3.3. EFEITO DO FITOL NO TESTE DA PLACA QUENTE

De acordo com o gráfico 5, o fitol foi capaz de aumentar a latência (em segundos) dos animais em resposta ao estímulo térmico após 30 minutos de sua administração. As doses de 25 ($9,6 \pm 0,9$), 50 ($11,0 \pm 2,0$), 100 ($10,1 \pm 1,0$) e 200 ($9,3 \pm 0,6$) mg/kg, bem como o grupo tratado com morfina ($15,0 \pm 1,5$) prolongaram a permanência dos camundongos no aparelho significativamente, quando comparados ao grupo controle ($3,8 \pm 0,4$).

Apenas a dose de 50 mg/kg de fitol e a morfina mantiveram o aumento da latência de forma significativa aos 60 min, com $10,3 \pm 1,9$ e $13,6 \pm 1,4$, respectivamente. Aos 120 minutos de observação, a morfina e todas as doses de fitol, exceto a de 25 mg/kg, apresentaram aumento deste parâmetro (morfina: $7,2 \pm 0,6$; 50: $8,8 \pm 1,0$; 100: $8,0 \pm 1,2$ e 200: $7,3 \pm 1,0$). A morfina também manteve o aumento significativo aos 120 minutos de observação (controle em 60: $3,9 \pm 0,4$; 120: $3,7 \pm 0,7$).

Gráfico 5 – Efeito do fitol e morfina no teste da placa quente em camundongos.



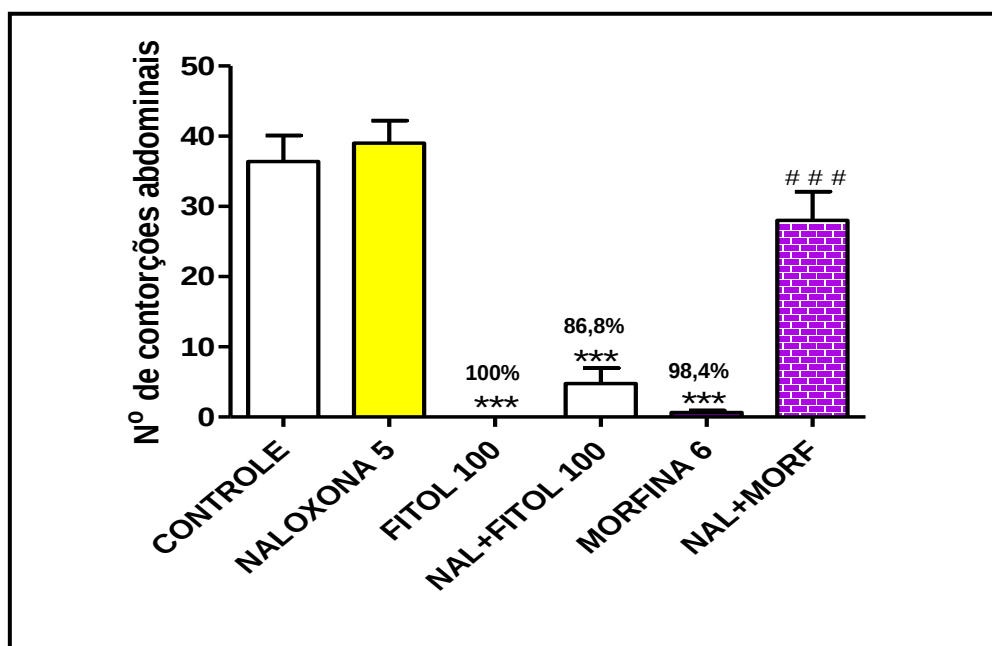
Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett).

6.3.4. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO FITOL

6.3.4.1. PARTICIPAÇÃO DA VIA OPIÓIDE

O gráfico 6 mostra o efeito do fitol sobre a via opióide, no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O grupo tratado com naloxona ($39,0 \pm 3,2$) não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($36,4 \pm 3,7$). Tanto o fitol, na dose de 100 mg/kg ($0,0 \pm 0,0$) como a morfina ($0,6 \pm 0,3$) reduziram significativamente o número de contorções abdominais comparados ao controle, apresentando uma porcentagem de inibição de 100% e 98,4%, respectivamente. O tratamento com naloxona não reverteu o efeito do fitol (grupo naloxona + fitol: $4,8 \pm 2,2$), de modo que este grupo apresentou 86,8% de inibição em relação ao controle. Ao contrário, a morfina teve seu efeito revertido pela naloxona (grupo naloxona $\pm$ morfina: $28,0 \pm 4,1$), comparando o grupo tratado com morfina e o grupo tratado com naloxona + morfina.

Gráfico 6 – Efeito do fitol e morfina no teste do ácido acético em camundongos, na presença de naloxona.

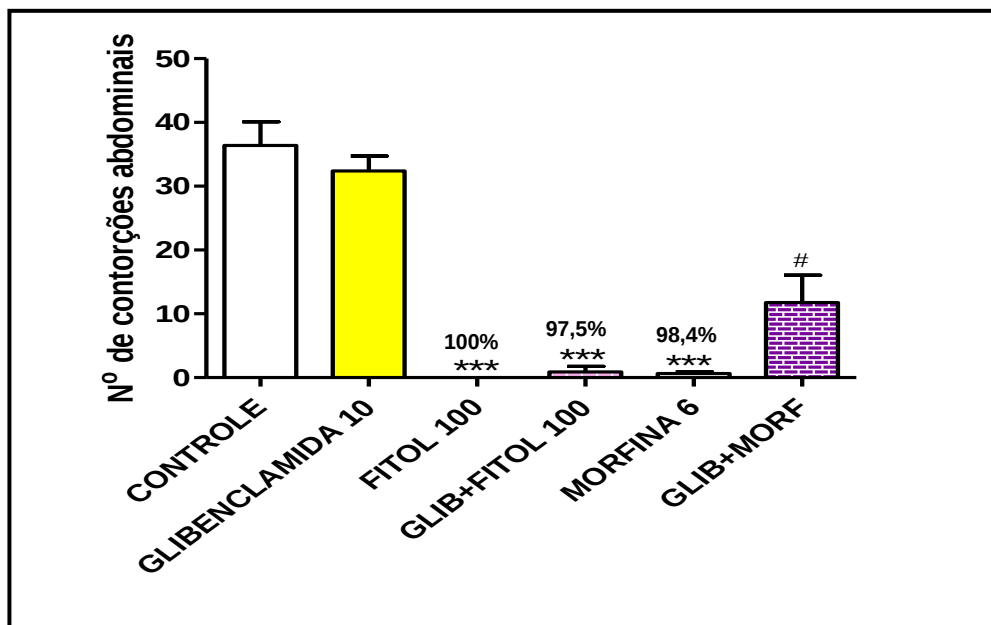


Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). ***p<0,001 vs controle; ###p<0,001 vs morfina (teste t-Student).

6.3.4.2. PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K^+_{ATP}

No gráfico 7, observamos o efeito do fitol sobre os canais de K^+_{ATP} , no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O grupo tratado com glibenclamida ($32,4 \pm 2,3$) não apresentou diferença significativa. Tanto o fitol, na dose de 100 mg/kg ($0,0 \pm 0,0$) como a morfina ($0,6 \pm 0,3$) reduziram significativamente o número de contorções abdominais em relação ao controle ($36,4 \pm 3,7$), apresentando uma porcentagem de inibição de 100% e 98,4%, respectivamente. O tratamento com glibenclamida não reverteu o efeito do fitol, de modo que este grupo apresentou 97,5% ($0,9 \pm 0,9$) de inibição em relação ao controle. A morfina, por sua vez, teve seu efeito revertido pela glibenclamida ($11,8 \pm 4,3$), comparando o grupo tratado com morfina e o grupo tratado com glibenclamida + morfina.

Gráfico 7 – Efeito do fitol e morfina no teste do ácido acético em camundongos, na presença de glibenclamida.



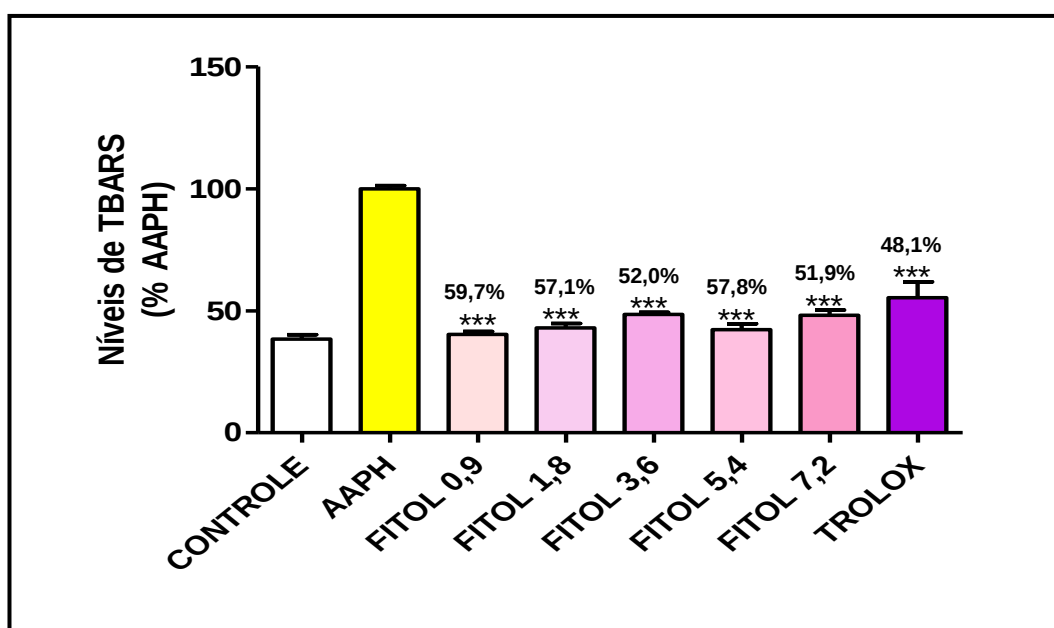
Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=8). ***p<0,001 vs controle; #p<0,05 vs morfina (teste t-Student).

6.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FITOL

6.4.1. EFEITO DO FITOL SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA – TBARS

O efeito do fitol sobre a peroxidação lipídica foi analisado pelo método TBARS. Os resultados obtidos mostram que, em todas as concentrações testadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 ng/mL), o fitol causou uma diminuição significativa na produção de TBARS em relação ao grupo AAPH ($99,9 \pm 1,3$), com inibição de: 59,65% ($40,4 \pm 1,2$); 57,08% ($42,9 \pm 1,9$); 51,92% ($48,5 \pm 0,8$); 57,74% ($42,3 \pm 2,4$); 51,88% ($48,1 \pm 2,2$), respectivamente. O Trolox, droga padrão utilizada, também reduziu o parâmetro observado, apresentando 48,12% ($55,4 \pm 6,5$) de inibição.

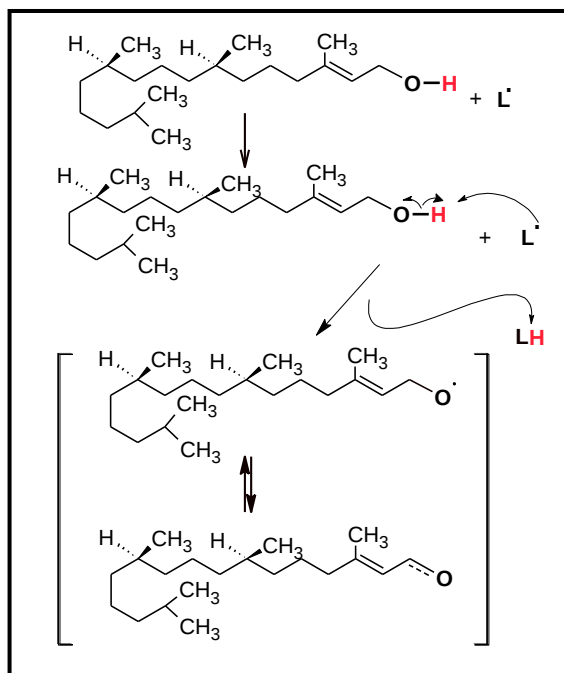
Gráfico 8 – Efeito do fitol nos níveis de TBARS *in vitro*.



O grupo controle significa a peroxidação lipídica basal com veículo apenas (Tween 80 + salina); o grupo AAPH representa 100% de dano oxidativo. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=5) e os experimentos foram feitos em duplicata. *** $p < 0.001$ vs AAPH (ANOVA e teste *t*-Student-Neuman-Keuls).

O mecanismo provável pelo qual o fitol exerce a atividade contra a peroxidação lipídica, está proposto na figura abaixo:

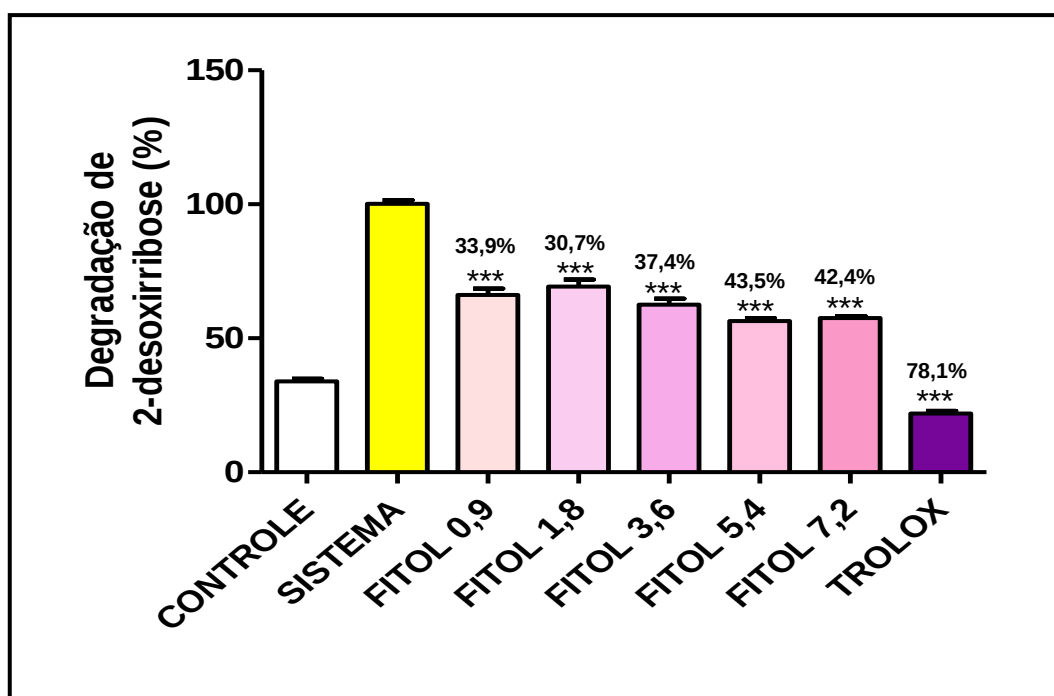
Figura 11 – Representação esquemática da provável reação entre a molécula do fitol e um radical lipídico ($L^\bullet$) durante a peroxidação lipídica.



6.4.2. EFEITO DO FITOL SOBRE A ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

6.4.2.1. RADICAL HIDROXILA ($\bullet OH$)

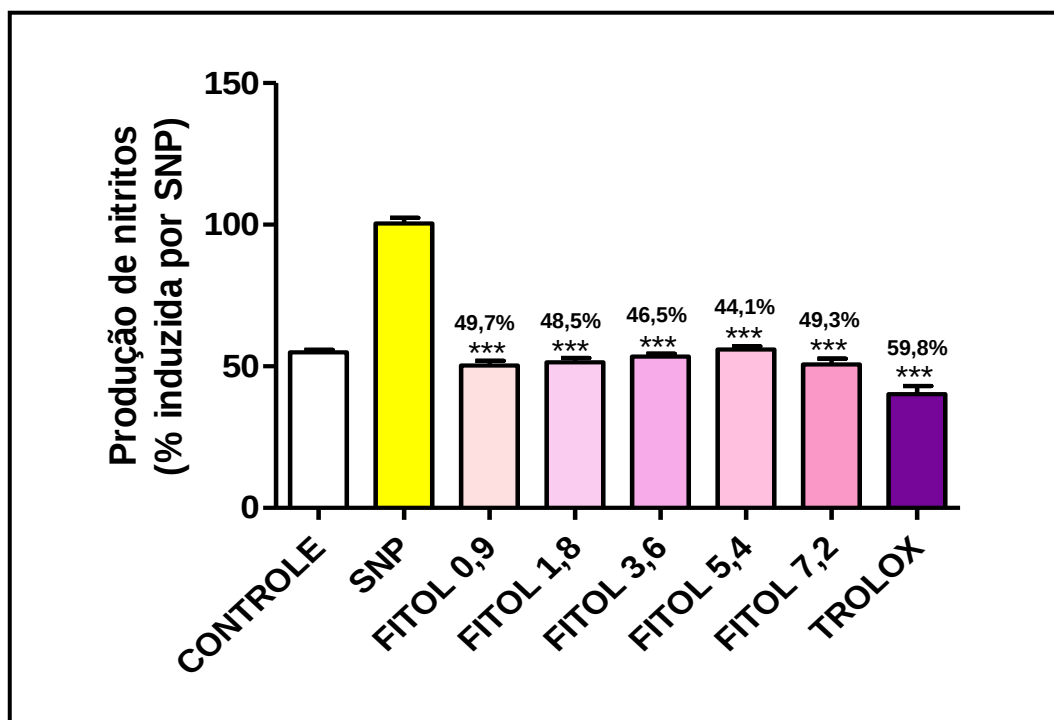
A atividade seqüestradora de radicais hidroxila ($\bullet OH$) foi testada para o fitol. Os resultados estão mostrados no gráfico 9, no qual observa-se que o fitol, nas concentrações testadas, foi capaz de remover o radical $\bullet OH$ de maneira significativa, quando comparado ao grupo sistema ($100,2 \pm 1,3$) [0,9: $33,87\%$ ($66,1 \pm 2,5$); 1,8: $30,69\%$ ($69,3 \pm 2,6$); 3,6: $37,38\%$ ($62,6 \pm 2,1$); 5,4: $43,53\%$ ($56,5 \pm 1,1$); 7,2: $42,39\%$ ($57,5 \pm 0,8$) de inibição, respectivamente]. O trolox produziu uma diminuição de $78,06\%$ ($21,9 \pm 0,9$).

Gráfico 9 – Efeito do fitol na atividade seqüestradora de radicais hidroxila (OH).

O grupo denominado de sistema representa a produção de MDA a partir da 2-desoxirribose. Os outros grupos representam a produção de MDA na presença de diferentes concentrações do fitol. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n=5$) e os experimentos foram feitos em duplicata. *** $p<0.001$ vs sistema (ANOVA e teste t -Student-Neuman-Keuls).

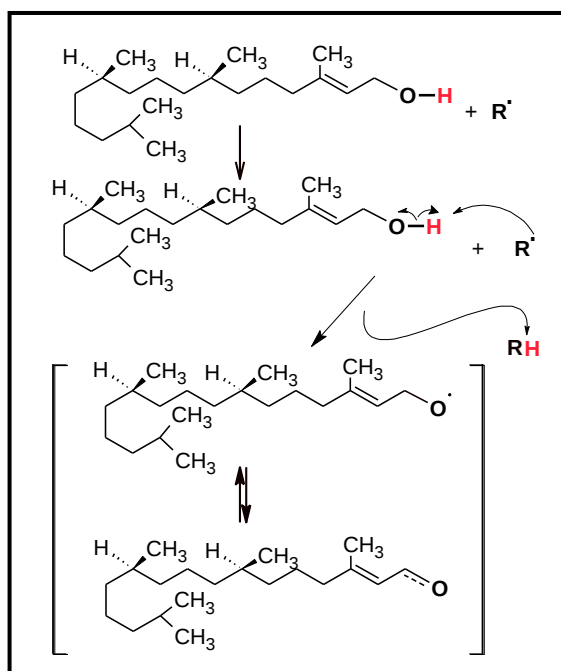
6.4.2.2. ÓXIDO NÍTRICO ($\bullet$ NO)

A atividade do fitol como substância seqüestradora de NO também foi testada. Os resultados apresentados no gráfico 10 mostram que o fitol, nas concentrações testadas, foi capaz de remover o NO de maneira significativa, em relação ao grupo SNP ($100,4 \pm 2,0$) [0,9: 49,70% ($50,3 \pm 1,7$); 1,8: 48,52% ($51,5 \pm 1,4$); 3,6: 46,51% ($53,5 \pm 0,9$); 5,4: 44,09% ($55,9 \pm 1,5$); 7,2: 49,33% ($50,7 \pm 1,9$) de inibição, respectivamente]. O trolox produziu uma diminuição de 59,76% ($40,2 \pm 2,8$).

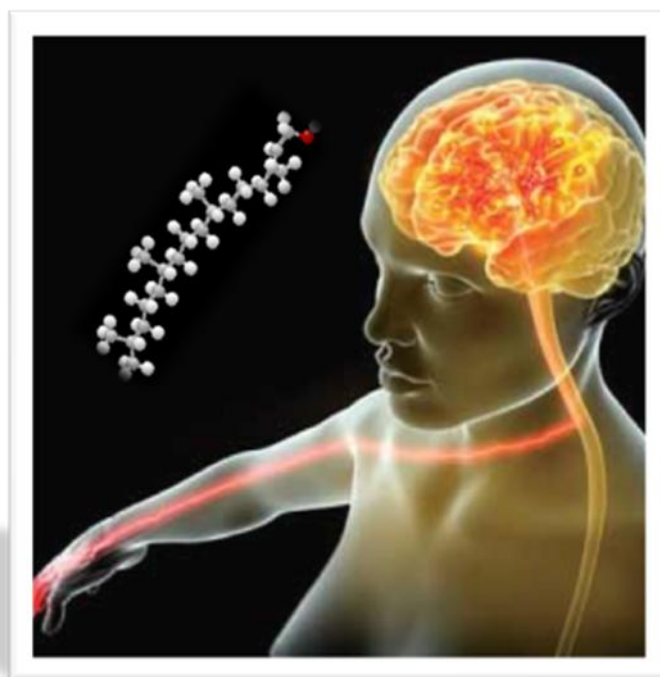
Gráfico 10 – Efeito do fitol na atividade sequestradora de óxido nítrico (NO).

O grupo controle significa a produção basal de NO pelo veículo na ausência SNP; o grupo SNP reflete a produção de nitritos por SNP, considerado como 100% de produção de NO. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=5) e os experimentos foram feitos em duplicata. *** $p < 0.001$ vs SNP (ANOVA e teste *t*-Student-Neuman-Keuls).

O mecanismo proposto para esta ação sequestradora de radicais livres está demonstrado abaixo, estando a OH e o NO representados pelo radical $R^\bullet$:

Figura 12 – Representação esquemática da provável reação entre a molécula do fitol e um radical livre ($R^\bullet$), demonstrando a atividade sequestradora.

Discussão



7. DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais tem sido bastante aceito como uma terapia complementar. Isto ocorre devido, entre outros fatores, à facilidade de obtenção e ao baixo custo, bem como à ampla diversidade de metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais que possuem diversas atividades biológicas, sendo os terpenos um dos metabólitos mais abundantes (FARNSWORTH et al., 1985; SIMÕES et al., 2004).

Diversos trabalhos foram publicados sobre as atividades farmacológicas, sobretudo, sobre a atividade antinociceptiva, de vários monoterpenos e alguns sesquiterpenos (DE SOUSA, 2011), no entanto, poucos diterpenos foram descritos com esta ação. Recentemente, tem crescido o interesse por estes terpenos, como é o caso de estudos realizados com geranilgeraniol (SPINDOLA et al., 2010) e andrografolida (SUEBSANA et al., 2009; SULAIMAN et al., 2010), que apresentaram atividade antinociceptiva demonstrada em vários modelos de dor. Curiosamente, apesar do fitol estar presente de forma abundante na natureza, uma vez que faz parte da molécula da clorofila, poucos são os estudos sobre este diterpeno, inclusive, não havendo relatos sobre sua ação no SNC.

Diante disto, o objetivo desse estudo foi traçar um perfil da toxicidade aguda e da atividade do fitol sobre o SNC, investigando as possíveis atividades antinociceptiva e antioxidante do fitol, através de metodologias *in vivo* e *in vitro*. A via de administração adotada para o estudo do fitol foi a via intraperitoneal (i.p.), que é a via mais utilizada em pesquisas com animais, por ser de fácil procedimento e rápida absorção.

A primeira etapa na pesquisa de uma nova droga é a determinação do seu grau de toxicidade. Os ensaios pré-clínicos são realizados, de acordo com o tempo de exposição à substância, em quatro estágios diferentes, sendo classificados como: toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, toxicidade subcrônica e toxicidade crônica (BOTHAM, 2004; GOLDIM, 2007; GARRIDO et al., 2011).

A toxicidade aguda pode ser definida como sendo o efeito adverso produzido após a administração de uma substância num curto período de tempo (BRITO, 1994; EATON, KLAASSEN, 1996; SÁ; ALMEIDA, 2006). Os estudos de

toxicidade aguda têm a finalidade de caracterizar a relação dose/resposta de uma substância, possibilitando estabelecer e comparar a toxicidade de uma substância por várias vias de administração (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

Um recurso bastante adotado na avaliação da toxicidade aguda é a determinação da DL_{50} , definida como sendo a dose única de uma substância capaz de causar 50% de mortalidade dos animais tratados. Esta dose é utilizada para determinar a resposta letal dessa substância em uma determinada população submetida a diversas condições experimentais (EATON; KLAASSEN, 1996; SÁ; ALMEIDA, 2006).

Estudos prévios demonstraram que o fitol possui um baixo potencial toxicológico, uma vez que a DL_{50} do fitol, tanto por via oral, em ratos, como por via dérmica, em coelhos, não pôde ser calculada, devido à ausência de mortes, tendo sido relatada como maior que 5 g/kg (RIFM, 1977; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

No presente estudo, a toxicidade do fitol foi avaliada através da toxicidade aguda, na qual os animais foram continuamente observados por 4h e, após 24h, foi registrada a letalidade uma vez ao dia, durante 14 dias seguintes ao tratamento, a fim de ser registrada a mortalidade causada pelo fitol. As doses estabelecidas para este estudo foram definidas através de progressão geométrica a partir da maior dose utilizada normalmente nos estudos de toxicidade, sendo elas: 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg. Assim, de acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), a DL_{50} foi calculada como sendo 1153,39 mg/kg, com um intervalo de confiança entre 944,56 e 1408,40 mg/kg.

É possível sugerir que o fitol apresenta baixa toxicidade por esta via, uma vez que este resultado, juntamente com o demonstrado por McGinty, Letizia e Api (2010), asseguram o uso do fitol em animais, contudo, mais estudos são necessários, inclusive em humanos, para confirmar sua segurança.

Baseada na baixa toxicidade do fitol, foram determinadas doses seguras para serem utilizadas nos testes seguintes. Desta forma, por meio de progressão geométrica, as doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg foram adotadas para investigar a ação farmacológica do fitol.

Após a determinação das doses, dando continuidade à avaliação da toxicidade aguda do fitol, foram escolhidas as doses mais elevadas (100 e 200 mg/kg) para investigar se o fitol promovia alguma alteração dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais.

O conhecimento sobre as características bioquímicas e hematológicas de uma substância é uma importante ferramenta para o monitoramento de alterações fisiopatológicas, tanto em animais como em humanos (DUAN et al., 2010), uma vez que distúrbios das funções orgânicas são detectadas através de alterações em diversos parâmetros bioquímicos, podendo refletir uma série de efeitos tóxicos e respostas compensatórias, envolvendo órgãos vitais, particularmente, fígado e rins (CAMPBELL HANDY; SIMS, 2005; DOGAN; CAN, 2011). Além disso, o sistema hematopoético é um dos alvos mais sensíveis aos agentes tóxicos (LI et al., 2010), de modo que os parâmetros hematológicos também constituem biomarcadores importantes de efeitos tóxicos, fornecendo informações sobre as condições fisiológicas gerais do organismo sobre investigação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; DOGAN; CAN, 2011).

Conforme observado nas tabelas 2 e 3, os dados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos obtidos com a administração aguda do fitol não apresentaram nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados, sugerindo que o fitol, nas doses testadas, não interfere com as principais funções fisiológicas dos animais tratados.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos com a avaliação da toxicidade aguda do fitol, é possível sugerir que este diterpeno é bem tolerado pelo organismo, pela via intraperitoneal, sem causar aparentes prejuízos fisiológicos aos animais, sendo necessário, porém, realizar estudos mais prolongados de toxicidade crônica.

Com a finalidade de traçar um perfil da ação do fitol sobre o SNC, foi utilizada a triagem farmacológica comportamental, que consiste num teste preliminar de fácil execução e capaz de detectar, de forma qualitativa, algumas importantes ações do SNC e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (ALMEIDA et al., 1999; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Neste teste, os camundongos tratados com fitol apresentaram alterações comportamentais características de drogas depressoras do SNC (como mostrado no quadro 3), tais como, diminuição da ambulação e da resposta ao toque e analgesia. A diminuição da ambulação é um dos parâmetros mais comuns para analisar o efeito depressor de uma substância sobre o SNC. Outro parâmetro que confirma este efeito é o aumento da latência de reação em resposta a um toque (estalar de dedos), e ambos os parâmetros foram observados com a administração do fitol,

sugerindo, de maneira preliminar, que o fitol tem atividade depressora do SNC (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Além desses dois parâmetros, pôde-se observar a presença de analgesia (antinocicepção), que corresponde à perda ou diminuição do reflexo à nocicepção, medido através de um estímulo mecânico, representado pela pressão no terço inferior da cauda do animal com uma pinça (ALMEIDA et al., 1999; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). É importante ressaltar que, na dose de 100 mg/kg, este efeito permaneceu até os 120 minutos de observação, e na dose de 200 mg/kg, observou-se até os 180 minutos. Na dose de 50 mg/kg, entretanto, o efeito permaneceu até 60 minutos, aos 120 minutos não foi observado e aos 180 minutos este parâmetro voltou a ser observado, demonstrando que o fitol pode ter um efeito duradouro no organismo.

Prosseguindo-se com a avaliação geral do fitol sobre o SNC, foi utilizado o teste da barra giratória ou *rota-rod*. Este teste representa uma etapa muito importante durante a pesquisa de uma nova droga, uma vez que investiga possíveis reações adversas de uma substância, as quais constituem um fator limitante de muitos medicamentos utilizados na clínica atual, como é o caso dos benzodiazepínicos, amplamente utilizados como drogas de escolha para o tratamento de ansiedade e convulsão, mas que podem produzir uma série de reações adversas como sedação, ataxia e miorrelaxamento (YADIN et al., 1991; KAVVADIAS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2009).

O teste do *rota-rod* avalia o efeito miorrelaxante e a integridade motora dos animais através da capacidade do animal equilibrar-se sobre uma barra giratória, sendo utilizado para descartar a possibilidade de resultados falso-positivos (CAPASSO et al., 1996; MATTEI; FRANÇA, 2006). Trata-se de um método não-específico, uma vez que avalia a integridade do sistema motor, permitindo detectar enfraquecimento neurológico (DUNHAM; MIYA, 1957; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006; DALLMEIER; CARLINI, 1981; MATTEI; FRANCA, 2006).

Quanto mais intenso for o efeito miorrelaxante ou de incoordenação motora provocado por uma substância, menor será o tempo em que o animal conseguirá equilibrar-se sobre a barra giratória. Depressores do SNC (por exemplo, benzodiazepínicos, barbitúricos e o álcool), bem como relaxantes musculares, reduzem o tempo de permanência dos animais na barra giratória (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANÇA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

Desta forma, esse teste é usado para excluir a possibilidade de que a ação farmacológica exercida pela substância esteja relacionada com distúrbios não específicos na atividade locomotora dos animais.

O fitol, nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, não causou qualquer alteração significativa no tempo de permanência na barra giratória (Gráfico 1), indicando que este diterpeno não afeta o desempenho motor dos animais. Como esperado, o diazepam, usado como droga padrão psicodpressora, diminuiu o parâmetro analisado.

É importante destacar que as doses utilizadas no teste do *rota-rod* foram as mesmas adotadas nos testes seguintes que avaliaram a atividade antinociceptiva, descartando, portanto, a possibilidade da atividade demonstrada pelo fitol estar relacionada com comprometimento da atividade locomotora dos animais.

Três diferentes protocolos experimentais de nocicepção foram utilizados para investigar o efeito antinociceptivo do fitol, sendo empregados testes de nocicepção químicos (teste do ácido acético e teste da formalina) e um teste térmico (teste da placa quente) em camundongos (ARAÚJO et al., 2009). O uso de vários modelos é imprescindível para a detecção das propriedades antinociceptivas de uma substância, uma vez que diferentes estímulos mimetizam diferentes tipos de dor e revelam a natureza antinociceptiva de uma droga teste (BERGEROT et al., 2006; SHI et al., 2011).

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo clássico de nocicepção inflamatória visceral, sendo amplamente utilizado como ferramenta para a avaliação de novos agentes com propriedades analgésicas e/ou antiinflamatórias (COLLIER et al., 1968). O princípio deste teste consiste em submeter os animais a um estímulo químico nocivo, através da injeção de ácido acético na cavidade peritoneal do camundongo, provocando a liberação de mediadores endógenos (PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$) (DERARDT et al., 1980; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006) e, desta forma, sensibilizando e, posteriormente, causando a estimulação de nociceptores. A nocicepção induzida pelo ácido acético produz episódios característicos de contrações do músculo abdominal, juntamente com a extensão dos membros posteriores (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; GUIMARÃES et al., 2010). Trata-se de um método simples e muito sensível, embora seja pouco específico, uma vez que é capaz de detectar o efeito antinociceptivo de analgésicos centrais, como os opióides, e periféricos, como os AINEs, além de

relaxantes musculares e sedativos (BENTLEY; NEWTON; STARR, 1981; MOHAMAD et al., 2010), já que a inibição do número de contorções abdominais por estas drogas é facilmente quantificado neste teste (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011a).

Em nível celular, os prótons resultantes da dissociação do ácido acético despolarizam neurônios sensoriais por interagir com canais de cátions não-seletivos localizados nas fibras aferentes primárias, conhecidos como canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC), ou indiretamente, por promover a liberação de diversos mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina, histamina, substância P, entre outros, que se ligam a receptores metabotrópicos, ativando uma cascata de sinalização de segundos mensageiros (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001), estimulando neurônios aferentes primários a aumentar a liberação de glutamato no fluido cerebrospinal (FENG; CUI; WILLIS, 2003). Além disso, a nocicepção causada pelo ácido acético está associada ao aumento na produção de lipoxigenases na cavidade peritoneal, o que promove a estimulação das fibras C primárias sensoriais dentro do corno dorsal da medula espinhal (DERARDT et al., 1980; IKEDA et al., 2001; MOHAMAD et al., 2010).

Os resultados do presente estudo mostram que o fitol produziu uma inibição da nocicepção em camundongos por reduzir significativamente o número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em relação ao controle, de maneira dose-dependente, como mostrado no gráfico 2, de modo que nas doses de 100 e 200 mg/kg as contorções foram inibidas completamente (100%). Os resultados também mostram que as drogas utilizadas como padrão, a indometacina (AINE), que é inibidora da COX, e a morfina (analgésico central) que atua em receptores opióides, causaram uma inibição significativa deste parâmetro, com 56% e 98,6% de inibição, respectivamente. Embora estes resultados possam sugerir um poderoso efeito antinociceptivo do fitol, este teste sozinho é incapaz de afirmar se a antinocicepção foi central ou periférica.

Para identificar melhor o efeito antinociceptivo do fitol, foi utilizado o teste da formalina, que consiste num modelo bifásico de nocicepção, usado para avaliar o mecanismo pelo qual um animal responde a uma nocicepção contínua, gerada pela injúria tecidual (BHANDARE et al., 2010) a partir da administração de formalina na região subplantar da pata posterior direita do camundongo, sendo o parâmetro avaliado o tempo que o animal permanece lambendo a pata injetada. Este teste é

caracterizado pela presença de duas fases distintas: a 1ª fase (0-5 min) que se inicia imediatamente após a injeção da formalina e resulta, provavelmente, da estimulação direta dos nociceptores causada pela ativação das fibras C. Esta fase, denominada fase neurogênica, reflete a dor mediada centralmente com a liberação de substância P. Então, há uma interfase de, aproximadamente, 10 min, na qual há uma redução da atividade nociceptiva pela ativação dos mecanismos homeostáticos de antinocicepção. Em seguida, ocorre a 2ª fase (15-30 min), denominada fase inflamatória, que parece ser causada por alterações teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e pode ser acompanhada pela liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (COLLIER et al., 1968; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; ARAÚJO et al., 2009; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011a).

É importante ressaltar que a 2ª fase não pode ser interpretada como consequência da 1ª. Ela origina-se de mecanismos periféricos e também da ativação de neurônios centrais sensibilizados devido à inflamação periférica, bem como da ativação de neurônios aferentes primários (COELHO et al., 2005; ARAÚJO et al., 2009). Um exemplo disto é que, substâncias de ação rápida, como lidocaína ou remifentanil são capazes de bloquear a primeira fase do teste, sem interferir na segunda (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

A formalina induz a produção e liberação de óxido nítrico (NO) (OMOTE et al., 2001), o qual pode ser considerado um componente essencial da resposta nociceptiva / pró-inflamatória através da estimulação da produção de citocinas, EROs e prostaglandinas (MARCINKIEWICZ; GRABOWSKA; CHAIN, 1995; SAUTEBIN et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2010).

É bem descrito na literatura que drogas que atuam centralmente, tais como os opióides, podem inibir ambas as fases igualmente, enquanto que drogas que atuam periféricamente, como os AINEs inibem apenas a 2ª fase (SHIBATA et al., 1989; FISCHER et al., 2008).

Os resultados obtidos mostram que o fitol suprimiu ambas as fases no teste da formalina (Gráfico 3 e 4), sendo o efeito mais pronunciado na 2ª fase, na qual, a dose de 200 mg/kg apresentou uma inibição do parâmetro de 98,7%, o que sugere que o fitol possui atividade antinociceptiva tanto central como periférica, podendo estar associado a um efeito antiinflamatório. Além disso, foi demonstrado que a morfina inibiu ambas as fases (53,0% e 98,5%, respectivamente), enquanto

que a indometacina inibiu apenas a 2ª fase (43,3%), corroborando os dados presentes na literatura.

Para prover uma confirmação do efeito antinociceptivo central do fitol, utilizamos o teste da placa quente, uma vez que esse teste é sensível e específico para drogas que atuam por um mecanismo central, como os analgésicos opióides (NEMIROVSKY et al., 2001; SULAIMAN et al., 2009; ONG et al., 2011), enquanto que analgésicos que atuam periféricamente são inativos (SRINIVASAN et al., 2003; SHI et al., 2011). Neste teste, o animal é submetido a um estímulo térmico constante, o qual produz dois tipos de respostas comportamentais: lambida da pata e a tentativa de pular, que são consideradas como respostas nociceptoras integradas supraespinhalmente (CHAPMAN et al., 1985; ARAÚJO et al., 2009), uma vez que o efeito analgésico envolve estruturas do prosencéfalo, tais como o núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal e o núcleo *accumbens* (THOMSEN et al., 2007; FISCHER et al., 2008).

A alta temperatura usada no teste da placa quente (53 ± 1 °C) é suficiente para ativar fibras nociceptoras C e A δ do tipo II, que compreendem aproximadamente 45% dos neurônios que exibem correntes de membrana provocadas pelo calor, com um limiar nociceptivo moderado de, aproximadamente, 43 °C, e também fibras A δ do tipo I que representam de 5-10% das células que respondem com um alto limiar de cerca de 52 °C (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O fitol, nas doses testadas, aumentou o tempo de reação (latência) ao estímulo térmico, de maneira significativa, aos 30 minutos de observação (Gráfico 5). O efeito antinociceptivo do fitol persistiu, aos 60 e 120 minutos, apenas na dose de 50 mg/kg e, na dose de 100 e 200 mg/kg, o efeito reapareceu aos 120 min. Apesar de ser incomum, este resultado pode ser justificado ao analisarmos o efeito obtido na triagem farmacológica comportamental (Quadro 3), sugerindo que o fitol, pode apresentar um efeito duradouro.

Dessa forma, o aumento do limiar nociceptivo dos camundongos tratados com fitol apresentado nesse teste, juntamente com a redução da nocicepção na 1ª fase do teste da formalina dão fortes evidências de atividade antinociceptiva do fitol mediada por mecanismos centrais.

Estudos recentes demonstraram que o geranilgeraniol (SPINDOLA et al., 2010) um diterpeno muito semelhante estruturalmente ao fitol, e andrografolida (SULAIMAN et al., 2010), um diterpeno mais complexo, também apresentaram efeito

antinociceptivo nos testes do ácido acético e placa quente, demonstrando, assim, que, além dos monoterpenos e sesquiterpenos, os diterpenos também têm atividade antinociceptiva em vários modelos de dor.

Após caracterizado o efeito antinociceptivo do fitol, tanto em nível central como periférico, o próximo passo foi tentar elucidar os mecanismos pelos quais o fitol exerce esta ação antinociceptiva.

A investigação dos mecanismos de ação de psicofármacos, geralmente, é baseada na interação farmacológica que ocorre entre receptores e ligantes durante a transmissão neuronal. Este estudo baseia-se na utilização de antagonistas farmacológicos conhecidos, os quais, uma vez administrados, bloqueiam os efeitos decorrentes da ativação do receptor específico, impedindo que a substância em estudo possa se ligar a este receptor e promover sua ação. Caso a via de sinalização bloqueada não seja um mecanismo usado pela substância-teste, o efeito não será alterado.

Para esse estudo, foram escolhidas duas vias de transdução: a via opióide e a via dos canais de K^+_{ATP} . Várias evidências demonstram que o mecanismo de antinocicepção induzido pelos receptores opióides está intrinsecamente relacionado com a ativação dos canais de K^+_{ATP} (OCANA et al., 1990; ROANE; BOYD, 1993; OCANA et al., 2004), de modo que a abertura desses canais parece ter um papel na antinocicepção mediada por opióides (OCANA et al., 1990; OCANA; BAEYENS, 1993; WILD et al., 1991).

Os receptores opióides são localizados tanto em nível central como periférico, nas terminações de neurônios aferentes primários, sendo classificados como receptores acoplados à proteína $G_{i/o}$. A ativação destes receptores promove a inibição da atividade da enzima adenililciclase, responsável pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc; com os níveis de AMPc diminuídos, a entrada de cálcio na célula é impedida. Além disso, os canais de K^+_{ATP} são abertos, ocorrendo um efluxo de K^+ e conseqüentemente, hiperpolarizando a célula, o que resulta no bloqueio da liberação dos neurotransmissores e da transmissão da dor em diversas vias neuronais. Os receptores opióides podem, ainda, acoplar-se a vários outros sistemas de segundos mensageiros, tais como a via da fosfolipase C, sendo estas vias responsáveis pelos efeitos indesejados relacionados ao uso dos opióides (tolerância, sensibilização e abstinência) (YAKSH, 1988; STEIN; ZOLLNER, 2009; SEHGAL; SMITH; MANCHIKANTI, 2011).

Os canais de K^+ neuronais têm um papel fundamental no controle da atividade neuronal e da propagação do sinal através do sistema nervoso (SHIEH et al., 2000; MACKINNON, 2003). São conhecidos quatro tipos de canais de K^+ : dependentes de voltagem (K_v), ativados por cálcio (K_{Ca}), retificador de entrada (K_{ir}), e de dois poros (K_{2P}) (GUTMAN et al, 2003).

Diversos estudos demonstraram que os receptores opióides estão associados com a abertura dos canais K_{ir} em neurônios (NORTH, 1989). A proteína $G_{i/o}$ é capaz de abrir os dois tipos de canais K_{ir} : os regulados pela proteína G (GIRK) (MARK; HERLITZE, 2000) e os regulados por ATP (K^+_{ATP}) (SANCHEZ et al., 1998; WADA et al., 2000; OCANA et al., 2004). Os canais de K^+ escolhidos neste estudo foram os K^+_{ATP} .

Para investigar a participação dos receptores opióides na atividade antinociceptiva do fitol foi utilizada a naloxona, um antagonista opiáceo utilizado clinicamente para reverter a depressão cardiovascular e respiratória associada à *overdose* de narcóticos. Devido à sua capacidade de antagonizar o efeito de drogas opióides, a naloxona é amplamente utilizada como ferramenta farmacológica (BATISTA; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 1995; SULAIMAN et al., 2008; JIN et al., 2010).

Para testar a participação do fitol sobre os canais de K^+_{ATP} foi usada a glibenclamida, uma sulfoniluréia utilizada na clínica médica como antidiabético, que atua bloqueando especificamente estes canais (OCANA et al., 1990; 2004).

O método adotado para estudar os mecanismos de ação do fitol foi o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com o mesmo protocolo descrito anteriormente. A escolha deste teste foi devido, principalmente, a sua simplicidade e rapidez. Além disso, vários estudos já foram realizados utilizando este método (MEOTTI et al., 2007; FREITAS et al., 2009; PERIMAL et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o fitol não atua (pelo menos diretamente) por estes dois mecanismos, uma vez que nem a naloxona nem a glibenclamida foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo do fitol nas doses testadas. Como esperado, a morfina, droga padrão utilizada, teve seu efeito revertido tanto pela naloxona como pela glibenclamida (Gráficos 6 e 7).

Spindola e colaboradores (2010) demonstraram que o geranilgeraniol (citado anteriormente, por ter estrutura semelhante ao fitol) também não apresentou

efeito pela via opióide, mas apresentou efeito por outros mecanismos envolvidos com a dor.

Dessa forma, são necessários mais estudos para investigar o mecanismo de ação do fitol por outras vias de sinalização, a fim de esclarecer como o fitol atua inibindo a transmissão da dor.

Após a caracterização do efeito antinociceptivo do fitol, o próximo passo foi investigar a capacidade de o fitol agir como molécula antioxidante, retardando ou inibindo o efeito danoso dos radicais livres sobre estruturas celulares (lipídios, DNA e proteínas), uma vez que várias evidências indicam que o estresse oxidativo tem um papel crucial na nocicepção, estando envolvido nos processos de dor inflamatória e dor neuropática (WANG; PORRECA; CUZZOCREA, 2004; IBI; MATSUNO; SHIBA, 2008).

Várias metodologias *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante de uma substância estão disponíveis, de modo que são baseadas na interação direta com moléculas reativas ou com metais iônicos (HOELZL et al., 2005). Apesar de serem validadas e bastante empregadas, permitindo uma avaliação da eficácia *in vitro* dos agentes testados, estas metodologias são conduzidas sob condições não-fisiológicas e, portanto, não extrapolam os resultados para as condições fisiológicas reais, uma vez que informações importantes, como características cinéticas (absorção e distribuição) e de estabilidade não são obtidas nestes métodos (ARUOMA, 2003; HOELZL et al., 2005). Dessa forma, é fundamental que metodologias *in vivo* sejam empregadas para uma melhor caracterização dos resultados obtidos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Devido ao fato de que os agentes antioxidantes atuam por mecanismos diferentes e que apresentam múltiplas características de reações, nenhum método sozinho reflete a atividade antioxidante de uma substância, sendo, portanto, necessário o emprego de vários métodos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Nesse estudo foram utilizadas três metodologias antioxidantes *in vitro*, as quais se baseiam, fundamentalmente, em demonstrar o efeito da substância como antioxidante ao impedir a peroxidação lipídica (um dos efeitos mais danosos causados pelas EROs/ERNs), bem como, ter atividade seqüestradora de radicais livres, evitando que estas espécies reativas fiquem disponíveis para causar danos às células.

As membranas lipídicas são os alvos mais susceptíveis ao ataque dos radicais livres (HALLIWELL, 2008; CAMPÊLO et al., 2011), resultando na peroxidação lipídica, que pode levar à destruição da membrana celular. O método empregado para avaliar a ação do fitol sobre a peroxidação lipídica foi a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecido como TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*).

O princípio deste método baseia-se na utilização de um substrato rico em lipídios (neste caso, foi usada gema de ovo homogeneizada) que sofre a peroxidação lipídica a partir da sua reação com o AAPH, um composto azo gerador de radicais livres, que sofre decomposição térmica, resultando na formação de nitrogênio molecular e dois radicais carbonos (R), os quais rapidamente reagem com o oxigênio, formando radicais peroxilas ($\text{ROO}\cdot$) (KRASOWSKA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2010). Estes radicais, por sua vez, reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), compostos cromóforos que são medidos espectrofotometricamente (ZIN; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2002; FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007; SERAFINI et al. 2011). Substâncias antioxidantes são capazes de prevenir a formação de TBARS. Este método é bastante utilizado para avaliar a atividade antioxidante de vários produtos naturais (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O fitol, em todas as concentrações testadas, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por AAPH, inibindo a quantidade de TBARS formadas em mais de 50%. Resultado semelhante foi obtido com o trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol (vitamina E), que é largamente usado como padrão antioxidante (Gráfico 8). Na figura 11, foi feita uma representação esquemática da reação provável entre a molécula do fitol e um radical lipídico ($\text{L}\cdot$) durante a peroxidação lipídica. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o fitol exerce um efeito antioxidante que, provavelmente, protege as biomoléculas lipídicas, essenciais para o funcionamento da membrana celular (SERAFINI et al., 2011).

Outras metodologias bastante empregadas para avaliar a atividade antioxidante de uma substância baseiam-se na capacidade de seqüestrar radicais livres, através da interação direta de uma substância com moléculas reativas, convertendo os radicais livres em espécies menos reativas e, portanto, mais estáveis (HOELZL et al., 2005).

A capacidade de uma substância seqüestrar $\bullet\text{OH}$ é diretamente relacionada com sua atividade antioxidante, uma vez que impede o dano oxidativo causado por este radical (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHUKLA et al., 2009; SERAFINI et al., 2011). Neste método, o radical $\bullet\text{OH}$ é gerado através da reação de Fenton, na qual o Fe^{2+} reage com H_2O_2 resultando na produção do $\bullet\text{OH}$. Estes radicais atacam o açúcar 2-desoxirribose (usado no método como alvo), degradando-o em uma série de fragmentos, entre eles, o malonaldeído (MDA) que, por sua vez, reage com o TBA, dando origem a um composto cromóforo, medido espectrofotometricamente (HALLIWELL, 1992; MAGALHÃES et al., 2008). Se uma substância seqüestradora de $\bullet\text{OH}$ for adicionada ao sistema, ela competirá com o açúcar pela $\bullet\text{OH}$, inibindo a degradação deste alvo e, conseqüentemente, haverá diminuição dos níveis de MDA quantificados (MAGALHÃES et al., 2008). Contudo, este método possui uma desvantagem, uma vez que muitos antioxidantes também têm propriedade quelante de metais, o que pode alterar a atividade do Fe^{2+} , mascarando, assim, a ação da substância em estudo (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Observando os resultados apresentados no gráfico 9, é possível sugerir que o fitol possui atividade seqüestradora de $\bullet\text{OH}$, exibindo uma atividade antioxidante significativa que pode ser capaz de inibir os danos celulares causados por este radical. O trolox, droga usada como padrão, também reduziu significativamente a degradação da 2-desoxirribose.

Por fim, a outra metodologia utilizada para avaliar a atividade antioxidante foi a determinação da atividade seqüestradora de $\bullet\text{NO}$. O princípio deste teste consiste na produção de $\bullet\text{NO}$ a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio, em solução aquosa. O $\bullet\text{NO}$, por sua vez, interage com o oxigênio, produzindo íons nitritos que podem ser medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). Estes íons nitritos têm um forte poder oxidante, podendo provocar danos celulares severos (GUIMARÃES et al., 2010). A adição de uma substância seqüestradora de $\bullet\text{NO}$ compete com o oxigênio pelo $\bullet\text{NO}$, conseqüentemente, diminuindo a produção de nitritos (AHMADI et al., 2011; SERAFINI et al., 2011).

Neste estudo, o fitol, nas concentrações testadas, diminuiu significativamente a produção de nitritos, demonstrando sua capacidade seqüestradora de $\bullet\text{NO}$ (Gráfico 10). Na figura 12, está representada a reação provável entre a molécula do fitol e um radical livre ($\text{R}\bullet$), demonstrando a sua atividade seqüestradora.

É importante ressaltar que o $\bullet\text{NO}$ é uma molécula sinalizadora envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive na sinalização da dor. A influência do $\bullet\text{NO}$ sobre a transmissão nociceptiva é complexa e contraditória e o exato mecanismo destas ações apresenta controvérsia (MELLER; GEBHART, 1993; SOUSA; PRADO, 2001; KAWANO et al., 2009).

O efeito pró-nociceptivo do $\bullet\text{NO}$ ocorre quando esta molécula está em altas concentrações, e pode ser induzido pela interação desta molécula com outras espécies reativas derivadas do oxigênio, como o íon superóxido, uma vez que esta interação leva à formação de peroxinitritos, que têm potente efeito citotóxico e pró-inflamatório (BECKMAN et al., 1990; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011b). Dessa forma, o efeito do fitol como substância seqüestradora de $\bullet\text{NO}$, inibindo a produção de nitritos, resulta num efeito citoprotetor e antiinflamatório, estando relacionado com sua ação antinociceptiva.

A atividade antioxidante do fitol pode ser atribuída a sua característica estrutural, uma vez que o fitol é um álcool insaturado de cadeia ramificada, e a propriedade antioxidante pode estar relacionada com o grupo hidroxila (OH) presente na sua molécula. Provavelmente, o fitol, ao reagir com um radical livre, doa átomos de hidrogênio com um elétron desemparelhado ($\text{H}\cdot$), convertendo os radicais livres em espécies menos reativas (LIMA; CARDOSO, 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

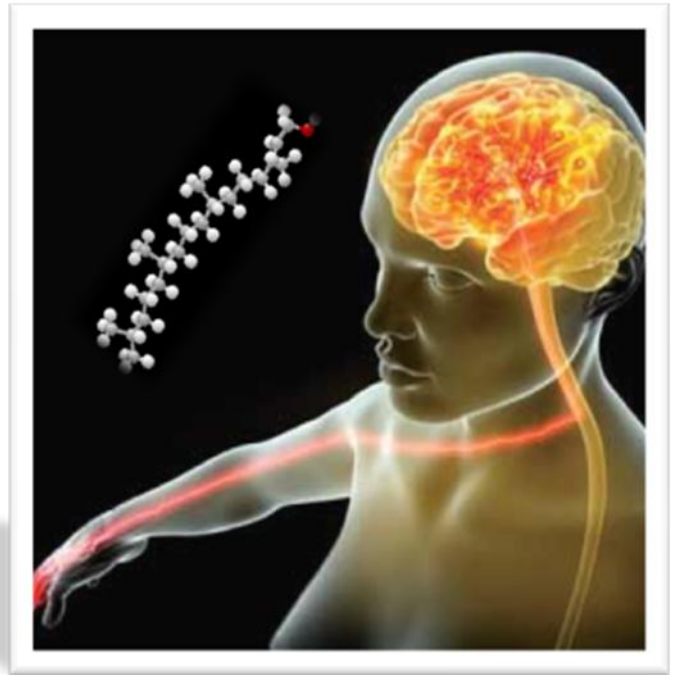
Os resultados obtidos na avaliação antioxidante sugerem, dessa forma, que o efeito do fitol impedindo a peroxidação lipídica observada pelo método TBARS pode ser, provavelmente, devido à interação deste diterpeno tanto com radicais $\text{OH}\cdot$ como $\bullet\text{NO}$, por meio de uma ação seqüestradora, que resulta na formação de espécies mais estáveis e, conseqüentemente, numa proteção das biomoléculas contra o efeito danoso das EROs/ERNs. Além disso, tendo em vista que várias evidências mostram a participação destas espécies reativas no mecanismo da dor, a atividade antioxidante do fitol pode estar contribuindo com o seu efeito antinociceptivo, semelhante ao que foi demonstrado por LIN e colaboradores (2009) com o diterpeno andrografolida, bem como com os monoterpenos carvacrol (GUIMARÃES et al., 2010) e citronelal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011b).

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que o fitol produz efeito antinociceptivo em modelos químicos e térmico de nocicepção em camundongos, sugerindo um efeito tanto central como periférico, provavelmente,

sem participação direta da via opióide ou dos canais de K^+_{ATP} . Adicionalmente, foi demonstrado que o fitol exerce seu efeito sem alterar a função motora dos animais ou interferir com os parâmetros bioquímicos e hematológicos, tendo uma baixa toxicidade nas doses testadas. O efeito antinociceptivo pode estar associado com a atividade antioxidante do fitol que foi demonstrada pelos métodos *in vitro* utilizados.

Como o mecanismo de ação do fitol ainda não foi bem esclarecido, será necessária uma maior investigação para desvendar por quais vias de sinalização envolvidas na dor o fitol exerce seus efeitos. Assim, o fitol poderá, futuramente, representar uma substância promissora no tratamento de várias formas de dor.

Conclusões

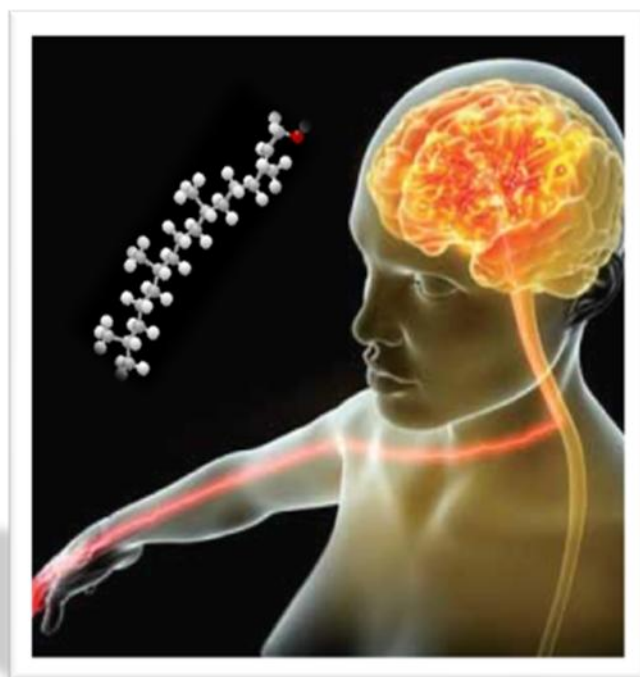


8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que o fitol:

- ▶ Apresentou uma baixa toxicidade aguda, por via i.p.;
- ▶ Não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos por meio do tratamento agudo;
- ▶ Promoveu alterações comportamentais semelhantes às de drogas depressoras do SNC, sem comprometimento da atividade motora dos animais;
- ▶ Apresentou uma atividade antinociceptiva significativa, tanto em nível central como periférico, evidenciada nos modelos animais utilizados. Esta atividade antinociceptiva não envolveu, pelo menos diretamente, a via opióide nem a participação dos canais de K^+_{ATP} ;
- ▶ Demonstrou atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica e com atividade seqüestradora de radicais livres (OH e NO) nas metodologias *in vitro* empregadas, podendo esta atividade estar relacionada com sua atividade antinociceptiva.

Perspectivas



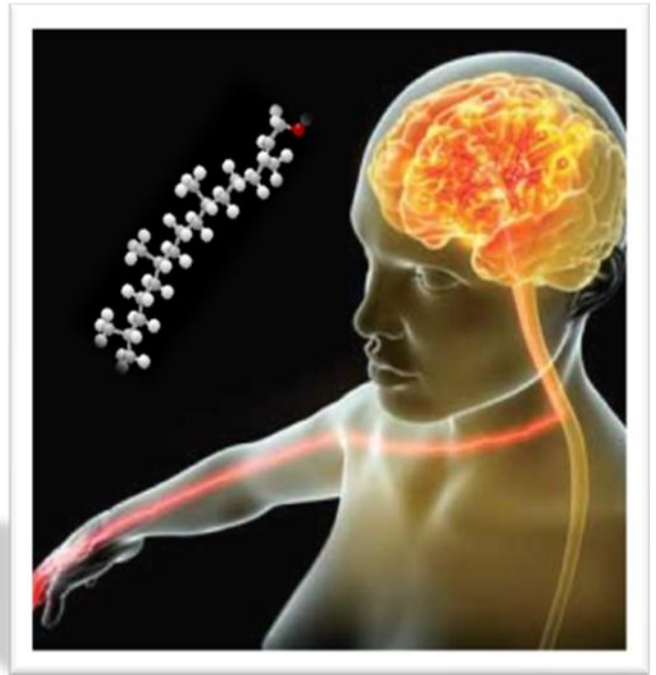
9. PERSPECTIVAS

Após a obtenção desses resultados com o fitol, há várias perspectivas para a realização de estudos mais aprofundados a fim de desvendarem melhor o mecanismo de ação deste diterpeno. Dessa forma, são propostas as seguintes perspectivas para a continuação do estudo com o fitol:

- ▶ Avaliar a toxicidade do fitol em longo prazo, através de estudo subcrônico e crônico, para confirmar os resultados obtidos através do tratamento agudo;
- ▶ Realizar um estudo da atividade do fitol por outras vias de administração, principalmente, por via oral, uma vez que esta é a via mais adequada para o emprego de medicamentos em humanos;
- ▶ Investigar outras vias de sinalização para descobrir por qual (is) mecanismo (s) o fitol exerce seu efeito antinociceptivo, como por exemplo, a via do glutamato, dos canais TRPV e a via do NO;
- ▶ Utilizar técnicas de estudo da atividade antioxidante *in vivo* para garantir a fidedignidade dos resultados obtidos com os testes *in vitro*.

Levando em consideração estes aspectos, será possível realizar estudos clínicos com o fitol, de modo que este diterpeno poderá, futuramente, ser um candidato em potencial a se transformar em um poderoso analgésico, contribuindo com o arsenal clínico para o tratamento da dor atualmente disponível.

Referências



10. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.

AHMADI, V. U.; HUSSAIN, H.; BURKHARI, I. A.; HUSSAIN, J.; JASSBI, A. R.; DAR, A. Antinociceptive diterpeno from *Euphorbia decipiens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 230-232, 2005.

AHMADI, A.; EBRAHIMZADEH, M. A.; ASHRAIA, S. A.; KARAMI, M.; MAHDAVI, M. R.; SARAVI, S. S. S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 72-79, 2011.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, **The Biochemical journal**, v. 357, p. 593–615, 2001.

ALMEIDA, E. R.; RAFAEL, K. R. O.; COUTO, G. B. L.; ISHIGAMI, A. B. M. Anxiolytic and anticonvulsant effects on mice of flavonoids, linalool, and α tocopherol presents in the extract of leaves of *Cissus sicyoides* L. (vitaceae). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1-6, 2009.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p. 131-137.

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

ANGELO, A. J. Lipid oxidation on foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. Naunyn-Schmied. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, p. 337-344, 2009.

ARNER, S.; RAWAL, N.; GUSTAFSSON, L. L. Clinical experience of long-term treatment with epidural and intrathecal opioids—a nationwide survey. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 32, n. 3, p. 253–259, 1988.

ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M. M. A.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-*trans*-retinoic acid. **Toxicological sciences**, v. 66, p. 274–282, 2002.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 9–20, 2003.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p. 209-215, 2006.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARTINS, D.F.; MAZZARDO, L.; SMIDERLE, F.R.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β -Glucan Isolated from *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. **Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.

BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. **Current biology**, v. 9, n. 12, p. 429–431, 1999.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 896-900, 2006.

BATISTA, J. S.; ALMEIDA, R. N.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 207–210, 1995.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BENEDITO, R. B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2009. 85f. Dissertação de Mestrado (Mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos) Universidade Federal de João Pessoa, 2009.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British journal of pharmacology**, v. 73, p. 325-332, 1981.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Science**, v. 65, p. 1865–1874, 1999.

BERGEROT, A.; HOLLAND, P. R.; AKERMAN, S.; BARTSCH, T.; AHN, A. H. VAN DEN BRINK, A. M. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. **European journal of neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1517-1534, 2006.

BEZERRA, F. J. L.; REZENDE, A.A.; RODRIGUES, S. J.; ALMEIDA, M. G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador de peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 640-649, 2004.

BHANDARE, A. M.; KSHIRSAGAR, A. D.; VYAWAHARE, N. S.; HADAMBAR, A. A.; THORVE, V. S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3412–3417, 2010.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOTHAM, P.A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 227–230, 2004.

BRAINER-LIMA, P. T. Opióides e receptores de membrana celular. Revisão atualizada. **Neurobiologia**, v. 4, p. 149-158, 1997.

BRINK, D. M. V. D.; WANDERS, R. J. A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1752-1765, 2006.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campinas: Ed. da Unicamp, 1994, p. 99-108.

BURGESS, P. R.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H. Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. **Journal of neuroscience**, v. 22, p. 5129–5136, 2002.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of physiological**, v. 190, p. 541–562, 1967.

BUSANELLO, E. N. B.; VIEGAS, C. M.; Moura, A. P.; TONIN, A. M.; GRINGS, M.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. In vitro evidence that phytanic acid compromises Na⁺ K⁺-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. **Brain research**, v. 1352, p. 231 – 238, 2010.

CAMPBELL, H. A.; HANDY, R. D.; SIMS, D. W. Shifts in a fish's resource holding power during a contact paired interaction: the influence of a copper contaminated

diet in rainbow trout. **Physiological and biochemical zoology**, v. 78, p. 706–714, 2005.

CAMPÊLO, L. M. L.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. L. M.; CERQUEIRA, G. S.; SOUSA, G. F.; SALDANHA, G. B.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. Antioxidant and Antinociceptive Effects of *Citrus limon* Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** (2011) doi:10.1155/2011/678673.

CAPASSO, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. Pharmacological Effects of Aqueous Extract from *Valeriana adscendens*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 309-312, 1996.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **The Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CASEY, K. L. The imaging of pain: background and rationale, In: CASEY, K.L.; BUSHNELL, M.C. **Pain Imaging**, 2000, pp. 1 –29.

CASHMAN, J.N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52, p. 13-23, 1996.

CHAPMAN, C. R.; CASEY, K. L.; DUBNER, R.; FOLEY, K. M.; GRACELEY, R. H.; READING, A. E. Pain measurement: an overview. **Pain**, v. 22, p. 1-31, 1985.

CHIUEH, C. C. Neuroprotective properties of nitric oxide. **The annals of the New York Academy of Science**, v. 890, p. 301–311, 1999.

CHIZH, B.A. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: Review article. **Amino Acids**, v. 23, p. 169–176, 2002.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; SILVA, M. C. C.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 109-116, 2005.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, J. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacological Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants, **Nutrition**, v.12, p. 274–277, 1996.

COYLE, D. E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia**, v. 23, p. 75–83, 1998.

CUNHA, D. C. **Produção de tubérculos e de óleo essencial de priprioca (*Cyperus articulatus* L.), em função da adubação orgânica e calagem.** 2006. 89f. Dissertação de Mestrado (Mestre em agronomia – solos e nutrição em plantas) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2006.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, A. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacology Reviews**, v. 53, p. 135–159, 2001.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DA SILVA, M.S.; DE SOUSA, D.P.; MEDEIROS, V.M.; FOLLY, M.A.B.; TAVARES, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v. 15, p. 316–328, 2005.

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

DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Neuroleptic-like properties of chloroform extract of *Maytenus obtusifolia*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, p. 224-225, 2005.

DERARDT, R.; JOUGNEY, S.; DELEVALCEE, F.; FALHOUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European journal of pharmacology**, v. 51, p. 17-24, 1980.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The Glutamate Receptor Ion Channels. **Pharmacological Reviews**. v. 51, n. 1, 1999.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DOGAN, D.; CAN, C. Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. **Fish, physiology and biochemistry**, 2011: DOI 10.1007/s10695-011-9492-1.

DRAY, A.; Urban, L. New pharmacological strategies for pain relief. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 36, p. 253–280, 1996.

DUAN, Y.; LIU, J.; MA, L.; LI, N.; LIU, H.; WANG, J.; ZHENG, L.; LIU, C.; WANG, X.; ZHAO, X.; YAN, J.; WANG, S.; WANG, H.; ZHANG, X.; HONG, F. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. **Biomaterials**, v. 31, p. 894–899, 2010.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D, AMDUR, M. O.; DOULL, J. (eds.). Casarett and Doull's Toxicology. **The basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 13-34.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical biology and medicine**, v. 11, p. 81–128, 1991.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin World Health Organization**, v. 63, n.6, p. 965-981, 1985.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid–induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98, p. 729-733, 2003.

FERNANDES, E.; TOSTE, S. A.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 9, p. 1008–1017, 2003.

FERNANDES, E.; COSTA, D.; TOSTE, S. A.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1895–1905, 2004.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M. M. Further Antinociceptive Properties of Extracts and Phenolic Compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 2, p. 235-239, 2008.

FITÓ, M.; LA TORRE, R.; COVAS, M.I. Olive oil and oxidative stress. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, p. 1215-1224, 2007.

FOLEY, K. M. Misconceptions and controversies regarding the use of opioids in cancer pain. **Anti-Cancer Drugs**, v. 6, p. 4–13, 1995.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DOS SANTOS, A. C.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; DOS SANTOS, E. P.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract, Fractions and Compounds Obtained from the Aerial Parts of *Baccharis illinita* DC in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 285–292, 2009.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129–141, 1999.

GAO, X.; KIM, H. K.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain**, v. 131, p. 262–271, 2007.

GARRIDO, V.; TEIXEIRA, G. A. P. B.; TEIXEIRA, V. L.; OCAMPO, P.; FERREIRA, W. J.; CAVALCANTI, D. N.; CAMPOS, S. M. N.; PEDRUZZI, M. M. B.; OLAYA, P.; DOS SANTOS, C. C. C.; GIONGO, V.; PAIXÃO, I. C. P. Evaluation of the acute toxicity of dolabelladienotriol, a potential antiviral from the brown alga *Dictyota pfaffii*, in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 209-215, 2011.

GLOERICH, J.; VAN DEN BRINK, D.M.; RUITER, J.P.N.; VAN VLIES, N.; VAZ, F.M.; WANDERS, R.J.A.; FERDINANDUSSE, S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR α in its regulation. **Journal of lipid research**, v. 48, p. 77-85, 2007.

GOLDIM, J. R. A Avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista HCPA**, v. 27, n. 1, 2007.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: Therapeutic challenges and opportunities. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 4–15, 2006.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

GÜLÇİN, I.; ALICI, H. A.; CESUR, M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 53, p. 281–285. 2005.

GUTMAN, G.A.; CHANDY, K.G.; ADELMAN, J.P.; AIYAR, J.; BAYLISS, D.A.; CLAPHAM, D.E.; COVARRIUBIAS, M.; DESIR, G.V.; FURUICHI, K.; GANETZKY, B.; GARCIA, M.L.; GRISSMER, S.; JAN, L.Y.; KARSCHIN, A.; KIM, D.; KUPERSCHMIDT, S.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; LESAGE, F.; LESTER, H.A.; MCKINNON, D.; NICHOLS, C.G.; O'KELLY, I.; ROBBINS, J.; ROBERTSON, G.A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M.; SEINO, S.; STUEHMER, W.; TAMKUN, M.M.; VANDENBERG, C.A.; WEI, A.; WULFF, H.; WYMORE, R.S. International Union of Pharmacology: XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 55, p. 583–586, 2003.

HACIMUFTUOGLU, A.; HANDY, C. R.; GOETTL, V. M.; LIN, C. G.; DANE, S.; STEPHENS, R. L. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. **Behavioural brain research**, v. 173, p. 211–216, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 2, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, p. 253–265, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, 2001. p. 1-7.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T.F. In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian journal of anesthesia**, v. 47, n. 4, p. 367-74, 2000.

HARGREAVES, J.; ABBOTT, P. V. Drugs for pain management in dentistry. **Australian dental journal**, v. 50, n. 2, p. 14-22, 2005.

HARRIS, J. A.; WESTBROOK, R. F. Effects of benzodiazepine microinjection into the amygdala or periaqueductal grey upon the expression of conditioned fear and hypoalgesia in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 109, p. 295–304, 1995.

HELLGREN, L. I. Phytanic acid—an overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1190, p. 42–49, 2010.

HOSKIN, P.J.; HANKS, G.W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, v. 41, p. 326–344, 1991.

HOELZL, C.; BICHLER, J.; FERK, F.; SIMIC, T.; NERSESYAN, A.; ELBLING, L.; EHRLICH, V.; CHAKRABORTY, A.; KNASMULLER, S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56, p. 49-64, 2005.

HOSTETLER, H.A.; KIER, A.B.; SCHROEDER, F. Very long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). **Biochemistry**, v. 45, p. 7669–7681, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HUNSKAAR, S.; FASMAR, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

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

IBI, M.; MATSUNO, K.; SHIBA, D. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. **Journal of neuroscience**, v. 28, p. 9486-9494, 2008.

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

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current medicinal chemistry**, v. 10, p. 2495–2505, 2003.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprenone, and Phytol on the Growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.

JESSÉ, C.R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C.W. Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis-selenide in mice. **Brain Research**, v. 1231, p. 25-33, 2008.

JIN, W. Y.; LIU, Z.; LIU, D.; YU, L. C. Antinociceptive effects of galanin in the central nucleus of amygdala of rats, an involvement of opioid receptors. **Brain research**, v. 1320, p. 16-21, 2010.

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

KAVVADIAS, D.; SAND, P.; YODIM, K. A.; QAISER, M. Z.; RICE-EVANS, C.; BAUR, R.; SIGEL, ERWIN.; RAUSCH, W. D.; RIEDERER, P.; SCHREIER, P. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 811–820, 2004.

KALIA, L. V.; KALIA, S. K.; SALTER, M. W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. **Lancet Neurology**, v. 7, p. 742–755, 2008.

KATAOKA, M.; TONOOKA, K.; ANDO, T.; IMAI, K.; AIMOTO, T. Hydroxyl radical scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Free Radical Research**, v. 27, p. 419–427, 1997.

KAWANO, T.; ZOGA, V.; KIMURA, M.; LIANG, M. Y.; WU, H. E.; GEMES, G; McCALLUM, J. B.; KWOK, W. M.; HOGAN, Q. H.; SARANTOPOULOS, C. D. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular Pain**, v. 5, n, 12, p. 1-20, 2009.

KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 4–29, 2005.

KIM, H. K.; PARK, S. K.; ZHOU, J. L.; TAGLIALATELA, G.; CHUNG, K.; COGGESHALL, R. E. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, p. 116–124, 2004.

KISSIN, I. The development of new analgesics over the past 50 Years: a lack of real breakthrough drugs. **Anesthesia and Analgesia**, v. 110, p. 780-789, 2010.

KLAUNIG, J.E.; XU, Y.; BACHOWSKI, S.; JIANG, J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In: WALLACE, K.B. **Free Radical Toxicology**, Taylor & Francis, London, 1997, pp. 375–400.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-414, 1959.

KOVELOWSKI, C. J.; OSSIPOV, M. H.; SUN, H. Supraspinal cholecystokinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. **Pain**, v. 87, p. 265–273, 2000.

KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; ZUKASZEWICZ, M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. **Current topics in biophysics**, v. 24, p. 89–95, 2000.

KUPELI, E.; ERDEMOGLU, N.; YESILADA, E.; SENER, B. Antiinflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, p. 265-270, 2003.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 3, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, I.; KIM, H. K.; KIM, J. H.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. **Pain**, v. 133, p. 9–17, 2007.

LEITE, A. C. R. M. **Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais**. 2010. 120f. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, 2010.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LI, X.; LUOB, Y.; WANG, L.; LI, Y.; SHI, Y.; CUI, Y.; XUE, M. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 110–115, 2010.

LIM, P.; SADRE-BAZZAZ, K.; SHURTER, J.; SARASIN, A.; TERMINI, J. DNA damage and mutations induced by arachidonic acid peroxidation. **Biochemistry**, v. 42, p. 15036–15044, 2003.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Fitos**, p. 314-24, 2007.

LIN, F.L.; WU, S.J.; LEE, S.C.; NG, L.T. Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 958-964, 2009.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluations dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, p. 99-113, 1949.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; LIMA, M. H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions¹. **Biochemical Biophysic Acta Gennetic Subject**, v. 1472, p. 142-152, 1999.

MACHELSKA, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. **Neuropeptides**, v. 41, p. 355-363, 2007.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, p. 62– 65, 2003.

MAFFEI, F. R.; CARANINI, M.; ALDINI, G.; SAIBENE, L.; MACCIOCCHI, A. Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin, and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PLC) as membrane model. **International journal of tissue reactions**, v. 15, p. 225–234, 1993.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica chimica acta**, v. 613, p. 1–19, 2008.

MAHADIK, S. P.; EVANS, D.; LAL, H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 25, p. 463-493, 2001.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **TIPS**, v. 17, p. 457–462, 1996.

MAO, J.; PRICE, D. D.; MAYER, D. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: A current view of their possible interactions. **Pain**, v. 62, n. 3, p. 259–274, 1995.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European journal of pharmacology**, v. 25, p. 947-951, 1995.

MARK, M.D.; HERLITZE, S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5830–5836, 2000.

MARTINI, A.; BONDIOLOTTI, G. P.; SACERDOTE, P.; PIERRO, L.; PICTOTTI, G. B.; PANERAI, A. E. Diclofenac increases beta-endorphin plasma concentrations. **The Journal of international medical research**, v.12, p. 92-5, 1984.

MATES, J.M.; GOMEZ, C.P.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases, **Clinical biochemistry**, v. 32, p. 595–603, 1999.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 12, p. 138-142.

McCALL, M.R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free radical biology and medicine**, v. 26, p. 1034–1053, 1999.

McGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on phytol. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.

MELOV, S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1395–1400, 2002.

MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia, **American journal of medical**, v. 75, p. 4– 14, 1983.

MEOTTI, F.C.; FACHINETTO, R.; MAFFI, L.C.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; ROCHA, J.B.T.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive action of myricitrin: Involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **European journal of pharmacology**, v. 567, p. 198-205, 2007.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**, IASP Press, Seattle, 1994, p. 210.

MICKALAD, A. M. L. M.; ZHENG, S. X.; DUPONT, G. P. D.; DEBY, C. M. T.; LAMY, M.; REGINSTER, J. Y. Y.; HENROTIN, Y. E. In vitro study of the antioxidant properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (ESR). **Free Radical Research**, v. 33, p. 607–621, 2000.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, p.1-164, 1999.

MIYASAKA, N.; HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. **Life Sciences**, v. 61, p. 2073–2081, 1997.

MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European journal of pharmacology**, v. 647, p. 103-109, 2010.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidants assays for plant and food components. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 57, p.1655-1668, 2009.

MOORE, N. D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain**, v. 11, p. 129-137, 2009.

NATHAN, A.T.; SINGER, M. The oxygen trail: tissue oxygenation. **British medical bulletin**, v. 55, p.96–108, 1999.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia and analgesia**, v. 93, p. 197-203, 2001.

NIKOLIC, D.; BREEMEN, R. B. DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. **Chemical research in toxicology**, v. 14, p. 351– 354, 2001.

NORTH, R.A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, p. 13–28, 1989.

OCANA, M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L. I.; BAEYENS, J. M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 377–378, 1990.

OCANA, M.; BAEYENS, J. M. Differential effects of K channel blockers on antinociception induced by α_2 -adrenoceptor, GABA_B and n-opioid receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1049–1054, 1993.

OCANA, M.; CENDÁN, C. M.; COBOS, E. J.; ENTRENA, J. M.; BAEYENS, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203-219, 2004.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 490–496, 2007.

OLIVEIRA, M. W. S.; MINOTTO, J. B.; OLIVEIRA, M. R.; ZANOTTO-FILHO, A.; BEHR, G. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; KLAMT, F. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. **Pharmacological reports**, v. 62, p. 185-193, 2010.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Research**, v. 912, p. 171-175, 2001.

ONG, H. M.; MOHAMAD, A. S.; MAKHTAR, N. A.; KHALID, M. H.; KHALID, S.; PERIMAL, E. K.; MASTUKI, S. N.; ZAKARIA, Z. A.; LAJIS, N.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 227-233, 2011.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F. Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: Relationship to opioid antinociceptive tolerance. **Life Sciences**, v. 73, n. 6, p. 783–800, 2003.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP–DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **Journal of molecular biology**, v. 304, p. 55–68, 2000.

PERIMAL, E. K.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; KHALID, M. H.; MING, O. H.; KHALID, S.; TATT, L. M.; KAMALDIN, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Zerumbone-Induced Antinociception: Involvement of the L-Arginine-Nitric Oxide-cGMP -PKC-K⁺ATP Channel Pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 155–162, 2010.

PINHEIRO, P.S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, p. 423–436, 2008.

PINTO, M. S. C. T. A percepção da dor receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 253-262, 2000.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Current medicinal chemistry**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European journal of cancer prevention**, v. 7, p. 9–16, 1998.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, p. 1720-1725, 2006.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; GUIMARÃES, A. G.; SANTANA, M. T.; ARAÚJO, B. E. S.; MOREIRA, F. V.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S.; SIQUEIRA, J. S.; ANTONIOLLI, A. R.; BOTELHO, M. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SANTOS, M. R. V.

Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 497-502, 2011a.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, an Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of medicinal food**, v. 14, p. 630-639, 2011b.

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RAJAB, M. S.; CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. C.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial Activity of (E)-Phytol and Derivatives: A Preliminary Structure-Activity Study. **Planta Medica**, v. 64, p. 2-4, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia** 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 605.

REANMONGKOL, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S. I. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1345–50, 1994.

REITER, R. J.; TAN, D.; MANCHESTER, L. C.; QI, W. Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 34, 237-256, 2001.

REITER, R. J.; TAN, D.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 1007–1019, 2002.

RHIOUANI, H.; EL-HILALYA, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378–386, 2008.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 60, p. 404–415, 2001.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.). Report on Human Maximization Studies. **RIFM Report** Number 1702, May 03, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA. 1977.

ROANE, D.S.; BOYD, N.E. Reduction of food intake and morphine analgesia by central glybenclamide. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 46, p. 205-207, 1993.

ROBERTS, R. A.; SMITH, R. A.; SAFE, S.; SZABO, C.; TJALKENS, R. B.; ROBERTSON, F. M. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, v. 276, p. 85–94, 2010.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p.123-133, 1998.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.10, p. 124-130.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA D.; OJHA, S.; KUMAR, J. K.; CHANOTIYA, C. S.; SHANKER, K.; NEGI, A. S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508–512, 2010.

SAKATA, R. K.; GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 51, p. 3-11, 1994.

SALERNO, A.; HERMANN, R. Efficacy and safety of steroid use for postoperative pain relief. Update and review of the medical literature. **The Journal of bone and joint surgery American**, v. 88, p. 1361-72, 2006.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; ZWEIER, J. L.; SAMOUILOV, A.; MACARTHUR, H.; MISKO, T. P. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Science**, v. 286, p. 304-306, 1999.

SALVEMINI, D.; DOYLE, T.M.; CUZZOCREA, S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative / nitrative stress in inflammation. **Biochemical Society transactions**, v. 34, p. 965-70, 2006.

SALVEMINI, D.; LITTLE, J. W.; DOYLE, T. M.; NEUMANN, W. L. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51(5): p. 951-66, 2011.

SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. **Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy**. 6. ed., Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 2010.

SANCHEZ, J.A.; GONOI, T.; INAGAKI, N.; KATADA, T.; SEINO, S. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. **Journal of Physiology**, v. 507, p. 315–324, 1998.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 114, p. 323-328, 1995.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological reviews**, v. 55, p. 1-20, 2003.

SCHWARTZ, E. S.; LEE, I.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 138, p. 514–524, 2008.

SCHWARTZ, E. S.; KIM, H. Y.; WANG, J.; LEE, I.; KLANN, E.; Chung, J. M.; CHUNG, K. Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 159–168, 2009.

SEHGAL, N.; SMITH, H.; MANCHIKANTI, L. Peripherally Acting Opioids and Clinical Implications for Pain Control. **Pain Physician**, v. 14, p. 249-258, 2011.

SERAFINI, M. R.; SANTOS, R. C.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, J. P. A.; SANTOS, A. D. C.; ALVES, I. A.; GELAIN, D. P.; NOGUEIRA, P. C. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of medicinal food**, p. 1-8, 2011.

SHI, G.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; HUANG, Y.; CHEN, Y. Mechanisms involved in the antinociception of petroleum ether fraction from the EtOH extract of *Chrysanthemum indicum* in mice. **Phytomedicine**, v. 18, p. 609-616, 2011.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacology Reviews**, v. 52, p. 557– 594, 2000.

SHUKLA, S.; MEHTA, A., BAJPAI, V.; SHUKLA, S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and chemical toxicology**, v. 47, p. 2338–2343, 2009.

SIEMS, W. G.; GRUNE, T.; ESTERBAUER, H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. **Life Sciences**, v. 57, p. 785–789, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 18, p. 467-495.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, p. 9-19, 2001.

SOUTHOM, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease (Review). **Mayo Clinic proceedings**, v. 63, p. 390–408, 1998.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R. A. F.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2010.

SRINIVASAN, K.; MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; RAVIPRAKASH, V.; KUMAR, D. Antinociceptive and antipyretic activities of *Pongamia pinnata* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 259-264, 2003.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Current medicinal chemistry**, v. 11, p. 1105-1112, 2004.

STEIN, C.; ZOLLNER, C. Opioids and sensory nerves. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 194, p. 495-518, 2009.

SUEBSASANA, S.; PONGNARATORN, P.; SATTAYASAI, J.; ARKARAVICHIEEN, T.; TIAMKAO, S.; AROMDEE, C. Analgesic, Antipyretic, Anti-Inflammatory and Toxic Effects of Andrographolide Derivatives in Experimental Animals. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 9, p. 1191-1200, 2009.

SULAIMAN, M. R.; HUSSAIN, M. K.; ZAKARIA, Z. A.; SOMCHIT, M. N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 557–561, 2008.

SULAIMAN, M. R.; PERIMAL, E. K.; ZAKARIA, Z. A.; MOKHTAR, F.; AKHTAR, M. N.; LAJIS, N. H.; ISRAF, D. A. Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. **Fitoterapia**, v. 80, p. 230-232, 2009.

SULAIMAN, M. R.; ZAKARIA, Z. A.; RAHMAN, A. A.; MOHAMAD, A. S.; DESA, M. N.; STANSLAS, J.; MOIN, S.; ISRAF, D. A. Antinociceptive and Antiedematogenic Activities of Andrographolide Isolated From *Andrographis paniculata* in Animal Models. **Biological Research for Nursing**, v. 11, n.3, p. 293-301, 2010.

SYNDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, p. 68–77, 1992.

THOMSEN, M.; WORTWEIN, G.; OLESEN, M. V.; BEGTRUP, M.; HAVEZ, S.; BOLWIG, T. C.; WOLDBYE, D. P. D. Involvement of Y(5) receptors in neuropeptide Y agonist-induced analgesic-like effect in the rat hot plate test. **Brain Research**, v. 1155, p. 49-55, 2007.

TIMMERMANN, L.; PLONER, M.; HAUCKE, K. Differential coding of pain intensity in the human primary and secondary somatosensory cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, p. 1499–1503, 2001.

TODD, A. J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. **Experimental physiology**, v. 87, p. 245–9, 2002.

TREEDE, R.D.; KENSHALO, D.R.; GRACEY, R.H. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, p. 105– 111, 1999.

TROULLOS, E.; HARGREAVES, K. M.; DIONNE, R. A. Ibuprofen elevates immunoreactive beta-endorphin levels in humans during surgical stress. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 62, p. 74-81, 1997.

TWAIJ, H.A.A.; KERY, A.; AL KHAZRAJI, N.K. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, p. 299–314, 1983.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 266, p. 37–56, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39 p. 44–84, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environment toxicology and pharmacology**, v. 13, p. 157–149, 2003.

VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VERHOEFEN, N.M.; WANDERS, R.J.; POLL, B.T.; SAUDUBRAY, J.M.; JACOBS, C. The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. **Journal of inherited metabolic disease**, v.21, p.697-728, 1998.

WADA, Y.; YAMASHITA, T.; IMAI, K.; MIURA, R.; TAKAO, K.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; ASANO, T.; MORISHITA, R.; NISHIZAWA, K.; KOKUBUN, S.; NUKADA, T. A region of the sulfonylurea receptor critical for modulation of ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein hg -subunits. **EMBO Journal**, v. 19, p. 4915-4925, 2000.

WANG, Z. Q.; PORRECA, F.; CUZZOCREA, S.; GALEN, K.; LIGHTFOOT, R.; MASINI, E. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 309, p. 869–878, 2004.

WATKINS, L. R.; MARTIN, D.; ULRICH, P.; TRACEY, K. J.; MAIER, S. F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 71, p. 225–35, 1997.

WHITEMAN, M.; HONG, H. S.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: implications for assessment of oxidative damage in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 296, p. 883–889, 2002.

WILD, K.D.; VANDERAH, T.; MOSBERG, H.I.; PORRECA, F. Opioid y receptor subtypes are associated with different potassium channels. **European journal of pharmacology**, v. 193, p. 135–136, 1991.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the Pain System that modulate pain. **Journal of clinical neurophysiology**, v. 14, p. 2–31, 1997.

WITZUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v. 344, p. 793–795, 1994.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300–307, 1944.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p.1765–1769, 2000.

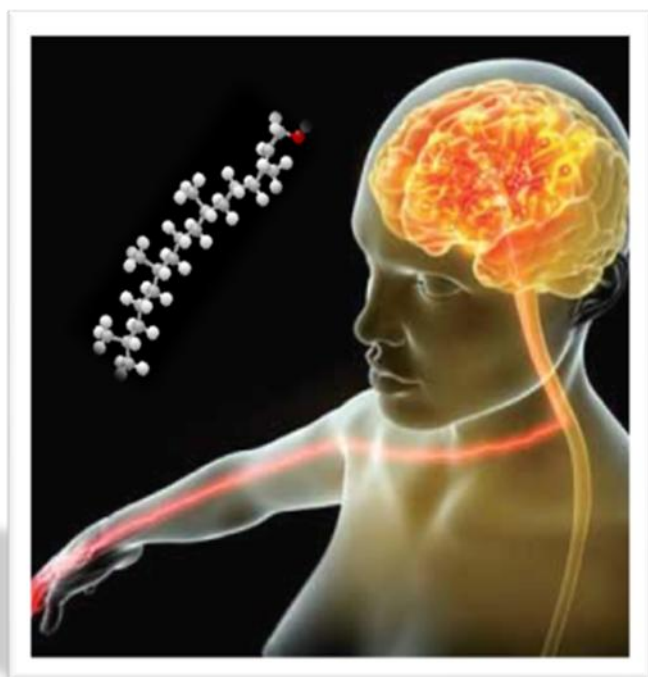
YADIN, E.; THOMAS, E.; STRICKLAND, C. E.; GRISHKAT, H. L. Anxiolytic effects of benzodiazepines in amygdala-lesioned rats. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 473–479, 1991.

YAKSH, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: Modulation by opioids. **Brain Research**, v. 458, p. 319–324, 1988.

YOWTAK, J.; LEE, K. Y.; KIM, H. Y.; WANG, J.; KIM, H. K.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, v. 152, p. 844–852, 2011.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p.227–231, 2002.

Anexos



TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

- ▶ DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; ALMEIDA, R. N. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate. **70th International Congress of FIP**, 2010, Portugal.
- ▶ SANTOS, C. C. M. P., DA ROCHA, M. L., OLIVEIRA, L. E. G., NOBREGA, F. F. F., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N., ARAÚJO, D. A. M. Investiga  o do efeito antinociceptivo central e mecanismo de a  o de epoxi-carvona em camundongos. **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2010, João Pessoa-PB.
- ▶ SANTOS, C. C. M. P., OLIVEIRA, L. E. G., NOBREGA, F. F. F., SALGADO, P.R.R., MOTA, V. G., SOUSA, D. P., S  , R.C.S., ALMEIDA, R. N. Compara  o do efeito psicodpressor de tetrahidrolinalol em camundongos machos e fêmeas. **V Reunião Regional da Fesbe**, 2010, Aracaju - SE.
- ▶ NOBREGA, F. F. F., NOGUEIRA, K. F., BENEDITO, R.B., SANTOS, C. C. M. P., OLIVEIRA, L. E. G., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. Atividade anticonvulsivante de análogos do alfa-terpineol em roedores. **5 Simpósio Brasileiro de   leos Essenciais**, 2009, Rio de Janeiro - RJ.
- ▶ OLIVEIRA, L. E. G., NOBREGA, F. F. F., SANTOS, C. C. M. P., SALGADO, P.R.R., MOTA, V. G., S  , R.C.S., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. Atividade central do tetrahidrolinalol em camundongos. **5 Simpósio Brasileiro de   leos Essenciais**, 2009, Rio de Janeiro - RJ.
- ▶ MONTES, G. C., MONTE, L.O., SALGADO, P.R.R., SANTOS, C. C. M. P., SOUSA, D. P., LIMA, N. G. P. B., ALMEIDA, R. N. Avalia  o do D-limoneno por via intraperitoneal e inalatória no modelo animal do labirinto em cruz elevado. **5 Simpósio Brasileiro de   leos Essenciais**, 2009, Rio de Janeiro - RJ.

- ▶ SANTOS, C. C. M. P., DA ROCHA, M. L., OLIVEIRA, L. E. G., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N., ARAÚJO, D. A. M. Atividade antinociceptiva de epóxi-carvona em modelos animais. **7 Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2009, Maringá - PR.
- ▶ SANTOS, C. C. M. P., OLIVEIRA, L. E. G., FONSECA, D.V., NOBREGA, F. F. F., SÁ, R.C.S., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. Atividade antinociceptiva do tetrahidrolinalol em camundongos. **7 Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2009, Maringá - PR.
- ▶ NOGUEIRA, K. F., SANTOS, C. C. M. P., MOTA, V. G., NOBREGA, F. F. F., SOUSA, D. P., MORAIS, L. C. S. L., ALMEIDA, R. N. Atividade farmacológica central comparativa de (RS)-(±)-linalol, e seus enantiômeros, (S)-(+)-linalol e (R)-(-)-linalol. **40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2008, Águas de Lindóia.
- ▶ MOTA, V. G., SENA, M. C. P., LIMA, M. R. V., SANTOS, C. C. M. P., ALENCAR, J. L. DE, MORAIS, L. C. S. L., ALMEIDA, R. N. Avaliação da atividade central de *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (Fabaceae) em camundongos. **X International Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008, São Paulo.
- ▶ MONTES, G. C., SILVA, M. R., MOTA, V. G., SOUTO MAIOR, F. N., SANTOS, C. C. M. P., LIMA, N. G. P. B., ALMEIDA, R. N. Efeitos da inalação do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller sobre o comportamento de camundongos. **X International Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008, São Paulo.
- ▶ SANTOS, C. C. M. P., SENA, M. C. P., NOBREGA, F. F. F., MOTA, V. G., OLIVEIRA, L. E. G., DA ROCHA, M. L., SOUSA, D. P., MORAIS, L. C. S. L., ALMEIDA, R. N. Estudo comparativo da atividade anticonvulsivante de (RS)-(±)-linalol, (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol em camundongos. **X International Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008, São Paulo.

- ▶ SANTOS, C. C. M. P., NOBREGA, F. F. F., MOTA, V. G., SOUTO MAIOR, F. N., MORAIS, L. C. S. L., ALMEIDA, R. N. Caracterização de atividade comportamental no SNC e investigação de efeito ansiolítico-sedativo de *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (Fabaceae) em camundongos. **III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2008, Fortaleza.

TRABALHOS COMPLETOS SUBMETIDOS OU PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

- ▶ SANTOS, C. C. M. P.; SALVADORI, M. S.; MOTA, V. G.; COSTA, J. P.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol in rodents, a Natural Compound. **The Journal of Pain**, 2011 (ARTIGO SUBMETIDO).
- ▶ MOTA, V. G.; SANTOS, C. C. M. P.; MONTE, L. O.; DE CARVALHO, F. L.; TAVARES, J. F.; MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; MORAIS, L. C. S. L.; ALENCAR, J. L.; ALMEIDA, R. N. Analgesic and sedative effects of *Lippia microphylla* Cham. essential oil in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2011 (ARTIGO SUBMETIDO).
- ▶ DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; BENEDITO, R. B.; VIEIRA, Y. W.; ULIANA, M. P.; BROCKSOM, T. J.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive activity of thymoquinone and its structural analogues: a structure-activity relationships study. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 2011 (ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO).
- ▶ OLIVEIRA JÚNIOR, W. M.; BENEDITO, R. B.; SANTOS, C. C. M. P.; RODRIGUES, L. T. D.; MARINHO, A. F.; MORAIS, L. C. S. L.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Analgesic effect of hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl leaves. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 4, p. xxx – xxx, 2011.
- ▶ DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; BENEDITO, R. B.; VIEIRA, Y. W.; ULIANA, M. P.; BROCKSOM, T. J.; ALMEIDA, R. N. Anticonvulsant activity of thymoquinone and its structural analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 427-431, 2011.

- ▶ DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; ALMEIDA, R. N. Anticonvulsant Activity of the Linalool Enantiomers and Racemate: Investigation of Chiral Influence. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1847 – 1851, 2010.