

RUBENS BATISTA BENEDITO

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO PESSOA

2009

RUBENS BATISTA BENEDITO

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
da Paraíba, para obtenção do grau de
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA

2009

B463e Benedito, Rubens Batista.
Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-álcool perílico
em camudongos / Rubens Batista Benedito.- João Pessoa,
2009.
83f. : il.
Orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS/LTF
1. Produtos Naturais. 2. (S)-(-)-álcool perílico. 3. Óleos
essenciais. 4. Atividade antinociceptiva.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

RUBENS BATISTA BENEDITO

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovado em 06/11/2009

BANCA EXAMINADORA

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

**Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa
Examinador externo – UFS**

**Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinadora interna – UFPB**

*Aos meus pais, João Benedito Sobrinho e
Maria do Céu Batista Benedito, minha irmã Renata
Batista Benedito e irmão Rafael Batista Benedito,
pilares de minha vida, a quem devo a felicidade de
todos os meus dias.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela benção concedida a cada dia de luta.

Ao Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, pela paciência e pelos sábios ensinamentos que sempre me acompanharão e servirão de referência na minha vida pessoal e profissional.

A Prof^a. Dr^a. **Liana Clébia Soares Lima de Moraes**, pelos ensinamentos, prestatividade, e pela sua constante alegria transmitida.

Ao Prof. Dr. **Damião Pergentino de Sousa**, pela colaboração direta e fornecimento da substância estudada.

A Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Dr^a. **Márcia Regina Piuvezam**, pela competência na condução deste programa.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A todos os amigos da minha turma do mestrado, **Antônia, Bruna, Camila, Carlos, Maria do Carmo, Carol, Charlane, Dayseanne, Fillipe, Fábio, Garaldo, John, João Euclides, Karine, Marcelo, Renata, Thaísa, Thiago, Vinicius, Vitor, Vivyanne, Wemerson**, pelo companheirismo e incentivo.

Em especial, ao meu amigo/irmão **João Carlos Lima Rodrigues Pita**, companheiro inseparável de todos os momentos.

A todos os meus **amigos** de São José de Piranhas que sempre me incentivaram e proporcionaram muitas alegrias.

A minha namorada, **Rosinângela Cavalcanti**, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Psicofarmacologia, **Guilherme Carneiro, Kyldere Feitosa, Lucas de Oliveira, Maria Clécia, Maria Raquel, Paula Lima, Paula Regina**, pela colaboração na parte experimental e pela amizade construída.

Aos Pós-graduandos do Laboratório de Psicofarmacologia, **Ana Karina, Aron de Miranda, Camila Carolina, Fabrícia Costa, Flávia Negromonte, Franklin Ferreira, Juan Carlos, Leandra Eugênia, Marilene Lopes, Rita de Cássia**, pela constante ajuda.

A todos os **funcionários** do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e a secretária da Pós-graduação **Tânia Maria Araújo**, pelos serviços prestados.

A **José Crispim Duarte, Luis Cordeiro e Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

A **todos** que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho.

"Do mesmo modo que o metal enferruja com a ociosidade e a água parada perde sua pureza, assim a inércia esgota a energia da mente."

(Leonardo da Vinci)

BENEDITO, R., B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2009. 83f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

RESUMO

Os óleos essenciais são produtos naturais com diferentes aplicações, especialmente na área terapêutica e cosmética. Muitos óleos essenciais apresentam diversas propriedades farmacológicas em nível de SNC, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. A influência dos grupos funcionais nas estruturas dessas moléculas em relação ao efeito psicofarmacológico também tem sido investigada. Estes efeitos dos óleos essenciais são provavelmente devido à grande diversidade estrutural de seus constituintes químicos. O (-)-mentol é um monoterpeno que pertence à série de terpenos *p*-mentanos e que apresenta atividade antinociceptiva central envolvendo o sistema opióide. Já o álcool perílico (*p*-Mentha-1,8-diene-7-ol) é também um membro da família dos monoterpenos, com estrutura semelhante ao mentol, sendo encontrado em plantas dos gêneros *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, entre outros, cuja atividade antinociceptiva ainda não tinha sido estudada. Baseado nesta semelhança químico-estrutural, o presente trabalho investigou a atividade antinociceptiva do (S)-(-)-álcool perílico (AP) em modelos animais. O estudo teve início com a triagem farmacológica comportamental e determinação da DL₅₀, concomitantemente. Na triagem os resultados apontaram para uma atividade depressora no SNC e a partir da DL₅₀, foram escolhidas as doses dos testes subseqüentes (50, 75, 100 mg/kg). Com a finalidade de investigar uma possível atividade miorelaxante e neurotóxica que pudessem interferir nos resultados seguintes, foi realizado o teste do rota-rod, onde se observou ausência de tais efeitos. Em seguida, metodologias para avaliar a atividade antinociceptiva em si foram utilizadas. A primeira foi a das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, em seguida o teste da formalina e por fim, o teste da placa quente, que é específico para atividade antinociceptiva central. Nas três metodologias usadas, o AP apresentou-se efetivo. Portanto, a partir destes dados experimentais, é possível inferir que o AP possui atividade antinociceptiva do tipo central, cujos mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos.

Palavras-chave: (S)-(-)-álcool perílico, óleos essenciais, atividade antinociceptiva.

BENEDITO, R., B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeneo (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2009. 83f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

ABSTRACT

Essential oils are natural products with different applications, especially in the area therapeutic and cosmetic. Many essential oils exhibit a variety of pharmacological properties level of CNS, such as anxiolytic, anticonvulsant and antinociceptive. The influence of functional groups in the structures of these molecules in relation to psychopharmacological effect has also been investigated. These effects are probably due to great structural diversity of the essential oils constituents. The (-)-menthol is a monoterpene that belongs to the series of *p*-menthane terpenes, and has central antinociceptive activity involving the opioid system. Perillyl alcohol (*p*-Mentha-1, 8-diene-7-ol) is also a member of the family of monoterpenes, with structure similar to menthol, being found in plants of the genus *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, among other, whose antinociceptive activity had not already been studied. Based on this chemical and structural similarity, this study investigated the antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol (PA) in animal models. The study began with the screening behavioral pharmacology and the determination of the LD₅₀, concomitantly. The screening, results indicated a depressant activity in the CNS and the LD₅₀ doses were chosen for subsequent tests (50, 75, 100 mg / kg). In order to investigate a possible miorelaxant and neurotoxic activity that could interfere with the results, the rota-rod test was conducted, where there was no such effect. Next, methods to evaluate the antinociceptive activity were used. The first was the writhing induced by acetic acid, then the formalin test and finally the hot plate, which is specific for central antinociceptive activity. In the three methods used, PA was show be significantly effective. Therefore, from these experimental data, we can infer that the PA has central antinociceptive activity , but mechanisms involved remain unknown.

Keywords: (S)-(-)-perillyl alcohol, essential oils, antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do álcool perílico, mentol, carvona e hidroxidiidrocarvona.....	18
Figura 2 – Nociceptores e sua conexão com a medula e encéfalo.....	23
Figura 3 – Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	25
Figura 4 – Diagrama esquemático do sistema de controle da comporta.....	28
Figura 5 – Camundongos machos albinos da linhagem suíça.....	36
Figura 6 – Aparelho do rota-rod para camundongos.....	38
Figura 7 – Caixa de observação para o teste da formalina.....	39
Figura 8 – Aparelho de placa quente.....	40
Figura 9 – Resumo esquemático do estudo da atividade antinociceptiva de AP em camundongos.....	41
Figura 10 – Aspecto geral de um procedimento do teste da formalina.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental.....	44
Quadro 2 –	Principais alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração de diferentes doses de AP.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Efeito do AP via i.p., sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste do rota-rod.....	53
Gráfico 2 –	Efeito do AP no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos, via i.p.....	54
Gráfico 3 –	Efeito do AP na primeira fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.....	55
Gráfico 4 –	Efeito do AP na segunda fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.....	56
Gráfico 5 –	Efeito do AP no teste da placa quente em camundongos tratados via i.p.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	–	Por cento
°C	–	Graus Celsius
α	–	Alfa
β	–	Beta
δ	–	Delta
κ	–	Kappa
μ	–	Mu
μL	–	Microlitro
AAS	–	Acido acetil salicílico
ANOVA	–	Análise de variância
AP	–	(S)-(-)-álcool perílico
BTG	–	Biotério Prof. Dr. Thomas George
BRVMR	–	Bulbo raquidiano ventromedial rostral
Ca^{2+}	–	Íon cálcio
CEPA	–	Comitê de Ética para Uso de Animais
COX	–	Ciclooxigenase
CGRP	–	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DL_{50}	–	Dose letal 50%
Dr.	–	Doutor
Dr ^a .	–	Doutora
E.U.A.	–	Estados Unidos da América
e.p.m.	–	Erro padrão da média
et al	–	E colaboradores
GABA	–	Ácido gama amino butírico
h	–	Horas
IASP	–	Associação Internacional para Estudo da Dor
i.p.	–	Intraperitoneal
K^{+}	–	Íon potássio
Kg	–	Quilogramas
LC	–	Locus coeruleus
LTF	–	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Mg	–	Miligramas
n	–	Número de animais
NMDA	–	N-metil-D-aspartato
NMR	–	Núcleo magno da rafe
NRPG	–	Núcleo reticular paragigantocelular
pH	–	Potencial hidrogeniônico
Prof.	–	Professor
$\text{PGE}_{2\alpha}$	–	Prostaglandina E ₂ α
$\text{PGF}_{2\alpha}$	–	Prostaglandina F ₂ α
r.p.m.	–	Rotações por minuto
SCPV	–	Substância cinzenta periaquedutal
SG	–	Substância gelatinosa
SNA	–	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	–	Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervos Periférico
SP – Substância P
Tween 80 – Polioxetileno Sorbitano Monoleato
UFPB – Universidade Federal da Paraíba
U.S.A – Estados Unidos da América
VR-1 – Receptor vanilóide - 1
VRL-1 – Receptor vanilóide – Like - 1

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	16
II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Dor: Conceito e tipos	21
2.2 Dor e Nocicepção	22
2.3 Teoria da comporta e controle central da dor	26
2.4 Considerações gerais sobre drogas analgésicas	28
III. JUSTIFICATIVA	33
IV. OBJETIVOS	35
4.1 Geral	35
4.2 Específicos	35
V. MATERIAL	36
5.1 Animais	36
5.1.1 Condições experimentais	37
5.2 Substâncias utilizadas	37
5.3 Preparação do Álcool Perílico	38
5.4 Aparelhagem	38
5.4.1 Aparelho do rota-rod	38
5.4.2 Caixa de observação para o teste da formalina	39
5.4.3 Aparelho de placa quente	39
VI. MÉTODOS	41
6.1 TESTES PRELIMINARES	42
6.1.1 Determinação da dose letal 50%	42
6.1.2 Triagem farmacológica comportamental	43

6.2 AVALIAÇÃO GERAL SOBRE O SNC.....	45
6.2.1 Teste do rota-rod.....	45
6.3 TESTES ESPECÍFICOS	46
6.3.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	46
6.3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA CENTRAL	47
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
VII. RESULTADOS	50
7.1 TESTES PRELIMINARES	50
7.1.1 Determinação da dose letal 50%.....	50
7.1.2 Efeito do álcool perílico na triagem farmacológica comportamental....	50
7.2 AVALIAÇÃO GERAL SOBRE O SNC.....	53
7.2.1 Teste do rota-rod.....	53
7.3 TESTES ESPECÍFICOS	54
7.3.1 Estudo da atividade antinociceptiva	54
7.3.2 Estudo da atividade antinociceptiva central	55
VIII. DISCUSSÃO.....	59
IX. CONCLUSÕES.....	66
X. PERSPECTIVAS	68
XI. REFERÊNCIAS	70

Introdução

I. INTRODUÇÃO

A exposição da pele ou outro órgão aos danos ou estímulos nocivos induz uma sensação desagradável chamada dor, que continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade. O homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência da dor e propor procedimentos destinados ao seu controle. A dor é componente fundamental da homeostase e seu propósito inicial é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos ou potencialmente nocivos), permitindo que mecanismos de defesa ou fuga sejam adotados. (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001).

O tratamento da dor tem sido motivo de preocupação e de vários estudos tanto para pesquisadores quanto para indústria farmacêutica, pois apesar da variedade de substâncias e do avanço no desenvolvimento das terapias de controle da dor, ainda há uma necessidade urgente de analgésicos potentes e com menos efeitos adversos, principalmente para os casos de dor crônica, onde a melhor alternativa farmacológica ainda é a morfina, apesar dos muitos indesejáveis. Neste sentido, inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo têm voltado sua atenção para a validação do uso de plantas medicinais e o isolamento de seus metabólitos secundários, que possam vir a ser fonte de substâncias farmacologicamente similares à morfina, sem seus efeitos colaterais, produzidas em menor tempo, com baixo custo (CALIXTO et al., 2000; LIRA, 2001).

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade de modo que, atualmente, 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. No período entre 1981 e 2002, 30% das substâncias químicas descobertas foram obtidas de produtos naturais, enquanto que uma média de 20% das novas substâncias compreendeu moléculas sintetizadas, com estruturas baseadas no que é encontrado na natureza (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BALUNAS; KINGHORN, 2005). Entre 2001 e 2002, quase um quarto dos fármacos mais vendidos no mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Em 2001, um artigo de revisão relatou 202 espécies de plantas com atividade analgésica envolvendo 79 famílias. A maioria dos estudos foi conduzida

utilizando ratos e camundongos em modelos experimentais de dor empregando extratos obtidos das plantas (ALMEIDA et al., 2001). Essas informações mostram o potencial das plantas como medicamentos com efeito analgésico, onde já foram identificadas diversas espécies vegetais com perfil antinociceptivo, tais como a *Hyptis pectinata* (BISPO et al. 2001); *Hyptis fruticosa* (MENEZES et al., 2007); *Erythrina velutina* (DANTAS et al., 2004), entre outras.

Os óleos essenciais são produtos naturais com diferentes aplicações, especialmente na área terapêutica e cosmética. Eles contribuem para o aroma e fragrância de muitos produtos na indústria alimentícia e de perfumaria. Muitos óleos essenciais apresentam diversas propriedades farmacológicas, tais como ansiolítica (ALMEIDA et al., 2004), anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999) e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2001). Recentemente demonstrou-se que alguns análogos não naturais também são psicoativos (DE SOUSA et al., 2006b; 2006c; 2004). A influência dos grupos funcionais nas estruturas dessas moléculas em relação ao efeito psicofarmacológico também tem sido investigada (DE SOUSA et al., 2007 a; 2007 d).

Os diferentes efeitos farmacológicos encontrados são provavelmente devido à diversidade químico-estrutural que os constituintes dos óleos essenciais apresentam. Esta noção é confirmada por estudos recentes de terpenos presentes nestes óleos, os quais se mostraram bioativos em diferentes modelos animais (ELISABETSKY et al., 1995). De fato, nos últimos anos foram relatados vários estudos sobre as propriedades farmacológicas de diversos terpenos estruturalmente simples. Em sua maioria, são produtos naturais abundantes e bastante conhecidos, contudo, seu potencial psicoterápico era subestimado. Muitos são monoterpenos comumente presentes em óleos essenciais, como o linalol que tem ação anticonvulsivante e hipnótica (ELISABETSKY et al., 1995), (-)-carvona (GONÇALVES et al., 2008), o mirceno (RAO et al., 1990) e o 1,8-cineol que possuem efeito analgésico (SANTOS & RAO, 2000), e o sesquiterpeno kessanol, presente nas raízes de *Valeriana fauriei* que demonstrou ação antidepressiva (OSHIMA et al., 1995).

Com relação à natureza química dos óleos essenciais, esses, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres,

aldeídos, e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de dez e de quinze átomos de carbonos, conhecidas por monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente (SIANI et al., 2006).

A série de terpenos *p*-mentanos é, possivelmente, a mais abundante na natureza e com maior utilidade comercial. Desta série, talvez, o mais conhecido grupo de terpenos *p*-mentanos oxigenados seja os mentóis e mentonas, os quais foram primeiramente isolados dos óleos essenciais de várias espécies de *Mentha*. (ERMAN, 1985). O monoterpeno mentol (Figura 1), substância amplamente empregada em diversos produtos farmacêuticos, apresenta vários isômeros. Dentre estes, o (-)-mentol é o de maior ocorrência na natureza e possui um odor característico sendo amplamente usado como aromatizante em goma de mascar, pasta de dente e outros produtos de higiene. Também é empregado em formulações tópicas antisépticas, antipruríticas, de frescor e de anestésicos locais. Nas aplicações tópicas, a sensação de formigamento e frescor deve-se a sua atuação em receptores de frio, através da inibição de correntes de Ca^{2+} de membranas neuronais (ECCLES, 1994).

Apesar do mentol ser bastante utilizado em formulações analgésicas tópicas, só em 2002 foi publicado um estudo sobre seu efeito analgésico em modelos de dor. Neste trabalho, GALEOTTI e colaboradores estudaram sua eficácia como substância analgésica mostrando que seus efeitos são centrais e mediados através de uma ativação seletiva de κ - receptores opióides.

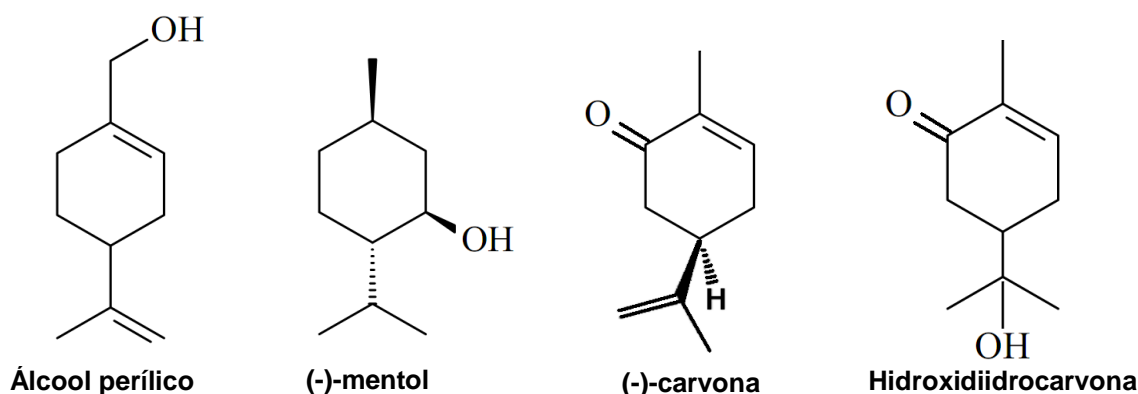


Figura 1 - Estrutura química do álcool perílico, mentol, carvona e hidroxidiidrocarvona

O álcool perílico (*p*-mentha-1,8-diene-7-ol) é um membro da família dos monoterpenos, com estrutura semelhante ao mentol (Figura 1), sendo encontrado em plantas dos gêneros *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, entre outros. Estudos demonstraram que o álcool perílico é citotóxico para uma grande variedade de células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*. Essas evidências apontam para a sua utilização no tratamento de câncer envolvendo seres humanos. Sendo considerado o agente anti-câncer mais potente entre os monoterpenos (MIRANDA, A. C. M. & QUEIROZ, V. T., 2007).

Diante da necessidade de descoberta de novas drogas que apresentem maior eficácia terapêutica e menos efeitos indesejáveis, e baseados nas semelhanças estruturais entre o (S)-(-)-álcool perílico (AP) e monoterpenos com esta atividade antinociceptiva central, no presente trabalho, investigamos o potencial antinociceptivo do AP em camundongos.

Fundamentação Teórica

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dor: Conceito e tipos

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente”. Ela é uma sensação descrita como sendo uma experiência multidimensional na qual estão envolvidos vários componentes: motivacional, aspecto emocional, sensório-discriminativo, afetivos e cognitivos (MERSKY, 1986). Uma grande parte dos episódios dolorosos é desencadeada por lesão tecidual e a reação natural do organismo ao trauma é protegê-lo, impedindo que uma destruição tecidual ainda maior ocorra, através da inflamação e, ao mesmo tempo, alertando o cérebro do perigo eminente através da sensação dolorosa (COOPER, 1990).

A dor caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, pois alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo ao surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível (WOOLF et al., 1999). Essa dor é classificada como aguda (TEIXEIRA et al., 2001). No entanto, quando a dor passa a se repetir ou sustentar-se por período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar sofrimento, sendo classificada como dor crônica a qual é gerada por impulsos de pequena magnitude produzidos por atividade neural anormal (MELZACK et al., 1999).

A dor crônica pode estar associada com a continuação da patologia ou persistir após a recuperação da doença ou lesão. Se a dor crônica for devido à doença orgânica, ela é efetivamente curada ao se tratar a desordem de base. Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, dolorida, contínua ou recorrente e é dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica (MERSKEY et al., 1994; SMITH et al., 1986; FÜRST, 1999).

A dor nociceptiva consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja térmico, químico ou mecânico. Nesta dor, ocorre ativação contínua das vias

centrais da dor e pode ser identificada, por exemplo, em pessoas com câncer (MILLAN, 1999).

Já a dor neuropática, segundo a IASP, é definida como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou Periférico (SNP). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores (GALLUZZI, 2007). Dor do membro fantasma e doenças como Diabetes mellitus e Parkinson são as principais causas da dor neuropática (BOWSHER, 1999).

A dor psicogênica, por sua vez, está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (FURST, 1999; MERSKEY, 1986).

2.2 Dor e Nocicepção

Os receptores da dor na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON, 1997). Enquanto que a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão. Portanto, dor seria o termo mais apropriado para o homem, enquanto que nocicepção seria mais indicado para animais experimentais (WALL & MELZACK, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001).

Vários mecanismos podem ser identificados no processamento neural dos sinais nocivos que levam a experiência de dor. O primeiro, na seqüência dos eventos que originam o fenômeno doloroso, é a transdução, ou seja, a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transmitidos para o SNC como mostra a Figura 2

(BESSON & PERL, 1969). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam às percepções centrais (SCHMELZ & PETERSEN, 2001).

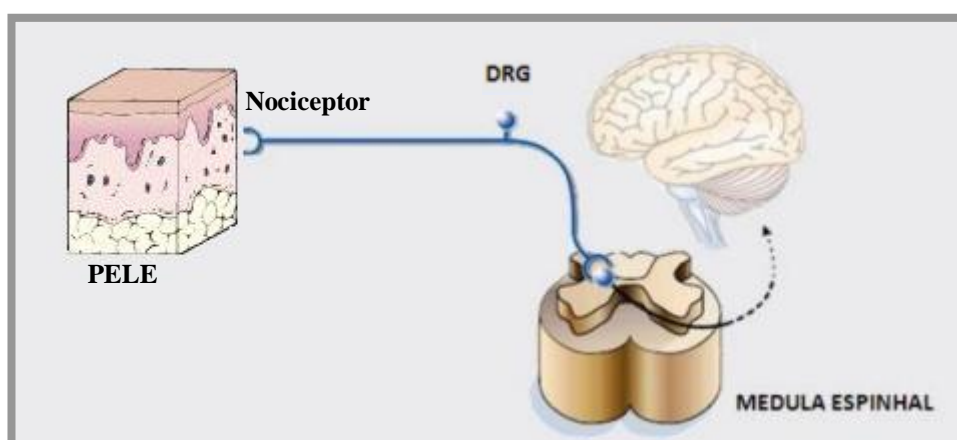


Figura 2 – Nociceptor e sua conexão com a medula e encéfalo

No processo de transdução, no caso da sensação dolorosa, ocorre uma amplificação dos eventos pela liberação local de uma grande variedade de substâncias químicas denominadas genericamente de substâncias algogênicas, que surgem em grande quantidade nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos. Essas substâncias incluem serotonina, bradicinina, noradrenalina, histamina, citocinas, substância P (SP), prostaglandinas e leucotrienos (MARQUEZ, 2004).

O segundo estágio no processamento dos sinais nociceptivos é a transmissão. Os nociceptores têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (figura 2), onde são retransmitidas mensagens através da liberação de mediadores como glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

(JEFTINIJA et al., 1991; LAWSON et al., 1997; LAWSON et al., 2002). A informação do estímulo nocivo é transmitida principalmente através de dois diferentes tipos de neurônios nociceptivos aferentes primários, que conduzem o estímulo em diferentes velocidades, caracterizados como fibras do tipo A δ e C (Figura 3).

As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação (Figura 3). As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s (MILLAN 1999; WALL & MELZACK 1999; JULIUS & BASBAUM 2001). As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (PLEUVRY & LAURETTI 1996; MILLAN 1999; JULIUS & BASBAUM 2001).

As fibras aferentes nociceptivas terminam predominantemente no corno dorsal da medula espinhal. Este é subdividido em seis camadas (lâminas de Rexed) distintas, de acordo com as características citológicas dos seus neurônios; ou seja, classes de neurônios aferentes primários que conduzem modalidades diferentes terminam em lâminas distintas do corno dorsal. Neurônios nociceptivos secundários (de projeção) estão localizados no corno dorsal superficial, na lâmina I e na lâmina II (substância gelatinosa). A maioria desses neurônios recebe informação sináptica de fibras A δ e C. Alguns neurônios da camada I respondem exclusivamente a estimulação nociva (neurônios nociceptivos específicos) e projetam-se para centros encefálicos superiores; outros respondem de forma gradual à estimulação mecânica nociva e não-nociva (neurônios de amplo espectro dinâmico). A lâmina II é formada quase exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem apenas a aferências nociceptivas, enquanto outros respondem também a estímulos não-nocivos. As lâminas III e IV estão localizadas ventralmente à substância gelatinosa e seus neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β . A lâmina V contém predominantemente neurônios de amplo espectro dinâmico que se projetam para o

tronco encefálico e para regiões do tálamo. Esses neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β e A δ , além das aferências de fibras C diretamente em seus dendritos ou indiretamente através de interneurônios excitatórios que, por sua vez, recebem diretamente aferências de fibras C. Muitos neurônios da lâmina V também recebem aferências nociceptivas de estruturas viscerais. Os neurônios da lâmina VI recebem aferências de fibras de grande diâmetro de músculos e articulações e respondem a estímulos não-nocivos nas articulações. Acredita-se que esses últimos neurônios não contribuem para a transmissão de informação nociceptiva (BASBAUM & JESSEL, 2000, ALMEIDA et al., 2004).

A informação nociceptiva é transmitida da medula espinhal para o tálamo e para o córtex por cinco vias ascendentes: os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico, espinohipotálamico (BASBAUM; JESSELL, 2000; PINTO, 2000).




Tipo de fibra	 A α e A β	 A δ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2 - 6 μ m	0.4 - 1.2 μ m
Velocidade de condução	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 3 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado de Julius & Basbaum, (2001).

A modulação é o terceiro aspecto do processamento do estímulo nocivo. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos e permitem que sinais nocivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos, modificando assim a transmissão do sinal para centros superiores. O sistema de modulação endógeno da dor consiste de inter-neurônios bem definidos dentro das camadas superficiais da medula espinhal e tratos neuronais descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006).

2.3 Teoria da comporta e controle central da dor

A teoria mais aceita para explicar a regulação da dor é a teoria da comporta. Foi proposta por Ronald MELZACK e Patrick WALL em 1965. Constitui-se em um modelo de percepção da dor no qual há uma regulação da passagem dos impulsos das fibras aferentes periféricas para o tálamo através dos neurônios de transmissão no corno dorsal. Ela funciona como uma estação regulatória para a transmissão da dor. Assim, a percepção da dor se dá pelo somatório da estimulação sensorial e um intenso controle central (Figura 4).

As fibras aferentes nociceptivas transmitem o impulso doloroso para o tálamo através de células transmissoras da dor localizadas no corno dorsal na medula espinhal, constituindo a via de transmissão da dor, a qual é controlada pelos neurônios da substância gelatinosa (SG). Neurônios inibitórios descendentes ou influxo aferente não-nociceptivo ativam os neurônios da SG os quais, por sua vez, inibem as células transmissoras da dor dificultando a passagem do impulso doloroso para os centros superiores. Já a estimulação das fibras C, inibe os neurônios inibitórios da SG (Figura 4), permitindo a passagem do impulso doloroso para o tálamo, constituindo-se então o processo de regulação da passagem do impulso doloroso para os centros superiores (YAKSH et al., 1994).

A teoria da comporta não aborda somente o aspecto sensorial da dor, mas também as variáveis psicológicas e sua influência na sensação dolorosa. Isso ocorre por meio de uma avaliação cognitiva e por informações de experiências anteriores que estão armazenadas em regiões corticais superiores ligadas ao componente motivacional. Alterações neste componente, principalmente na dor crônica, podem modificar as reações à dor mesmo não havendo mudanças no seu componente sensorial (BROTON et al., 1982).

Sabe-se que os impulsos dolorosos estão sujeitos a influências modulatórias centrais e que, em situações de estresse físico ou de grande concentração, os estímulos dolorosos são tolerados. Foi sugerida, então, a existência de um sistema fisiológico de controle central da dor. (URBAN et al., 1999).

O processo analgésico ocorre pela estimulação de vários locais como a substância cinzenta periaquedutal (SCPV), locus coeruleus (LC) e o bulbo raquidiano ventromedial rostral (BRVMR), que inclui o núcleo magno da rafe (NMR). Projeções diretas conectam o córtex pré-frontal e insular, o hipotálamo, a amígdala e o tronco cerebral à SCPV. Esta se liga ao NMR no BRVMR o qual, por sua vez, projeta-se para o corno dorsal da medula. O BRVMR é a maior fonte de neurônios do tronco cerebral para o corno dorsal, principalmente para as lâminas I, II e V (FIELDS et al., 1999; URBAN et al., 1999). Deste modo, a estimulação da SCPV provoca excitação dos neurônios do BRVMR que, por sua vez, liberam neurotransmissores, como serotonina e encefalina, os quais vão inibir as respostas nociceptivas dos neurônios do corno dorsal, provocando assim uma diminuição das respostas à dor (BASBAUM et al., 2000).

Existe também a via noradrenérgica proveniente do locus coeruleus, que possui como principal agonista a noradrenalina (FRITSCHY et al. 1987; CLARK et al., 1991). Esta exerce um efeito inibitório sobre a transmissão da dor no corno dorsal (BELCHER et al., 1978).

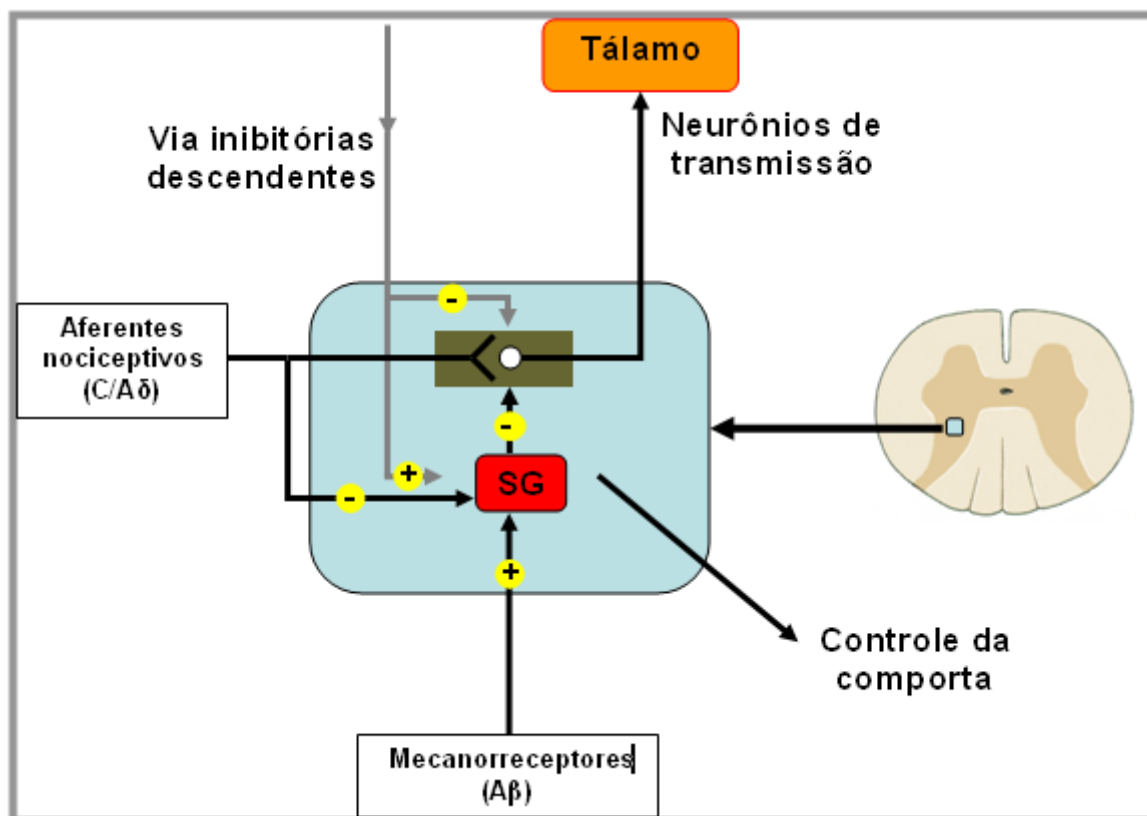


Figura 4 – Diagrama esquemático do sistema de controle da comporta

2.4 Considerações gerais sobre drogas analgésicas

Analgesia é o termo empregado para o alívio ou o cessar da sensação dolorosa sem, no entanto, ocorrer à perda da consciência. As substâncias capazes de causar analgesia são designadas por analgésicos, os quais podem ser divididos, de maneira geral, em analgésicos periféricos, fármacos adjuvantes e os de ação central (BRAINER-LIMA, 1997; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Os analgésicos periféricos são representados pelos anti-inflamatórios não-esteroidais, também conhecidos por analgésicos não-opioides. O seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da produção de prostaglandinas através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) no local de lesão, diminuindo assim a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico (WELCH; MARTIN, 2005).

Os analgésicos dessa classe diminuem a produção de prostaglandinas e leucotrienos que sensibilizam os receptores da dor para a ação de substâncias liberadas durante a lesão. Os vários agentes desta classe diferem entre si quanto à potência anti-inflamatória, cinética e efeitos colaterais. Embora não causem dependência psíquica, podem provocar alterações gástricas, hepáticas e renais, reações alérgicas e alterações hematológicas (SAKATA & GOZZANI, 1994).

O AAS é um dos anti-inflamatórios não-esteroidais mais utilizados, visto que diminui a dor em locais predominantemente periféricos, com pouca interação cortical, apresentando conseqüentemente poucos efeitos sobre o SNC. Fazem ainda parte dessa classe de fármacos a indometacina, o piroxicam e o diclofenaco (WELCH; MARTIN, 2005).

Vários outros fármacos adjuvantes são usados como analgésicos, particularmente para tratar estados dolorosos neuropáticos, que respondem mal aos analgésicos convencionais e trazem importantes problemas clínicos. Esse grupo inclui o seguinte:

Antidepressivos tricíclicos, particularmente imipramina e amitriptilina. Estes fármacos atuam centralmente, inibindo captura da noradrenalina e são altamente eficazes em aliviar dor neuropática em alguns casos, mas não em todos, sua ação é independente de seus efeitos antidepressivos.

Antiepilépticos, como a carbamazepina, gabapentina e, ocasionalmente, a fenitoína são algumas vezes eficazes na dor neuropática. A carbamazepina e a fenitoína atuam sobre os canais de sódio controlados por voltagem. O alvo para a gabapentina é a subunidade $\alpha_2\delta$ do canal de cálcio do tipo L.

A lidocaína intravenosa pode dar alívio prolongado em estados de dor neuropática. Provavelmente, atua bloqueando descargas espontâneas de terminações nervosas sensitivas lesadas, mas não está clara a razão para seu efeito analgésico persistente (RANG et al., 2007).

Os opióides, cujo principal representante é a morfina, podem modificar tanto os aspectos sensitivos da dor quanto o emocional. Agem através da ligação a receptores específicos no SNC e periférico, inibindo a nocicepção. O mecanismo de ação destas substâncias, no processo nociceptivo, ocorre pela interação destas com

receptores opióides, levando ao fechamento de canais para cálcio voltagem-dependentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, o que reduz a liberação de neurotransmissores, além disso, a ativação desses receptores leva a abertura de canais de potássio Ca^{2+} -dependentes, produzindo hiperpolarização da membrana celular de neurônios pós-sinápticos, reduzindo a liberação de neurotransmissores, a exemplo da substância P, pelos terminais centrais do neurônio aferente primário. Estes agonistas atuam ainda ativando as vias inibitórias descendentes (DICKENSON, 1997; GRAEFF; GUIMARÃES, 2000).

Foram identificadas cinco classes de receptores opióides em vários locais do SNC e em outros tecidos. As principais classes incluem receptores μ , κ e δ . Em nível molecular, todos são membros da família de receptores acoplados à proteína G, e, portanto, capazes de afetar a regulação iônica, o processamento do Ca^{2+} intracelular e a fosforilação de proteínas. Foi sugerida a existência de diversos subtipos de receptores opióides; atualmente, os mais caracterizados por critérios farmacológicos incluem μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 , κ_1 , κ_2 e κ_3 (WAY; FIELDS; SCHUMACHER, 2003).

Outros tipos de receptores como os serotoninérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e adrenérgicos estão envolvidos no processo de analgesia, sendo que esses receptores respondem ao tratamento com opióides (PINTO, 2000).

O uso de fármacos opióides no tratamento de quadros de dor é limitado pela intensa quantidade de efeitos colaterais graves que essas substâncias causam nos pacientes, dentre esses efeitos indesejáveis, merecem mais atenção à tolerância, dependências física e psíquica, além de náuseas e vômitos (DELGADO, 2000).

Justificativa

III. JUSTIFICATIVA

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos. (ROCHA et al., 2007).

A procura por constituintes ativos de plantas representa um grande potencial para a descoberta de substâncias que atuem em processos patológicos acompanhados de dor.

Em virtude dos vários efeitos indesejáveis graves advindos do tratamento com os fármacos analgésicos atuais, os farmacologistas pesquisam incessantemente novas substâncias que apresentem atividade antinociceptiva central que possam ser utilizadas na terapêutica, e que sejam desprovidas de efeitos adversos e/ou colaterais graves apresentados por estes fármacos e com melhor resposta farmacológica. Portanto, nesse contexto, se insere o estudo da atividade antinociceptiva do (S)-(-)-álcool perílico em camundongos.

Objetivos

IV. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Estudar a possível atividade antinociceptiva do monoterpeno (S)-(-)-álcool perílico em camundongos.

4.2 Específicos

- Determinar a dose letal 50% do álcool perílico em camundongos por via intraperitoneal;
- Investigar o possível efeito antinociceptivo decorrente do tratamento agudo com este monoterpeno, que possa ter indicação de atividade no SNC através de modelos animais;
- Contribuir para o aumento do conhecimento farmacológico a cerca de produtos naturais, em especial, os óleos essenciais.

Material e métodos

V. MATERIAL

5.1 Animais

No desenvolvimento do presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos albinos da linhagem *Suíça*, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 a 35 g (Figura 5), provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George (BTG) do LTF / UFPB.

No biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos cada, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo *pellets* (Purina) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.



Figura 5 – Camundongos machos albinos da linhagem *Suíça*

5.1.1 Condições experimentais

Os testes foram realizados na sala 3 (Setor de experimentação comportamental) do BTG, onde os animais foram previamente 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 ao novo ambiente. Os camundongos foram privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

Antes de cada procedimento a bancada foi limpa com etanol 70%, entretanto, durante os testes foi utilizado etanol de baixa graduação (10%). Os experimentos foram executados no período compreendido entre às 12:00 e 17:00 horas, sendo os animais utilizados uma única vez e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo CEPA - Comitê de Ética para Uso de Animais do LTF / UFPB, sob a certidão N° 0505/08.

5.2 Substâncias utilizadas

- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Cloridrato de morfina (Merck – E. U. A.);
- Etanol (LTF / UFPB – Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil).
- (S)-(-)-álcool perílico, 96% (AP) (Sigma-Aldrich);
- Tween 80 (Vetec – Brasil).

5.3 Preparação do álcool perfílico

O (S)-(-)-álcool perfílico, 96%, foi obtido da empresa Sigma Aldrich Chemical Co. (U.S.A), sendo cordialmente cedido pelo Dr. Damião Pergentino de Sousa da Universidade Federal de Sergipe.

Imediatamente antes da realização dos testes, AP foi dissolvida em água destilada, com auxílio de uma gota de tween 80, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do animal.

5.4 Aparelhagem

5.4.1 Aparelho do rota-rod

O modelo do aparelho do rota-rod utilizado foi o EFF 412 – Rota-Rod para camundongos - Insight (Figura 6). Constituído de uma barra giratória não escorregadia, com 45 cm de altura, 54 cm de largura e 35 cm de comprimento, dividida em quatro compartimentos iguais, separados por cinco discos plásticos, com velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.). Este aparelho ainda dispõe de um mecanismo automático capaz de contabilizar o tempo de permanência do animal na barra giratória.



Figura 6 – Aparelho do rota-rod para camundongos.

5.4.2 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 dá ao observador um maior campo de visão (Figura 7).



Figura 7 – Caixa de observação para o teste da formalina.

5.4.3 Aparelho de placa quente

O modelo do aparelho utilizado foi o HOT PLATE LE 7406, do fabricante L Si Letica - Scientific Instruments (Panlab S.L. - Espanha), que permite avaliar a atividade de drogas antinociceptivas por meio de um aparelho cuja temperatura de sua placa, localizada na superfície superior, pode ser controlada entre 45 e 62 °C, em incrementos de 1 °C. Neste aparelho, um cronômetro acoplado era ativado por um pedal externo, que permitia a medida precisa do tempo de reação do animal ao estímulo térmico. Acoplado à placa, havia um cilindro de

acrílico transparente, que isolava o animal para observação sobre o aparelho (Figura 8).

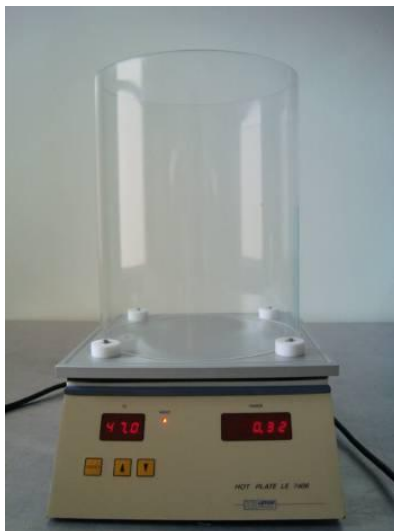


Figura 8 – Aparelho de placa quente.

VI. MÉTODOS

Os métodos utilizados para o estudo de AP em camundongos estão esquematizados na figura abaixo.

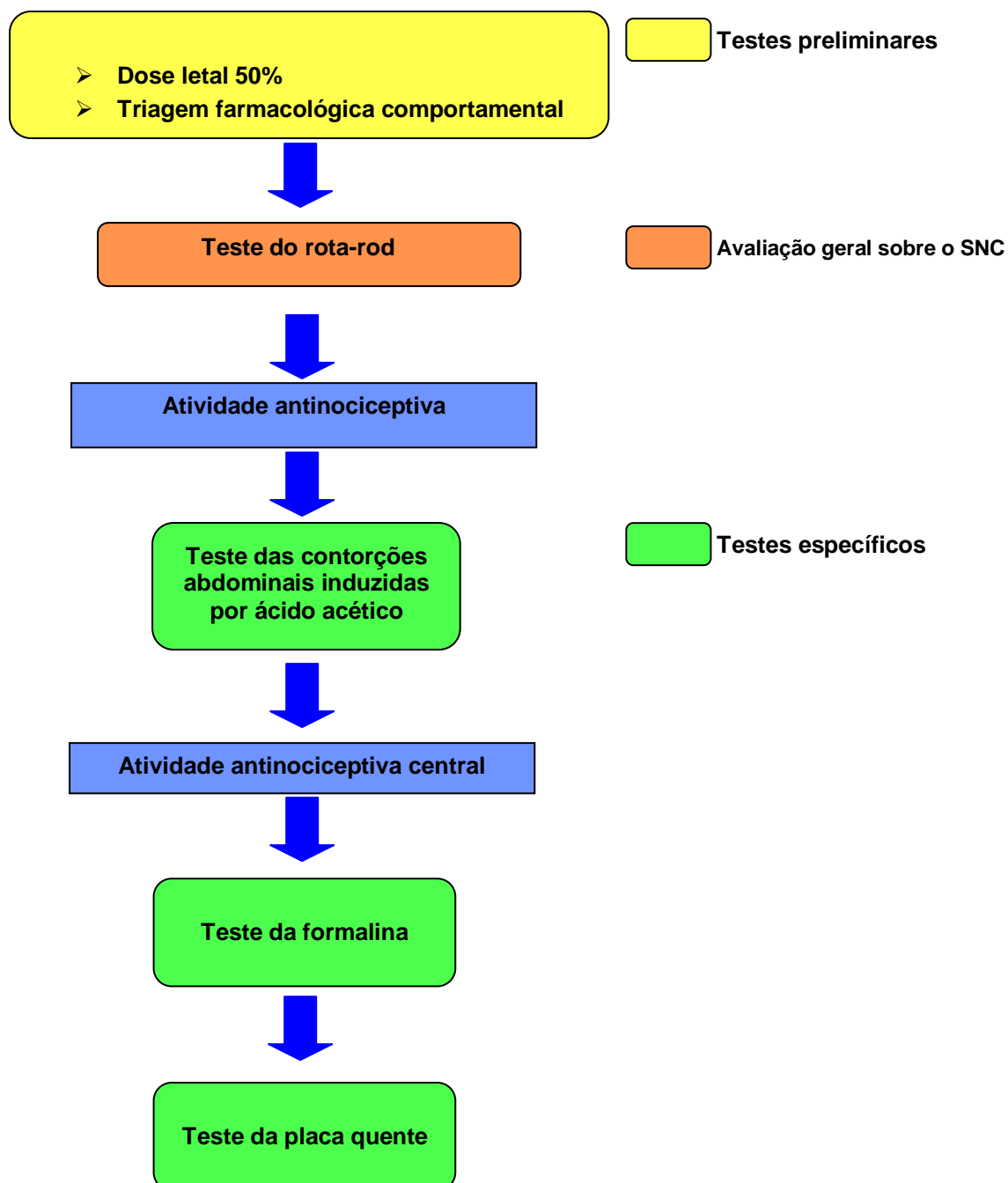


Figura 9 – Resumo esquemático do estudo da atividade antinociceptiva de AP em camundongos.

6.1 TESTES PRELIMINARES

Segundo ALMEIDA (2006), o teste para avaliar a toxicidade aguda compreende uma etapa que antecede os ensaios farmacológicos, sendo desenvolvido com o objetivo de obter dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância e seus efeitos adversos num organismo submetido a tratamento de curta duração.

Respeitando o aspecto de racionalização do uso de animais, o que está em concordância com os princípios éticos que norteiam pesquisas envolvendo animais de laboratório como sujeitos experimentais, bem como a redução da quantidade de droga utilizada, procedemos a realização da determinação da dose letal 50% (DL₅₀) juntamente com a triagem farmacológica comportamental.

6.1.1 Determinação da dose letal 50%

A determinação da dose letal 50% (DL₅₀) possibilita investigar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias e extratos, determinando a dose responsável pela morte de 50% dos animais em estudo (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949), permitindo a realização dos testes farmacológicos utilizando doses seguras (GRACIOSO et al., 1998).

Para a realização desse teste, grupos de oito camundongos foram tratados com doses crescentes de AP por via i.p.: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/kg. Após os tratamentos, os camundongos foram colocados em caixas de polietileno, em grupos de quatro animais cada e observados por um período de 4 horas. Em seguida, os animais receberam água e comida, sendo observados por período de até 72 horas para o registro de possíveis mortes.

6.1.2 Triagem farmacológica comportamental

Neste estudo, são estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. De forma que, ocorrendo alterações comportamentais em decorrência de tratamentos, é possível inferir uma relação com atividade no SNC (ALMEIDA et al., 1999).

Para tanto, cinco grupos de oito camundongos foram utilizados, sendo 4 grupos tratados com AP por via i.p., nas doses de 50, 100, 200, 300 mg/kg. Esses animais foram comparados com os animais do grupo controle que receberam o veículo utilizado nas preparações. A observação dos parâmetros comportamentais foi feita até os primeiros 30 minutos e com 1h, 2h, 3h e 4h após os tratamentos, onde os efeitos ocorridos, foram registrados de acordo com a metodologia descrita por ALMEIDA et al., 1999, (Quadro 1).

Essa metodologia possibilita o direcionamento do estudo farmacológico para utilização de testes que levem à caracterização de um efeito específico (FRANCO, 2003).

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					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Quadro 1 – Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental. Fonte: ALMEIDA et al., 1999.

6.2 AVALIAÇÃO GERAL SOBRE O SNC

6.2.1 Teste do rota-rod

O teste da barra giratória (rota-rod) foi proposto por DUNHAM e MIYA (1957). É apropriado para detectar o efeito de relaxamento muscular ou de incoordenação motora produzido por agentes farmacológicos, tais como relaxantes musculares esqueléticos ou depressores do SNC, como os ansiolíticos (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANÇA, 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 (MATTEI; FRANÇA, 2006).

Vinte e quatro horas antes do teste, foi realizada uma pré-seleção dos animais (sem administração de substâncias) na qual foram considerados aptos ao teste os animais que permaneceram na barra giratória (7 r.p.m.) durante 3 minutos, em pelo menos uma das 3 tentativas (MENDES; MATTEI; CARLINI, 2002; DE SOUSA et al., 2007b).

No dia do teste, os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e, inicialmente, foi realizada uma leitura basal. Os camundongos foram colocados na barra giratória e o tempo de permanência dos mesmos no aparelho (com até 3 tentativas) foi cronometrado. Em seguida, os animais foram tratados nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg de AP e o grupo controle recebeu Tween 80 a 5%. Após 30 minutos da administração, os animais foram colocados no aparelho. Este procedimento foi repetido com 60 e 120 minutos após a administração.

6.3 TESTES ESPECÍFICOS

6.3.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

6.3.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal do ácido acético a 0,85% provoca irritação dos tecidos dessa área envolvendo a estimulação de nociceptores que gera reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores.

Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. Embora a especificidade do modelo não seja alta, ele ainda é um dos meios mais utilizados para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos de extratos e compostos isolados (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959).

Para este experimento, cinco grupos de 8 camundongos receberam por via i.p. os seguintes pré-tratamentos: veículo, 50, 75 e 100 mg/kg de AP, além de um grupo que recebeu a droga padrão, morfina (6 mg/kg).

Transcorridos 30 minutos dos tratamentos iniciais, os animais foram tratados com solução de ácido acético 0,85% em água destilada (0,1 mL/10 g) por via i.p. e colocados em caixas de polietileno individuais, sendo então contabilizado o número de contorções abdominais apresentado por cada animal durante 10 minutos de observação. Uma redução significativa do número de contorções quando comparada ao grupo controle foi considerada como uma resposta antinociceptiva (NARAYANAN et al., 2000; BASTOS et al., 2006).

6.3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA CENTRAL

6.3.2.1 Teste da formalina

O teste da formalina foi conduzido como descrito por VAZ et al. (1996), que representa uma modificação do modelo original de HUNSKAAR, FASMAR e HOLE (1985) e SANTOS et al., (1995).

Nessa metodologia, uma solução de formalina é injetada na região subplantar do camundongo, o que leva à estimulação dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata considerado indicativo de resposta nociceptiva (SOUZA et al., 2000). São observadas duas fases em que é quantificado o tempo de lambida da pata. A primeira fase, normalmente ocorre durante os 5 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. A segunda fase (15-30 minutos) é conhecida principalmente por uma resposta inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Cinco grupos de 8 camundongos receberam os seguintes tratamentos por via i.p.: veículo, 50, 75 e 100 mg/kg de AP, e morfina (10 mg/kg). Após 30 minutos pós-tratamentos, 20 μ L de solução de formalina 2,5%, que consiste em 0,92% de formaldeído em solução, foram injetadas na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos. Em seguida, esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo de lambida da pata que recebeu a formalina durante 5 minutos (1ª fase). Após um período de 10 minutos (interfase), novamente contabilizou-se o parâmetro citado por mais 15 minutos (2ª fase) como mostra a Figura 10.



Figura 10 – Aspecto geral de um procedimento do teste da formalina. (Foto de Fernando de Sousa Oliveira)

6.3.2.2 Teste da placa quente

Este teste, descrito por EDY e LEIMBACK (1953), representa uma modificação do modelo original de WOOLFED e MACDONALD (1944). Consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, do momento em que o animal é colocado em uma placa quente a $55,0 \pm 1$ °C até apresentar o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas, sendo essas respostas indicativas de nocicepção. Os animais foram submetidos a uma seleção (resposta de até 15s) e permaneceram na placa por um tempo máximo de 30 segundos para evitar dano tecidual (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Cinco grupos de 8 camundongos receberam os seguintes tratamentos por via i.p.: veículo, 50, 75 e 100 mg/kg de AP, e morfina (10 mg/kg). Foi feita a leitura basal e 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos, os animais foram colocados no aparelho de placa quente, sendo registrado o parâmetro citado.

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA, seguido do Teste de Dunnett. A determinação da dose letal 50% foi calculada por regressão não-linear. Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism versão 4,02. Os valores obtidos, exceto os da DL₅₀, foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05$.

Resultados

VII. RESULTADOS

7.1 TESTES PRELIMINARES

7.1.1 Determinação da dose letal 50%

O AP nas doses de 50, 100, 200 mg/kg não promoveu mortalidade dos camundongos. No grupo de animais tratado com 300 mg/kg, foi observado 63% de mortes. Já o grupo administrado com 400 mg/kg, 88% dos camundongos morreram, enquanto que, na dose de 500 mg/kg registrou-se 100% de letalidade. Com tais resultados, foi possível calcular, por regressão não-linear, a DL_{50} de AP em camundongos, por via i.p., sendo essa estimada em 281,3 mg/kg com limite de confiança de 242,1 – 326,9 mg/kg.

7.1.2 Efeito do álcool perílico na triagem farmacológica comportamental

As alterações comportamentais apresentadas pelos camundongos tratados com AP em relação ao grupo controle são mostradas no quadro 1. Na dose de 50 mg/kg, foram observados diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, diminuição da ambulação, até 30 minutos após o tratamento, sendo que diminuição da resposta ao toque e da ambulação persistiram até os 60 minutos de observação. Aos 120, 180 e 240 minutos não foram observados efeitos comportamentais decorrentes do tratamento.

Os animais que receberam 100 mg/kg de AP, após 30 minutos, apresentaram sedação, analgesia, diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, diminuição da ambulação, diminuição na limpeza, diminuição no ato de levantar e escalar. Analgesia, resposta ao toque diminuída, diminuição da ambulação, limpeza, levantar, escalar, continuaram até os 60 minutos. Aos 120, apenas analgesia foi observada e nenhum efeito foi observado aos 180 e 240 minutos do tratamento.

Na dose de 200 mg/kg, observou-se, aos 30 e 60 minutos, sedação, analgesia, diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, diminuição na ambulação, limpeza, levantar, escalar. Analgesia, diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, ambulação, foram observados aos 120 minutos e apenas a diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular permaneceram após 180 minutos e nenhuma alteração foi observada aos 240 minutos.

No tratamento com 300 mg/kg, os camundongos apresentaram aos 30 e 60 minutos de observação, analgesia, sedação, diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, diminuição da ambulação, limpeza, levantar, escalar. Aos 120, todas estas alterações foram registradas, com exceção apenas da sedação. Com 180 minutos, observou-se, analgesia, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular e em 240 minutos da administração do AP, não foram observados alterações comportamentais.

Com a análise desses dados, é possível sugerir que os camundongos tratados com AP apresentaram alterações comportamentais sugestivas de atividade depressora do SNC.

Dose (mg/Kg, i.p.)	Tempo (min)	Efeitos observados
AP-50	Até 30	(+) Resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação
	60	(+) Resposta ao toque diminuída, (-) ambulação
	120	Ausência de alterações comportamentais
	180	Ausência de alterações comportamentais
	240	Ausência de alterações comportamentais
AP-100	Até 30	(+) Analgesia, (+) sedação, (+) resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	60	(+) Analgesia, (+) resposta ao toque diminuída, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	120	(+) Analgesia
	180	Ausência de alterações comportamentais
	240	Ausência de alterações comportamentais
AP-200	Até 30	(+) Analgesia, (+) sedação, (+) resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	60	(+) Analgesia, (+) sedação, (+) resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	120	(+) Analgesia, (+) resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação
	180	(+) Resposta ao toque diminuída, (+) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular
	240	Ausência de alterações comportamentais
AP-300	Até 30	(+) Analgesia, (+) sedação, (+) resposta ao toque diminuída, (++) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	60	(+) Analgesia, (+) sedação, (++) resposta ao toque diminuída, (++) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	120	(+) Analgesia, (+) resposta ao toque diminuída, (++) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular, (-) ambulação, (-) limpeza, (-) levantar, (-) escalar
	180	(+) Analgesia, (+) resposta ao toque diminuída, (++) perda do reflexo corneal, (+) perda do reflexo auricular
	240	Ausência de alterações comportamentais

Quadro 2 – Principais alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração de diferentes doses de AP. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso]. (n=8).

7.2 AVALIAÇÃO GERAL SOBRE O SNC

7.2.1 Teste do rota-rod

Neste teste, não houve nenhuma alteração significativa na coordenação motora dos animais tratados com as três doses, 50, 75 e 100 mg/kg, de AP, como mostra o Gráfico 1. Após 30 minutos de tratamento, o tempo de permanência na barra giratória foi de $172,6 \pm 3,2$, $165,8 \pm 11,8$, $173,3 \pm 4,5$ segundos, respectivamente, enquanto o controle permaneceu por $178,0 \pm 1,4$ segundos. Aos 60 e 120 minutos os resultados foram semelhantes, $180,0 \pm 0,0$, $171,0 \pm 6,1$, $180,0 \pm 0,0$ e $180,0 \pm 0,0$, $162,1 \pm 10,6$, $180,0 \pm 0,0$, segundos, respectivamente, com o tempo do controle sendo $176,6 \pm 1,7$ e $167,6 \pm 10,4$ segundos.

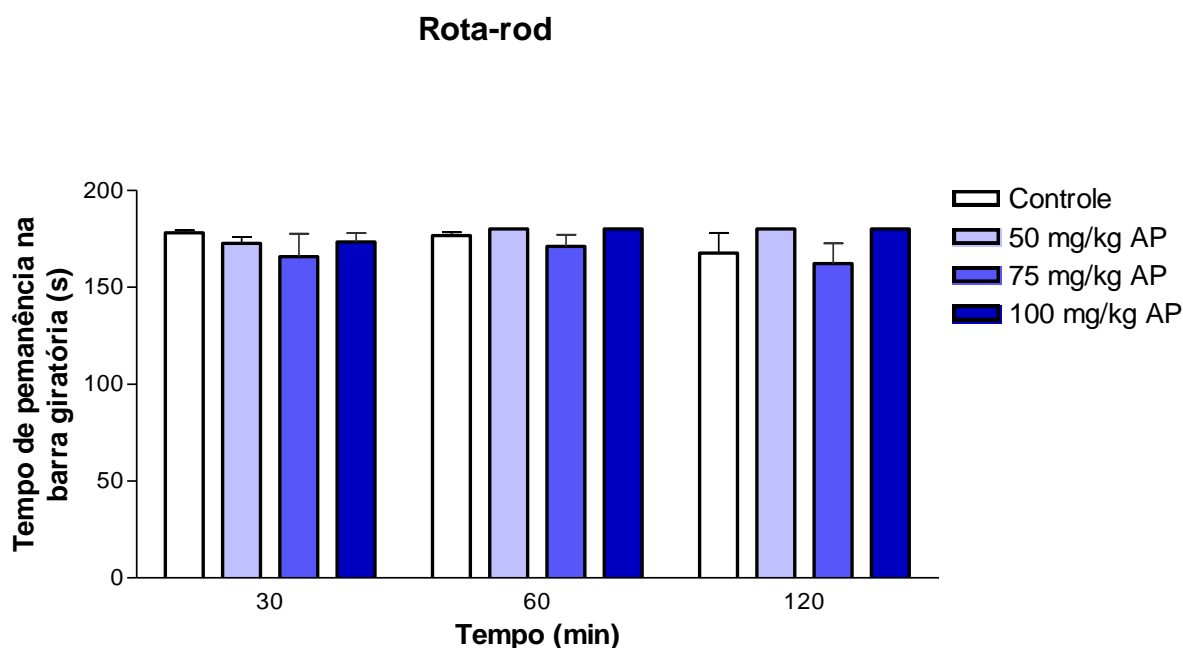


Gráfico 1 – Efeito do AP via i.p., sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste do rota-rod. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=8), ANOVA - Teste de Dunnett.

7.3 TESTES ESPECÍFICOS

7.3.1 Estudo da atividade antinociceptiva

7.3.1.1 Efeito do AP no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Neste teste, os resultados mostraram que em todos os grupos tratados com AP, ocorreu diminuição do número de contorções abdominais, quando comparados ao controle que apresentou $21,4 \pm 4,1$ contorções, obtendo-se as seguintes médias: 50 mg/kg ($7,9 \pm 3,0$), 75 mg/kg ($4,8 \pm 1,7$) e 100 mg/kg ($1,4 \pm 0,5$), dessa forma apresentando resultados semelhantes ao da morfina com $0,4 \pm 0,3$ de contorções, conforme o gráfico 2.

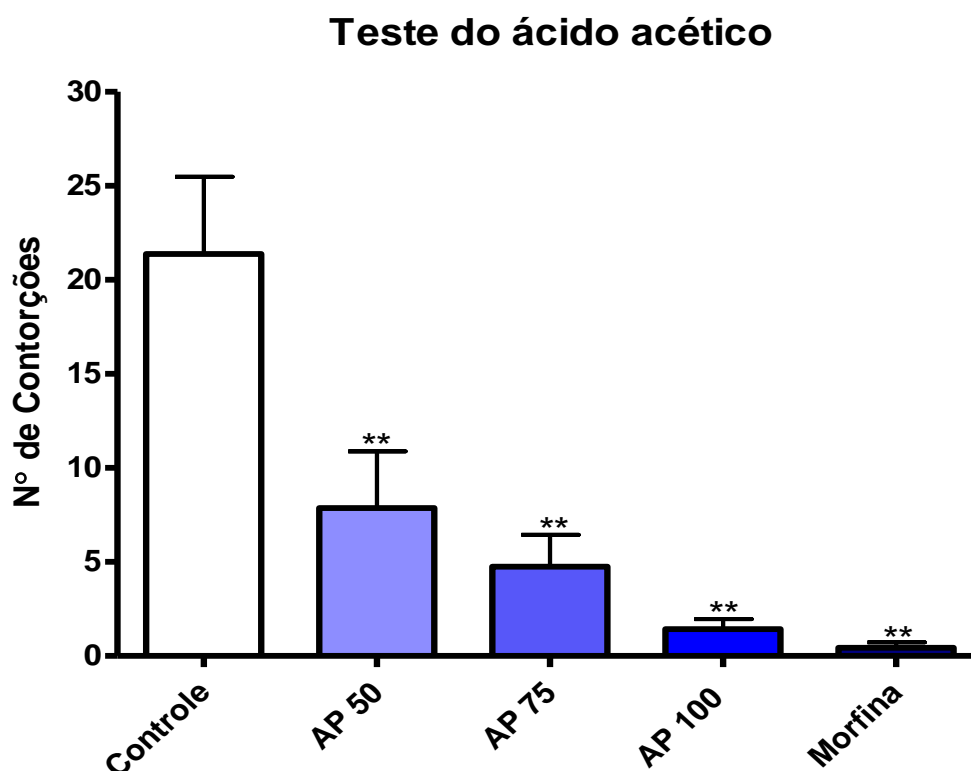


Gráfico 2 – Efeito do AP no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos, via i.p. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=8) **p< 0,01 vs grupo controle (ANOVA - Teste de Dunnett).

7.3.2 Estudo da atividade antinociceptiva central

7.3.2.1 Efeito da AP no teste da formalina

7.3.2.1.1 Primeira fase

Com base no gráfico 3, os camundongos tratados com 50, 75 e 100 mg/kg de AP demonstraram redução significativa do tempo de lambida da pata com $56,3 \pm 3,0$; $67,0 \pm 5,7$ e $44,9 \pm 4,3$ segundos, respectivamente, em relação ao controle ($94,9 \pm 8,2$), na primeira fase do teste da formalina. Dessa forma, obteve-se resultados semelhantes ao grupo padrão tratado com morfina $36,5 \pm 5,6$.

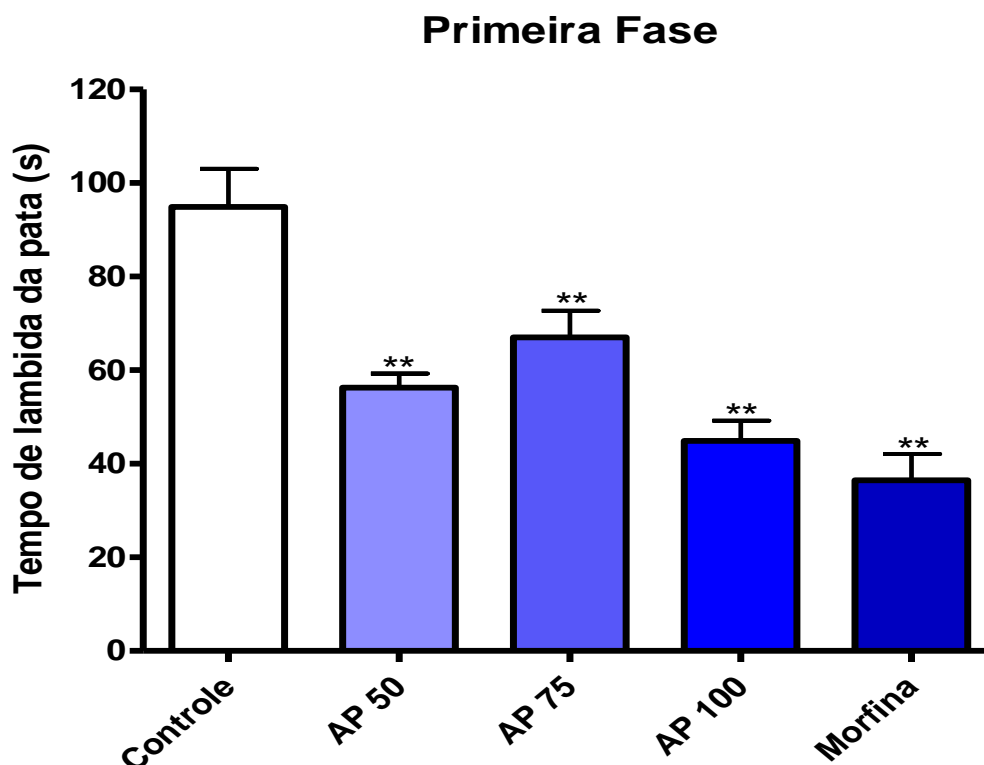


Gráfico 3 – Efeito do AP na primeira fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=8), ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ANOVA - Teste de Dunnett).

7.3.2.1.2 Segunda fase

Conforme os resultados apresentados no gráfico 4, o AP diminuiu o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina nas doses de 50 ($95,4 \pm 25,6$), 75 ($154,3 \pm 28,7$) e 100 mg/kg ($74,5 \pm 25,5$), quando comparada ao grupo controle ($271,1 \pm 32,5$). A morfina também produziu redução significativa ($11,8 \pm 3,4$) em relação ao controle.

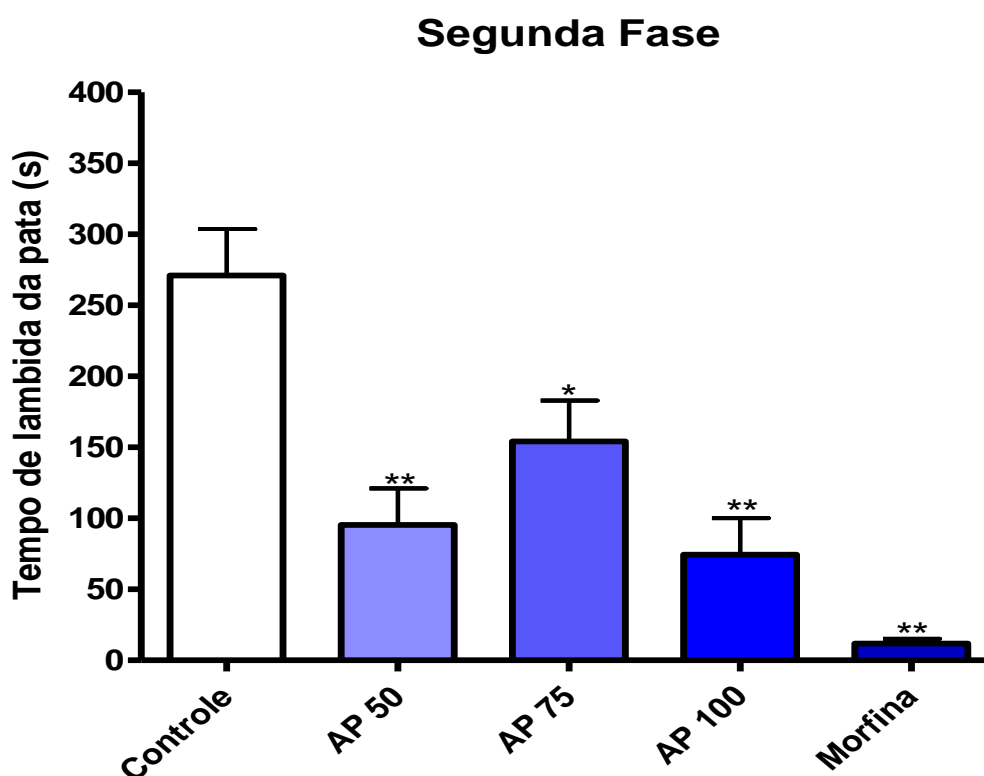


Gráfico 4 – Efeito do AP na segunda fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=8), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ANOVA - Teste de Dunnett).

7.3.2.2 Efeito da AP no teste da placa quente

De acordo com o gráfico 5, o AP foi capaz de aumentar o tempo de latência (em segundos) dos animais no estímulo térmico da placa quente após 30 minutos de sua administração, de maneira dose dependente. Tanto as doses de 50 ($10,9 \pm 1,5$) e 75 ($11,9 \pm 0,9$), quanto à de 100 mg/kg ($13,7 \pm 2,6$), prolongaram a permanência dos camundongos no aparelho de forma significativa, quando comparados ao grupo controle ($4,4 \pm 0,9$). O mesmo ocorrendo com a droga padrão, morfina ($17,7 \pm 2,7$). Aos 60 e 120 minutos, apenas a morfina ($16,5 \pm 3,4$ e $12,3 \pm 2,5$ segundos, respectivamente) manteve o efeito descrito, quando comparada ao controle ($3,9 \pm 0,5$ e $5,4 \pm 0,9$ segundos, respectivamente).

Teste da placa quente

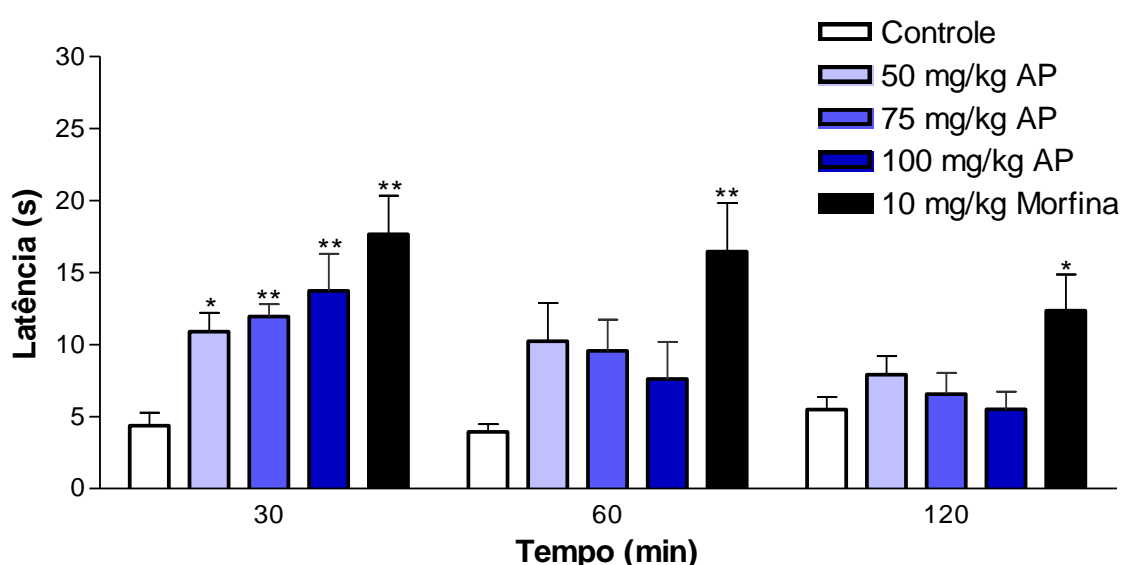


Gráfico 5 – Efeito do AP no teste da placa quente em camundongos tratados via i.p. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=8), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (ANOVA - Teste de Dunnett).

Discussão

VIII. DISCUSSÃO

O interesse quanto ao estudo da atividade antinociceptiva do (S)-(-)-álcool perílico foi baseado na sua semelhança estrutural com monoterpenos que apresentaram esta mesma atividade, quando submetidos a protocolos comportamentais utilizando roedores. Entre eles, o (-)-mentol (GALEOTTI et al., 2002), (-)-linalol (PEANA et al., 2003), rotundifolona (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996), e (-)-carvona (GONÇALVES et al., 2008).

Este estudo consistiu da determinação da DL₅₀, triagem farmacológica comportamental, testes gerais e testes específicos para avaliar a atividade antinociceptiva.

A determinação da DL₅₀ foi realizada juntamente com a triagem farmacológica comportamental, respeitando os princípios éticos de racionalização do uso de animais de laboratório. Dessa forma, os animais receberam as doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg i.p. e foram submetidos à avaliação de efeitos sugestivos de atividade sobre o SNC e/ou SNA (ALMEIDA, 1999), os animais foram mantidos sobre observação por um período de 72 h para contabilização do número total de mortes. As doses de 400 e 500 mg/kg foram também administradas, sendo observado apenas o total de mortes após 72 h. As cinco doses citadas foram utilizadas para a determinação da dose letal 50%.

A DL₅₀ do AP por via i.p. foi de 281,3 mg/kg com limite de confiança de 242,1 – 326,9 mg/kg. A determinação da toxicidade aguda (DL₅₀) teve o objetivo de avaliar os seus possíveis efeitos tóxicos, e estabelecer doses seguras que poderiam ser utilizadas nos ensaios subsequentes, evitando assim que doses tóxicas pudessem ser administradas e os efeitos observados não fossem fidedignos em relação à real ação psicofarmacológica da substância em estudo.

Com exceção da triagem farmacológica, em todos os experimentos comportamentais, as doses de 50, 75 e 100 mg/kg foram testadas.

A triagem farmacológica comportamental é um teste preliminar de fácil execução e capaz de detectar, de forma qualitativa, algumas importantes ações centrais (ALMEIDA et al., 1999). Neste teste, as doses de AP citadas acima

provocaram alterações comportamentais sugestivas de substâncias que reduzem a atividade do SNC, entre elas, a diminuição da ambulação, sedação, diminuição da resposta ao toque e antinocicepção/analgesia.

A diminuição da ambulação em camundongos é talvez a forma mais comum de verificar se uma substância analisada apresenta efeito depressor do SNC, porém, é muito temerário utilizar apenas esse parâmetro para classificar uma droga. A sedação é um grau de depressão do SNC que se caracteriza por sonolência, relaxamento, serenidade e diminuição da atividade motor, sem perda de consciência. Diminuição da resposta ao toque consiste na demora da reação do animal quando submetidos a estímulos apropriados, podendo indicar um estágio elevado de depressão do SNC. Uma redução da resposta a estímulos mecânicos sugere uma atividade antinociceptiva ou analgésica. (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Observado um possível efeito depressor do SNC a partir da triagem farmacológica, o passo seguinte do estudo foi a realização do teste geral do rota-rod, que avalia o efeito de relaxamento muscular ou de incoordenação motora provocado pelas drogas. Quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra giratória (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANÇA, 2006). Trata-se de um método não-específico, sendo utilizado para descartar a possibilidade de resultados falso-positivos nos testes subseqüentes, uma vez que avalia a integridade do sistema motor, permitindo detectar enfraquecimento neurológico, incluindo ataxia e relaxamento muscular, efeitos característicos da neurotoxicidade (DUNHAM; MIYA, 1957; DALLMEIER; CARLINI, 1981; MATTEI; FRANÇA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

De acordo com os resultados obtidos, a possível ação depressora do AP, não interfere na coordenação motora dos camundongos, uma vez que os animais submetidos ao teste do rota-rod não apresentaram alteração no tempo de permanência na barra giratória nas observações procedidas, descartando, assim, a possibilidade de um efeito miorrelaxante ou neurotóxico.

A partir de então, seguiu-se a avaliação da atividade específica do tipo antinociceptiva do AP. Em um artigo de revisão (ALMEIDA et al., 2001) envolvendo a atividade analgésica de plantas estudadas e publicadas nas revistas *Phytomedicine*, *Fitoterapia*, *Planta Médica*, *Journal of Ethnopharmacology* e

Phytotherapy Research, mostrou que mais de 66 trabalhos foram publicados, abordando o uso de extratos obtidos de plantas, em roedores. Para avaliar a atividade analgésica, 42,1% dos trabalhos utilizaram as contorções abdominais induzida por ácido acético, 18,7 % dos trabalhos o teste da formalina e 17,9 % utilizaram o teste da placa quente (CARLINI et. al., 2003).

Portanto, neste estudo, a atividade antinociceptiva do AP foi primeiramente avaliada pelo modelo das contorções abdominais, que é simples, rápido e confiável para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias (SHINDE, et al., 1999) e é caracterizado por ser uma metodologia de alta sensibilidade, sendo sensível a drogas centrais e periféricas (VAZ et al., 1996; VOGEL; VOGEL, 1997; RAMEZANI; HOSSINZADEH; DANESHMAND, 2001).

O modelo químico de nocicepção de contorções abdominais em camundongos baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal, seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético. (WHITTLE, 1964).

DERAEDT et al. (1980) descreveram a quantificação de prostaglandinas por radioimunoensaio no exsudato peritoneal de ratos, obtidos após injeção intraperitoneal de ácido acético, onde foram observados altos níveis de prostaglandinas PGE₂α e PGF₂α durante os primeiros 30 minutos após a sua administração. A administração intraperitoneal de ácido acético induz à liberação de prostaglandinas, mas também a liberação de mediadores (aminas - norepinefrina e acetilcolina) do SNS (DUARTE et al., 1988; BORSATO et al., 2000). Portanto, tanto as substâncias com atividade anti-inflamatória, como os anticolinérgicos ou os anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA et al., 2003).

Os resultados mostraram que neste modelo de nocicepção o AP foi capaz de diminuir, de maneira dose dependente, o número de contorções abdominais nas três doses testadas, 50, 75, 100 mg/kg, quando comparada ao grupo controle, de forma semelhante à droga padrão opióide, morfina.

Resultados similares foram obtidos por GALEOTTI et al. (2002) com o monoterpeno (-)-mentol, PEANA et al. (2003) com o (-)-linalol, e DE SOUSA (2006c) com a hidroxidiidrocarvona.

Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférico (WEI et al., 1986), este não é um modelo específico, pois os analgésicos opióides (FRANÇA et al., 2001; GONZALES et al., 2001), antidepressivos tricíclicos (TAKAHASKI et al., 1987), anti-histamínicos (YEH et al., 1985), além das substâncias já mencionadas, também inibem as contorções induzidas por ácido acético.

Portanto, apesar do AP reduzir a quantidade de contorções, foi necessário a utilização de outros modelos de nocicepção para reforçar e melhor caracterizar tais efeitos. Conseqüentemente, foram utilizados os testes mais específicos, sendo eles o teste da formalina e da placa quente.

O teste da formalina é um modelo químico de nocicepção que fornece uma resposta mais específica em comparação ao modelo do ácido acético (SHIBATA, 1989), além de ser considerado, atualmente, o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJOLSEN & HOLE, 1997).

A principal característica desse teste é o fato de que o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção, que parece envolver estímulos distintos. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e estende-se pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A δ , ela está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Drogas que atuam em nível central, tais como analgésicos opióides, inibem ambas as fases do teste da formalina, entretanto, drogas de ação periférica como os antiinflamatórios somente são eficazes na segunda fase (SANTOS et al., 1994; FARSAM et al., 2000; ADEYEMI; OKPO; OKPAKA, 2004). Segundo HUNSKAAR e HOLE (1987), tanto antiinflamatórios não-esteroidais quanto os

corticosteróides agem na segunda fase da formalina, a exemplo do AAS, indometacina e dexametasona (RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003).

As três doses de AP utilizadas no teste da formalina (50, 75, 100 mg/kg) promoveram, assim como as drogas de ação central, a exemplo da morfina, uma inibição de ambas as fases do teste. (gráficos 3 e 4). Esse resultado, somado ao das contorções abdominais, indicam que o efeito antinociceptivo do AP apresenta um possível componente central.

Para melhor esclarecer este efeito, foi realizado o teste da placa quente. Neste teste, utiliza-se a temperatura como estímulo nociceptivo. Este modelo foi descrito inicialmente por WOOLFE e MACDONALD (1944) e é um teste seletivo para detecção de substâncias analgésicas com efeito central (ANKIER, 1974). Ele caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais, sendo que a resposta é proporcional à freqüência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICKENSON & BESSON, 1997). Estas fibras são estimuladas após a ativação de receptores, entre eles os receptores vanilóides, especificamente o receptor do tipo VR-1 (limiar de ativação = 43°C) e receptor do tipo VRL-1 (limiar de ativação = 52°C), que são responsáveis pela resposta ao aumento na temperatura, sendo que os receptores VRL-1 são mais importantes na medição da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS & BASBAUM, 2001).

As mesmas doses de AP utilizadas no teste da formalina (50, 75, 100 mg/kg) foram avaliadas na placa quente e todas promoveram um aumento na latência de resposta ao estímulo térmico (53°C \pm 1) no aparelho, após 30 minutos de suas administrações. Resultados semelhantes foram observados com outros monoterpeno de comprovada ação central, entre eles (-)-mentol (GALEOTTI et al., 2002) e (-)-linalol (PEANA et al., 2003) e o derivado sintético hidroxidiidrocarvona (OLIVEIRA et al., 2008).

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o monoterpeno álcool perílico apresenta perfil de substância com atividade antinociceptiva do tipo central, por apresentar resultados em metodologias

comportamentais não específicas (contorções abdominais induzidas pelo ácido acético) e específicas de ação central (formalina e placa quente), baseadas em estímulos nocivos químicos e térmicos. Porém, os mecanismos de ação central envolvidos nesta atividade permanecem desconhecidos. Os sistemas opióide, serotoninérgico, adrenérgico, entre outros, são alguns dos possíveis alvos de atuação, sendo necessários mais estudos com ferramentas farmacológicas apropriadas, que levem à elucidação de tais mecanismos.

Conclusões

IX. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o álcool perílico nas doses utilizadas:

- Apresentou uma DL_{50} de 281,3 (242,1 – 326,9) mg/kg por via i.p., que permitiu a utilização de doses com atividade no SNC, desprovida da observação de efeitos tóxicos;
- Promoveu alterações comportamentais semelhantes às de drogas depressoras do SNC, observadas durante a triagem farmacológica comportamental, sem comprometer a coordenação motora, analisada no aparelho de rota-rod;
- Possui significativo efeito antinociceptivo, considerando o fato de o AP ser efetivo na redução do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- Essa atividade antinociceptiva é do tipo central, evidenciado na primeira e segunda fases do teste da formalina, bem como no teste da placa quente;

Perspectivas

X. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, são propostas as seguintes perspectivas para a continuação do estudo do álcool perílico:

- Estudar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva central do AP, a partir da utilização de agonistas e antagonistas dos principais sistemas de controle central da dor, entre eles, opióide, serotoninérgico e adrenérgico.

- Utilizar técnicas eletrofisiológicas, como, single sucrose gap e patch-clamp, que auxiliem na elucidação destes mecanismos;

- Realizar estudos crônicos para avaliar o efeito do AP a longo prazo, bem como, melhor caracterizar possíveis efeitos tóxicos nesse período;

Referências

XI. REFERÊNCIAS

ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OKPAKA, O. The analgesic effect of the methanolic extract of *Acanthus montanus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 45-48, 2004.

ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 17, p. 179-188.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T.; JÚNIOR, L. J. Q.; POLARI, R. M. P.; FILHO, J. M. B.; 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 Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolona in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334-338, 1996.

ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; FATURI, C. B.; CATALANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 77, p. 361-364, 2004.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.

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

ANKIER, S.I. New hot plate test to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal Pharmacology**, v. 27, p. 1-4, 1974.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants, **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BASBAUM, A.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL. **Principles of Neural Science**, 4ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M.; COSTA, A. M. R.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 241-245, 2006.

BELCHER, G.; RYALL, R.W.; SCHAFFNER, R. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe interneurons in the cat. **Brain Research**, v.151, n. 2, p. 307-21, 1978.

BESSION, P.; PERL, E.R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 32, p.1025-1043, 1969.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K. B. R.; ARRIGONI-BLANK M.F.; MORENO, M.P.N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 809-813, 2000.

BOWSHER, D. The lifetime occurrence of herpes zoster and prevalence of postherpetic neuralgia: a retrospective survey in an elderly population. **European Journal Pain**, v. 3, n. 4, p. 335-342, 1999.

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

BROTON, J.G.; ROSENFELD, J.P. Rostral trigeminal projections signal perioral facial pain. **Brain Research**, v. 243, n. 2, p. 395-400, 1982.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substance from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CARLINI, E. A., Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

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.

CLARK, F. M.; PROUDFIT, H. K. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. **Brain Research**, v. 547, n. 2, p. 279-288, 1991.

COOPER, S. A. Treating acute pain: do's and don'ts, pros and cons. **Journal of Endodontics**, v. 16, p. 85-91, 1990.

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.

DANTAS, M. C.; OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; DIAS, J.C.; BARRETO, P. A.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal Ethnopharmacology**, v. 94, p. 129-133, 2004.

DELGADO, G. L. Prática para o uso de opióides, em especial a morfina, para a dor de origem oncológica. **Oncologia Atual**, v. 10, p. 79-87, 2000.

DERAEDT, R. JOUQUEY S, DELEVALLE F, FLAHAUT M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, F. S. Evaluation of the central activity of hydroxydihydrocarvone. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 811-812, 2006a.

DE SOUSA, D. P.; JUNIOR, E. V. M.; OLIVEIRA, F.S.; DE ALMEIDA, R. N.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. **Zeitschrift für naturforschung**, v. 62, p. 39-42, 2007d.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α , β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 23-28, 2007b.

DE SOUSA, D. P. ; RAPHAEL, E. ; BROCKSOM, U. ; BROCKSOM, T. J. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. **Zeitschrift für naturforschung**, v. 62, p. 563-566, 2007a.

DE SOUSA, D. P.; SCHEFER, R. R.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Synthesis and antidepressant evaluation of three para-benzoquinone mono-oximes and their oxy derivatives. **Molecules**, v. 11, p. 148-155, 2006b.

DE SOUSA, D. P. [Síntese e Testes Farmacológicos de Intermediários para Sesquiterpenos Guaianos], **Tese de Doutorado**, UFSCar, 2004.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M.J.; Dickenson, A. **The pharmacology of pain**, Springer-Verlag, Berlim. p.21-41, 1997.

DICKENSON, A. H. Plasticity: implications for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. **Behavioral and Brain Science**, v. 3, p. 392-403, 1997.

DUARTE, I. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.

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.

ECCLES, R. Menthol and related cooling compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 18-630, 1994.

EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. J. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385 -393, 1953.

ELISABETSKY, E.; COELHO DE SOUZA, G. P.; SANTOS, M. A. C.; SIQUEIRA, I. R.; AMADOR, T. A. Sedative properties of linalool. **Fitoterapia**, v. 66, p. 407-414, 1995a.

ERMAN, W.F. Chemistry of the monoterpenes: **An encyclopedic handbook**, Parte A. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 601-603, 1985.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FERREIRA, D. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, p. 47-49, 2003.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 309-329, 1999.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce na antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 157-164, 2001.

FRANCO, C. I. F. Estudo da atividade farmacológica no sistema nervoso central de *Sida cordifolia* L. (Malvaceae) em roedores. 2003. 129 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FRITSCHY, J. M. et al. Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: a combined anterograde transport and immunohistochemical study. **Brain Research**, v.437, n.1, p.176-180, 1987.

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

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. D. C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145-148, 2002.

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **JAOA**, v. 107, n. 10, s. 6, p. 39-48, 2007.

GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R.B.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31(5), p. 1017—1020, 2008.

GONZALES, F. G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DISTASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77 (1), p. 41-47, 2001.

GRACIOSO, J. S.; PAULO, M. Q.; LIMA, C. A. H.; BRITO, A. R. M. Antinociceptive effect in mice of a hydroalcoholic extract of *Neurolaena lobata* (L.) and its organic fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p. 1425-1429, 1998.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**, São Paulo: Atheneu, 2000. 260p.

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.

JEFTINIJA, S.; JEFTINIJA, K.; LIU, F.; SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; LARSON, A.A. Excitatory amino acids are released from rat primary afferent neurons *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v.125, p. 191-194, 1991.

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

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

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Calcitonin gene related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**, v. 540, p. 989-1002, 2002.

LAWSON, S. N.; CREPPS, B. A.; PERL, E. R. Relationship of substance p to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**, v. 505: p. 177-191, 1997.

LIRA, S. R. S. Efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher sobre o sistema nervoso central. 2001. 70f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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.

MARQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**, v. 1, p. 3-10, 2004.

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

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 699, p. 971-79, 1965.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Textbook of Pain. 4.ed. Londres: **Churchill Livingstone**, v. 18, 1999.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 462-471, 2002.

MENEZES, I. A. C.; MARQUES, M. S; SANTOS, T. C.; DIAS, K. S.; SILVA, A. B.; MELLO, I.; LISBOA, A. C. C .D.; ALEVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192-195, 2007.

MERSKY, Y. H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. **Pain Supplement**, v. 3, S1-S226, 1986.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. (Eds.). Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2.ed. **Seattle, Wash: IASP Press**, 1994.

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

MIRANDA, A. C. M.; QUEIROZ, V. T. Álcool perílico: propriedades farmacológicas e síntese Laboratorial. **Revista Científica da FAMINAS - Muriaé**, v. 3, n. 1, sup. 1, p. 9, 2007.

NARAYANAN, N.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; VIJAYASEKARAN, V.; SUKUMAR, E. Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Premna herbacea* root. **Fitoterapia**, v. 71, p. 147-153, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, F. S.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone, **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31(4) p. 588-591 2008.

OSHIMA, Y; MATSUOKA, S. and Ohizumi, Y. Antidepressant principles of *valeriana fauriei* roots. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 169-170, 1995.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D. L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal Pharmacology**, v. 460, p. 37-41, 2003.

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

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 71, p. 313-324, 1996.

POURGHOLAMI, M. H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOUB, S. and Sayyah, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 64, p. 167-171, 1999.

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

RAMEZANI, M.; HOSSINZADEH, H.; DANESHMAND, N. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 255-262, 2001.

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

RAO, V. S. N.; MENEZES, A. M. S. and Viana, G. S. B. Effect of myrcene on nociception in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 877-878, 1990.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: aspectos atuais da

sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94-105, 2007.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91-95, 2003.

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

SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; NIERO, R.; VIANA, A. M.; MORENO, F. N.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 755-759, 1994.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. **Planta Medica**, v. 61, p. 329-331, 1995.

SANTOS, F. A. & RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SCHMELZ, M.; PETERSEN, L.J. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. **News in Physiological Sciences**, v. 16, p. 33-37, 2001.

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

SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S.; NAIR, A. M.; MUNGANTIWAR, A. A. DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 21-27, 1999.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 38-43. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 23 fev. 2006.

SMITH, G. R.; MONSON, R. A.; RAY, D. C. Patients with multiple unexplained symptoms. Their characteristics, functional health, and health care utilization. **Archives of Internal Medicine**, v. 146, n. 1, p. 69-72, 1986.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

TAKAHASKI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20 (5), p. 607-610, 1987.

TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: **Grupo Editorial Moreira Jr**, 2001. 406p.

TJÖLSEN, A., HOLE, K. Animals models of analgesia. In: Dickenson AH & Besson JM (org.) **The Pharmacology of pain**, (Handbook of Experimental Pharmacology series. v. 25). Germany: Springer-Verlag, p. 1-20, 1997.

URBAN, M. O.; GEBHART, G. Central mechanism in pain. **Medical Clinics of North America**, v. 83, n. 3, p. 585-596, 1999.

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 xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VOGEL, H. G.; VOGEL, W. H. **Drug discovery and evaluation, pharmacological assays**, Berlin: Springer, p. 370-371, 1997.

WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WAY, W. L.; FIELDS, H. L.; SCHUMACHER, M. A. Analgésicos & antagonistas opióides. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**, 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap. 31, p. 446-462.

WEI, E. T.; KIANG, J. G.; BUCHAN, P.; SMITH, T. W. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 238, p. 783-787, 1986.

WELCH, S. P.; MARTIN, B. R. Analgésicos opióides e não-opióides. In: CRAIG, C.; STITEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**, 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 26, p. 290-308.

WHITTLE B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Journal Neuropharmacology**, v. 3, p. 369-378, 1964.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

YAKSH, T. L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P.D.; Melzack, R. (Eds). **Textbook of Pain**, 5 Ed. Edinburgo: Elsevier Churchill Livingston: p. 371-414, 2006.

YAKSH, T. L.; MALMBERG, A.B. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: WALL, P.D.; MELZACK, R.; BONICA, J.J. **Textbook of pain**, Edinburgh: Churchill Livingstone, p.165-96, 1994.

YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociceptive by tripelenamine in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 235, p. 683-689, 1985.

Anexos

➤ **TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:**

GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R.B.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31(5), p. 1017-1020, 2008.

➤ **RESUMOS COMUNICADOS EM CONGRESSOS:**

BENEDITO, R.B.; ALMEIDA, R. N.; DE SOUSA, D. P.; MORAIS L. C. S. L.; LIMA, M. R. V.; NÓBREGA, F. F. F. Avaliação da atividade antinociceptiva do Álcool Perílico em dois modelos animais comportamentais. **V Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, Rio de Janeiro / RJ, 2009.

BENEDITO, R.B.; ALMEIDA, R. N.; DE SOUSA, D. P.; MORAIS L. C. S. L.; LIMA, M. R. V.; NÓBREGA, F. F. F. Estudo comparativo da atividade antinociceptiva de quatro análogos estruturais do mentol. **V Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, Rio de Janeiro / RJ, 2009.
