

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

**LUCAS DE OLIVEIRA MONTE**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO SALICILATO DE BORNILA EM**  
**CAMUNDONGOS**

**JOÃO PESSOA**

**2014**

**LUCAS DE OLIVEIRA MONTE**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO SALICILATO DE BORNILA EM  
CAMUNDONGOS**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

**JOÃO PESSOA**

**2014**

M772e Monte, Lucas de Oliveira.  
Efeito antinociceptivo do salicilato de bornila em  
camundongos / Lucas de Oliveira Monte.-- João Pessoa, 2014.  
77f. : il.  
Orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS  
1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Salicilato de  
bornila. 4. Derivado salicílico. 5. Efeito antinociceptivo.  
4. Analgesia.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**LUCAS DE OLIVEIRA MONTE**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO SALICILATO DE BORNILA EM  
CAMUNDONGOS**

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

Aprovado em 07 de Fevereiro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Orientador – UFPB

---

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa  
Examinador Externo - UFPB

---

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima  
Examinador Interno - UFPB

À minha família, em especial meu pai José  
Augustinho do Monte, pelo amor e  
educação que me deram.

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelo dom da vida.*

*Ao meu pai **José Augustinho** e meus irmãos **Thiago Monte** (in memoriam) e **Edson Monte**, pelo amor e presença constante em minha vida.*

*Aos meus avós (in memoriam) **Antônio Agostinho** e **Expedita Vital**, por terem participado diretamente da minha educação.*

*Às minhas tias **Francisca Vital** e **Elba Vital**, minhas mães adotivas, que me passaram muitos dos valores que hoje são fundamentais na minha vida.*

*Ao meu primo **Samuel Monte**, que contribuiu para escolha da minha carreira profissional.*

*À minha família, que construiu o alicerce sobre o qual eu pude estabelecer a minha vida.*

*Aos meus amigos, **Lílian Pinheiro**, **Naíla Policarpo**, **Jessé Nóbrega**, **Alexsandra Santos**, **Airlla Laana**, **Luiz Henrique**, **Cíntia Nóbrega**, **Gilmara Régia**, **Paulo Antônio**, **Ivaldo Marinho** e **Geovanna Almeida** e todos os demais, não haveria espaço para citá-los nem para agradecer a importante contribuição que vocês me deram.*

*Ao meu orientador **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, por ter me dado a oportunidade de realizar um sonho de infância, ser cientista, e pelo exemplo de competência profissional.*

*Ao professor **Luis Cezar Rodrigues**, pela contribuição para a realização deste trabalho.*

*Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.*

*Aos colegas do Laboratório de Psicofarmacologia, **Paula Salgado**, **Fabíola Lélis**, **Diogo Vilar**, **Rosângela Penha**, **Charlane Souto**, **Mirian Salvadori**, **Rubens Benedito**, **Vanine Mota**, **Klébya Oliveira**, **Viviana La Rocca**, **Camyla Guedine**, **Janilson Silva**, **Aline Kely**, **Vanessa Muniz** e **Sara Mirtyla**, pela convivência e ajuda na execução dos experimentos.*

*A todos os professores da pós-graduação, pelos ensinamentos.*

*A todos os funcionários da pós-graduação, em especial **Crispim Duarte**, pelos serviços prestados.*

*A todos que de direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.*

"Saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu.

Isto é ter sucesso."

Ralph Waldo Emerson

## RESUMO

MONTE, L. O. **Efeito antinociceptivo do salicilato de bornila em camundongos**. 2014. 77f. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia). UFPB / CCS – João Pessoa / PB.

A dor é um grave problema de saúde pública, afeta a qualidade de vida de seus portadores e traz inúmeros prejuízos para a sociedade. A ciência continua buscando novos fármacos analgésicos mais potentes e com menos efeitos colaterais. O salicilato de bornila (SB) é um derivado salicílico obtido pela esterificação do ácido salicílico com o monoterpene (-)-borneol, ambos com efeitos analgésicos já descritos na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo do SB e seus possíveis mecanismos em modelos de nocicepção aguda em camundongos. Para tanto, realizou-se uma triagem farmacológica comportamental, teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina. Utilizou-se bloqueadores de vias envolvidas na dor no teste da formalina para evidenciar os possíveis mecanismos de ação. O SB (200 mg/kg, i.p.) promoveu alterações comportamentais indicativas de droga depressora do SNC, efeito não observado na administração por via oral. As doses de 100 e 200 mg/kg (i.p.) reduziram o número de contorções abdominais e aumentaram o tempo de latência para a primeira contorção. O SB (100 e 200 mg/kg, i.p.) diminuiu o tempo de lambida da pata dos animais somente na fase inflamatória do teste da formalina. O pré-tratamento dos animais com o precursor do óxido nítrico (L-arginina, 600 mg/kg, i.p.), inibidor da ciclase de guanilil solúvel (azul de metileno, 20 mg/kg, i.p.), antagonista muscarínico não-seletivo (atropina, 1 mg/kg, i.p.) e antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> (bicuculina, 1 mg/kg, i.p.), não reverteram o efeito antinociceptivo do SB (200 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina. Estes dados sugerem que o SB apresenta efeito antinociceptivo periférico (anti-inflamatório), cujo mecanismo parece em princípio não envolver óxido nítrico, GMPc, receptores colinérgicos muscarínicos nem receptores GABA<sub>A</sub>. Novos estudos são necessários para melhor esclarecer o efeito produzido pelo salicilato de bornila.

Palavras-chave: salicilato de bornila, derivado salicílico, efeito antinociceptivo, analgesia.



## ABSTRACT

MONTE, L. O. **Antinociceptive effect of bornyl salicylate in mice.** 2014. 77f. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia). UFPB / CCS – João Pessoa / PB.

The pain is a serious public health problem, affects the quality of life of their patients, he brings harm to society. The science continues to seek new more potent analgesic drugs and with fewer side effects. Bornyl salicylate (BS) is a salicylic acid derivative obtained by esterification of salicylic acid with the monoterpene (-)-borneol, both with analgesic effects described in the literature. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of BS and its possible mechanisms in models of acute nociception in mice. For this purpose, we performed a behavioral pharmacological screening, test of acetic acid-induced writhing and formalin test. We used blockers pathways involved in pain in the formalin test to elucidate the possible mechanisms of action. BS (200 mg/kg, i.p.) showed behavioral changes indicative of CNS depressant drugs, no effect was observed on oral administration. Doses of 100 and 200 mg/kg (i.p.) reduced the number of writhings and increased the latency time to the first writhing. BS (100 and 200 mg/kg, i.p.) decreased paw licking time of animals only during the inflammatory phase of the formalin test. Pretreatment of animals with the precursor of nitric oxide (L-arginine, 600 mg/kg, i.p.), inhibitor of soluble guanylyl cyclase (methylene blue, 20 mg/kg, i.p.), non-selective muscarinic antagonist (atropine, 1 mg/kg, i.p.) and GABA<sub>A</sub> receptors antagonist (bicuculline, 1 mg/kg, i.p.), do not reverted the antinociceptive effect of BS (200 mg/kg, i.p.) in the second phase of the formalin test. These data suggest that BS exerts peripheral antinociceptive effect (anti-inflammatory), which mechanism seems in principle not involve nitric oxide, cGMP, muscarinic cholinergic receptors or GABA<sub>A</sub> receptors. Further studies are required to clarify the effect produced by bornyl salicylate.

**Keywords:** bornyl salicylate, salicylic acid derivative, antinociceptive effect, analgesia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral do circuito nociceptivo.....	19
<b>Figura 2.</b> Conexão entre fibras aferentes primárias e a medula espinhal.....	21
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas do isopreno, linalol e borneol.....	25
<b>Figura 4.</b> Obtenção do salicilato de bornila a partir da esterificação do ácido salicílico com o monoterpene (-)-borneol.....	27
<b>Figura 5.</b> Aparelho utilizado no teste da formalina.....	34
<b>Figura 6.</b> Aparelho utilizado no teste da placa quente.....	34
<b>Figura 7.</b> Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) sobre a latência para a primeira contorção induzida por ácido acético...	45
<b>Figura 8.</b> Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) sobre o número total de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	45
<b>Figura 9.</b> Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina.....	46
<b>Figura 10.</b> Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina.....	47
<b>Figura 11.</b> Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) nos intervalos de 0, 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos no teste da placa quente.....	48
<b>Figura 12.</b> Efeitos do pré-tratamento com L-ARG (600 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) e L-NOARG (50 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina.....	49
<b>Figura 13.</b> Efeitos do pré-tratamento com L-ARG (600 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) e L-NOARG (50 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina.....	49
<b>Figura 14.</b> Efeitos do pré-tratamento com azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina.....	50
<b>Fugura 15.</b> Efeito do pré-tratamento com azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina.....	51

<b>Figura 16.</b> Efeito do pré-tratamento com atropina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina.....	51
<b>Figura 17.</b> Efeito do pré-tratamento com atropina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina.....	52
<b>Figura 18.</b> Efeito do pré-tratamento com bicuculina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina.....	53
<b>Figura 19.</b> Efeito do pré-tratamento com bicuculina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina.....	53

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo da periferia ao SNC.....	20
<b>Quadro 2.</b> Protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental.....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos do SB na triagem farmacológica comportamental em camundongos.....	44
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® - Marca registrada  
°C – Graus Celsius  
AAS – Ácido acetilsalicílico  
AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais  
ANOVA – Análise de variância  
ATP –Adenosina trifosfato  
Azul – Azul de metileno  
BS – Bornyl salicylate  
CG<sub>s</sub> – Ciclase de guanilil solúvel  
COX – Ciclo-oxigenase  
DL<sub>50</sub> – Dose letal mediana  
e.p.m – Erro padrão da média  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
EUA – Estados Unidos da América  
GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GABA<sub>A</sub> – Receptor para GABA tipo A  
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico  
GTP – Guanosina trifosfato  
i.p. – Intraperitoneal  
IASP – International Association for the Study of Pain  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$   
IL-6 – Interleucina 6  
IL-8 – Interleucina 8  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível  
L-ARG – L-Arginina  
L-NAME - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina methyl ester  
L-NNA – L-N<sup>o</sup>-nitroarginina  
L-NOARG - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina  
LPS - Lipopolissacarídeo  
n – Número de animais por grupo  
NMDA – N-metil-D-aspartato

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>

P<sub>i</sub> – Fosfato inorgânico

SB – Salicilato de bornila

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

sp<sup>3</sup> – Hibridização do tipo sp<sup>3</sup>

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa

TRPA1 – Receptor de Potencial Transitório relacionado à proteína Anquirina 1

Tween 80 - Polioxetileno sorbitano monoleato

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

v.o. – Via oral

VR-1 – Receptor vaniloide tipo 1

VRL-1 – Receptor similar ao vaniloide 1

**OBS.:** As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Dor e nocicepção .....	17
1.2. Classificação da dor .....	18
1.3. Percepção da dor .....	19
1.4. Farmacoterapia da dor .....	23
1.5. Produtos naturais e sintéticos potencialmente analgésicos .....	25
1.6. Salicilato de bornila .....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral .....	31
2.2. Objetivos específicos .....	31
3. MATERIAL .....	33
3.1. Animais .....	33
3.2. Condições experimentais .....	33
3.3. Substâncias utilizadas .....	34
3.4. Aparelhagem .....	34
3.4.1. Aparelho utilizado no teste da formalina.....	34
3.4.2. Aparelho utilizado no teste da placa quente .....	35
4. MÉTODOS.....	37
4.1. Obtenção do salicilato de bornila.....	37
4.2. Tratamento dos animais .....	37
4.3. Triagem farmacológica comportamental .....	37
4.4. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	40
4.5. Teste da formalina .....	40
4.6. Teste da placa quente .....	41
4.7. Investigação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila .....	41
4.7.1. Possível participação do sistema L-arginina-óxido nítrico.....	42
4.7.2. Possível participação da via guanosina-3'5'-monofostato cíclico (GMPc) .....	42
4.7.3. Possível participação dos receptores colinérgicos muscarínicos.....	42
4.7.4. Possível participação dos receptores GABA <sub>A</sub> .....	43
4.8. Análise estatística .....	43
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Triagem farmacológica comportamental .....	45

5.2.	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	45
5.3.	Teste da formalina .....	47
5.4.	Teste da placa quente .....	48
5.5.	Possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila .....	49
5.5.1.	Possível participação do sistema L-arginina-óxido nítrico.....	49
5.5.2.	Possível participação da via guanosina-3'5'-monofostato cíclico (GMPc) .....	51
5.5.3.	Possível participação dos receptores colinérgicos muscarínicos.....	52
5.5.4.	Possível participação dos receptores GABA <sub>A</sub> .....	53
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÕES.....	66
8.	REFERÊNCIAS .....	68

# ***INTRODUÇÃO***

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dor e nocicepção

A dor, segundo a *International Association for the Study of Pain* (IASP), é conceituada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em tais termos.

A dor é considerada o terceiro maior problema de saúde nos Estados Unidos (EUA), perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e câncer (TOLLISON, 1987). Estima-se que a dor seja responsável por 70 milhões de visitas médicas por ano nos EUA (TURK, 1992). No Brasil, ela se manifesta em mais de 70% dos pacientes que procuram consultórios médicos (TEIXEIRA, 1995).

Nos EUA aproximadamente 89 bilhões de dólares são destinados anualmente ao tratamento, compensações trabalhistas e litígios envolvendo doentes com dor crônica. Este valor aumenta 150 bilhões quando se considera os gastos indiretos (JENSEN, 1985). Além de gerar estresses físicos e emocionais e perda para os doentes e seus cuidadores, a dor é razão de fardo econômico para a sociedade, serviços médicos e companhias de seguro (TEIXEIRA, 2001).

A perda da qualidade de vida do paciente com dor é o fator mais importante a ser considerado. Segundo inquérito populacional realizado no Brasil, mais 1/3 da população julga que a dor crônica compromete as atividades habituais e mais de 3/4 considera que a dor crônica limita as atividades recreacionais, relações sociais e familiares. Devido à dor, cerca de 50% a 60% dos doentes torna-se parcial ou totalmente incapacitado, transitória ou permanentemente (JENSEN, 1985).

A experiência dolorosa no ser humano resulta da interpretação do aspecto físico-químico do estímulo nocivo e da sua interação com fatores emocionais e culturais individuais que estejam de alguma forma relacionados à dor, tais como o humor, experiências anteriores, crenças, atitudes, conhecimentos, significado simbólico atribuído à queixa dolorosa, entre outros. Estes fatores interferem e modificam a percepção da informação inicial. A apreciação da dor é uma experiência privada e subjetiva que não resulta apenas das características da lesão tecidual (PIMENTA, 1999).

Por outro lado, a nocicepção é definida como o mecanismo pelo qual os estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC), sem, no entanto,

apresentar componente afetivo (ALMEIDA, 2006). Quando se estuda dor em animais de laboratório, não se pode avaliar a subjetividade da dor, uma vez que os animais não verbalizam suas sensações (TJOLSEN, HOLE, 1997; PERL, 2007). Entretanto, a nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, tais como morder ou lambear a área lesada, reflexo de retirar a parte do corpo agredida e vocalização (TJOLSEN, HOLE, 1997; LE BARS, 2001). Sendo assim, os termos dor e analgesia, que caracterizam uma experiência subjetiva, são mais adequadamente utilizados para o ser humano, enquanto que nocicepção e antinocicepção para os animais (MILANO, 2008).

## **1.2. Classificação da dor**

A dor pode ser classificada de várias maneiras. Considerando o critério temporal a dor pode ser transitória, aguda ou crônica.

A dor transitória é produzida pela ativação de nociceptores presentes na pele ou em outros tecidos na ausência de dano tecidual. Esse tipo de dor surge para proteger o homem contra danos físicos ambientais ou lesões no corpo (LOESER, 1999).

A dor aguda é uma resposta fisiológica normal em resposta a um estímulo nocivo (CARR; GOUDAS, 1999) tais como lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. A sensação de dor é desencadeada pela ativação de nociceptores presentes no local lesionado, tem duração inferior a 30 dias e é limitada a área afetada, desaparecendo com a eliminação do estímulo nocivo (RIEDEL, 2001; BRASIL, 2012).

Quando a dor aguda é muito intensa ou persiste por um período prolongado, os nociceptores podem vir a produzir um estado de hiperexcitabilidade persistente, deixando de ser aguda e passando a ser classificada como dor crônica. Esta persiste por mais de 30 dias e está associada com processos patológicos crônicos ou decorrentes de lesões do SNC ou periférico (MERSKEY, 1994; ALMEIDA, ROIZENBLATT, 2004; BRASIL, 2012). A dor crônica pode persistir após a recuperação da doença ou lesão, geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, contínua e recorrente (SMITH, 1986; VILELA FILHO, 1999).

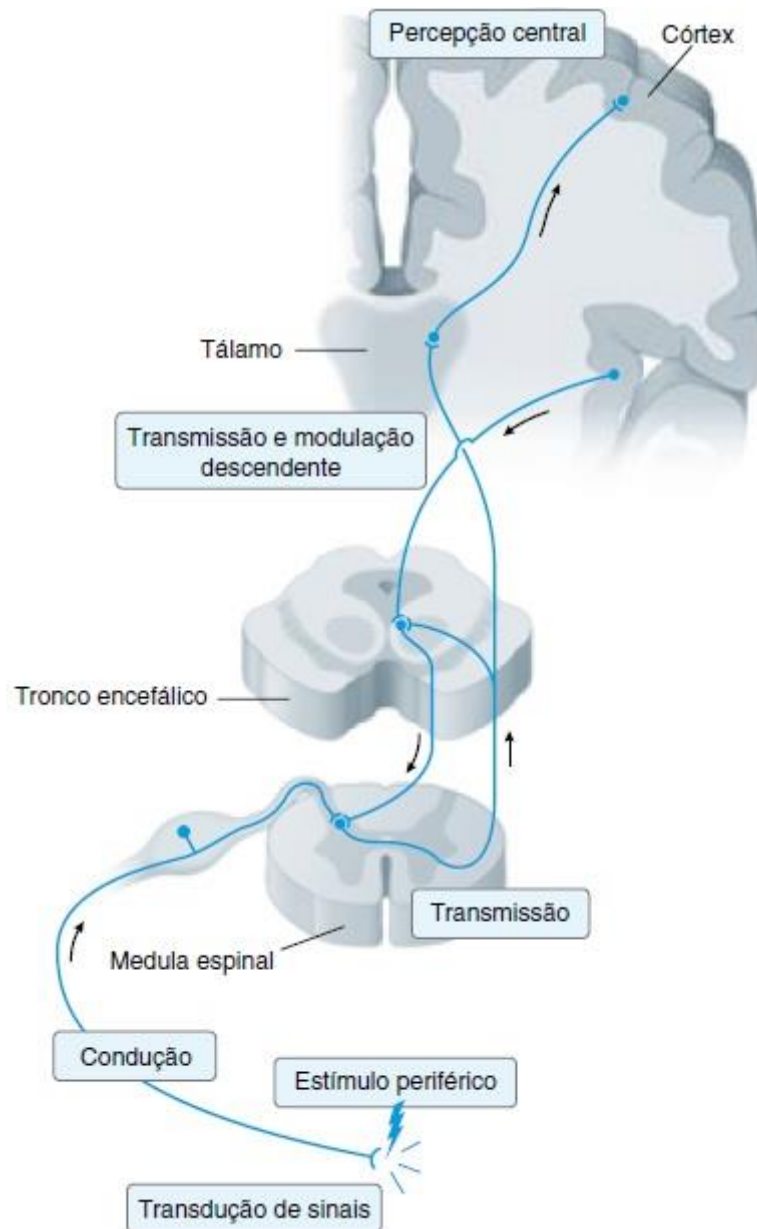
Na classificação fisiopatológica a dor pode ser de três tipos: a) dor de predomínio nociceptivo, b) dor de predomínio neuropático e c) dor mista. A dor de predomínio nociceptivo, ou simplesmente dor nociceptiva, ocorre por ativação fisiológica de receptores da dor e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares. Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso central ou periférico,

sendo mais bem compreendida como resultado da ativação anormal da via da dor ou nociceptiva, podendo, inclusive, não estar associada a qualquer lesão detectável. Quando há simultaneamente dor nociceptiva e neuropática, classifica-se a dor como mista, sendo este o tipo de dor mais frequente na prática clínica (BRASIL, 2012).

### **1.3. Percepção da dor**

A relação entre a ativação de nociceptores e a percepção da dor envolve a ativação de uma cascata de eventos que surge na periferia e é transmitido ao longo das vias sensoriais (BASBAUM; JESSEL, 2000). Estes eventos são extremamente complexos, sendo o estímulo inicial reconhecido por receptores específicos (nociceptores), que o convertem em potenciais de ação que, por sua vez, são transmitido até o SNC, onde ocorre o processamento da transmissão e é gerada a percepção da dor (MILLAN, 1999).

Os impulsos gerados na pele ou outras regiões do organismo pela ativação dos nociceptores são transportados pelas fibras A $\delta$  e C até o corno dorsal da medula espinal. No corno dorsal, os nociceptores fazem sinapses com interneurônios e neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem seguem o seu trajeto nas áreas laterais da medula espinal e projetam-se principalmente para o tálamo, uma estrutura de substância cinzenta logo acima do tronco encefálico. O tálamo possui células que se projetam para o córtex somatossensorial do lobo parietal e para outras áreas como o sistema límbico (neurônios de terceira ordem). A percepção da dor é um processo complexo, que normalmente resulta da ativação de aferentes não-nociceptivos, bem como nociceptivos, e que pode ser alterada, dependendo da situação, do estado mental da pessoa e de outros fatores. O SNC utiliza projeções eferentes no cérebro e na medula espinal para modular os sinais nociceptivos de entrada e modificar, assim, a percepção da dor (Figura 1) (GOLAN, 2009).

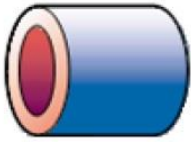

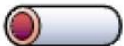


**Figura 1:** Visão geral do circuito nociceptivo (Fonte: GOLAN, 2009).

Os nociceptores são extremamente heterogêneos e podem ser ativados por estímulos térmicos (frio e calor), mecânicos (pressão intensa) e químicos (substâncias irritantes), diferindo quanto aos tipos de neurotransmissores que liberam e quanto aos receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (STUCKY; GOLD; ZHANG, 2001). Os nociceptores apresentam um limiar de ativação maior do que outros receptores sensoriais e respondem progressivamente, de acordo com a intensidade do estímulo (MENSE, 1983; MILLAN, 1999). Eles podem ser encontrados em toda a superfície da pele, mucosa, membranas, tecidos conectivos de órgãos viscerais, ligamentos e articulações,

músculos, tendões e vasos arteriais (MENSE, 1983; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). As fibras sensoriais são classificados de acordo com a estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: C, A $\delta$  e A $\beta$ . A presença de mielina aumenta a velocidade de condução do impulso nervoso (Quadro 1) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

**Quadro 1:** Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo da periferia ao SNC.

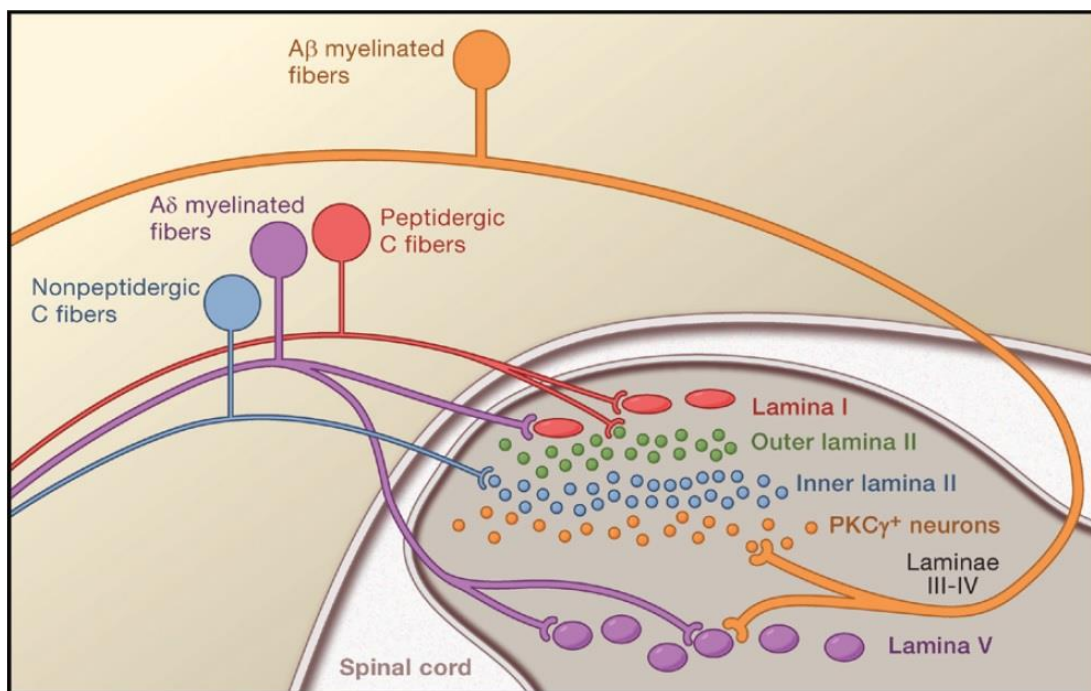
Tipos de fibras	A $\alpha$ e A $\beta$	A $\delta$ I e II	C
			
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro ( $\mu$ m)	10	2 – 6	0,4 – 1,2
Velocidade de condução (m/s)	30 – 100	1,2 – 30	0,5 – 2
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Térmico, mecânico e químico	Térmico, mecânico e químico

FONTE: Adaptado de Julius e Basbaum, (2001).

As fibras tipo C são nociceptores polimodais, pois respondem a estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Elas são responsáveis por induzir as manifestações da dor crônica, enquanto que as fibras tipo A $\delta$  são responsáveis por promover a sensação durante a dor aguda e respondem a estímulos mecânicos fortes, podem responder a estímulos térmicos e químicos desde que tenham sido previamente sensibilizadas (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas situam-se nos gânglios da raiz dorsal, as fibras entram na medula espinhal através das raízes dorsais, terminando na substância cinzenta do corno posterior. O corno dorsal da medula espinhal é subdividido em seis camadas distintas, nas quais os nociceptores chegam de maneira altamente organizada (Figura 2). Na região mais superficial composta pelas lâminas I e II (substância gelatinosa) estão localizados neurônios nociceptivos secundários responsáveis principalmente pela recepção de informações sinápticas de fibras A $\delta$  e C. As lâminas III e IV estão compostas por neurônios que recebem, em geral, aferências monossinápticas de fibras A $\beta$ . A lâmina V está constituída

predominantemente de neurônios de amplo espectro dinâmico que se projetam para o tronco encefálico e para regiões do tálamo. Embora estes neurônios recebam aferências monossinápticas de fibras A $\beta$  e A $\delta$ , muitos deles podem também receber aferências nociceptivas de estruturas viscerais. Finalmente, os neurônios da lâmina VI recebem aferências de fibras de grande diâmetro de músculos e articulações, respondendo a estímulos não-nocivos nas articulações. Acredita-se que estes últimos neurônios não contribuam para a transmissão de informação nociceptiva (BASBAUM; JESSEL, 2000; ALMEIDA, ROIZENBLATT, 2004).



**Figura 2:** Conexão entre fibras aferentes primárias e a medula espinhal (Fonte: BASBAUM, 2009).

O principal neurotransmissor excitatório liberado pelos neurônios aferentes primários é o glutamato, um aminoácido excitatório que tem um papel essencial na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (CHIZH, 2002; OKUSE, 2007). A estimulação contínua e a liberação sustentada de glutamato podem resultar no desenvolvimento de um estado de hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos, que se manifesta clinicamente como hiperalgesia e alodinia (GOUDET, 2009).

Além do glutamato, diversos outros neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva, tais como: aspartato, taquicininas, substância P, neurocicnina A e B, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina,

colecistocinina, somostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina, encefalinas e endorfinas (BREder, 1996; MILLAN, 1999).

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

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

Muitos trabalhos destacam o papel do sistema descendente (do tronco encefálico para o corno dorsal) de controle endógeno da dor (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). As vias descendentes podem modular a nocicepção interagindo com alguns elementos neuronais no corno dorsal da medula: terminações das fibras aferentes primárias, neurônios de projeção, interneurônios inibitórios e excitatórios e terminações de outras vias descendentes (WILLIS, 1997; MILLAN, 1999).

Dentre as vias descendentes, destacam-se as vias noradrenérgica, serotoninérgica, dopaminérgica, opioidérgica e colinérgica. É importante ressaltar que o sistema descendente de controle da dor é bastante complexo, sendo que um mesmo neurotransmissor pode exercer tanto ações inibitórias quanto facilitatórias, dependendo do local onde é liberado (MILLAN, 2002; MARKS, 2009).

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

#### **1.4. Farmacoterapia da dor**

O alívio ou o cessar da dor, sem perda de consciência, pode ser obtido pelo uso de analgésicos, que podem ser divididos em analgésicos periféricos, ou seja, fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, que atuam diminuindo a sensibilização das fibras aferentes

primárias; e de ação central, que têm como característica aumentar o limiar neuronal ao estímulo nocivo ou até mesmo erradicar a sensação dolorosa (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Os opioides são os analgésicos de ação central mais eficazes e frequentemente utilizadas para o alívio da dor moderada à intensa (ROZISKY, 2010). A morfina, por exemplo, exerce seus efeitos mimetizando substâncias de ocorrência natural, chamadas endorfinas. A maioria dos opióides em uso clínico são agonistas relativamente seletivos dos receptores  $\mu$  (acoplados à proteína  $G_i$ ) que, ao serem ativados, promovem hiperpolarização do potencial de membrana e impedem a transmissão do estímulo nociceptivo ao SNC (GUTSTEIN, 2010).

Embora sejam consideravelmente efetivos no alívio da dor, os opioides atingem uma ampla variedade de sistemas fisiológicos. Além de produzirem analgesia, afetam o humor, o comportamento de recompensa e alteram as funções respiratória, cardiovascular, gastrointestinal e neuroendócrina, além de induzir tolerância e dependência física e psíquica (GUTSTEIN, 2010).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das dores nociceptiva e mista são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (BRASIL, 2012). Estes fármacos agem através da inibição da atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), enzimas responsáveis pela produção de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (VANE, 2003).

Segundo dados do IMSHealth, entre os produtos analgésicos comercializados no Brasil em 2001, merecem destaque a dipirona, o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (AAS). A dipirona é o principal analgésico da terapêutica brasileira ocupando 31,8% do mercado, o paracetamol 29,7% e o AAS em terceiro lugar, com 27,1% (VILARDAGA, 2001).

O AAS foi sintetizado em 1887 na Alemanha, baseado nas propriedades anti-inflamatórias do ácido salicílico, que foi extraído das cascas do salgueiro (*Salix alba*) em 1828. Ele tem sido utilizado desde 1889 e é a droga mais comercializada no mundo. Age através da acetilação inespecífica e irreversível da COX (JACK, 1997).

Os AINES, embora bastante utilizados para o alívio da dor, possuem vários efeitos indesejáveis que podem comprometer a qualidade do tratamento. Estes fármacos podem provocar danos hepáticos, gastrintestinais, renais, cardiovasculares, respiratórios e hemostáticos (DUGOWSON, 2006).

Alguns fármacos agem como adjuvantes no tratamento da dor, são aqueles que não têm indicação analgésica primária, mas, podem atuar como analgésicos em circunstâncias bem definidas. Os principais grupos desta classe incluem antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antipsicóticos (REITAN, 1996; BRAINER-LIMA, 1997). São fármacos indicados para o tratamento da dor neuropática (BRASIL, 2012).



A pesquisa por novos analgésicos tem sido prioridade para farmacologistas e indústria farmacêutica, na tentativa de obter medicamentos mais eficazes e reduzir os efeitos colaterais (ALMEIDA, OLIVEIRA, 2006). Apesar da variedade de substâncias e do avanço no desenvolvimento das terapias de controle da dor, ainda há uma necessidade urgente de analgésicos potentes, principalmente para os casos de dores crônicas (CALIXTO, 2000; LIRA, 2001).

### **1.5. Produtos naturais e sintéticos potencialmente analgésicos**

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas. Nos últimos anos, houve um interesse crescente na busca de terapias alternativas e no uso de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas (RATES, 2001).

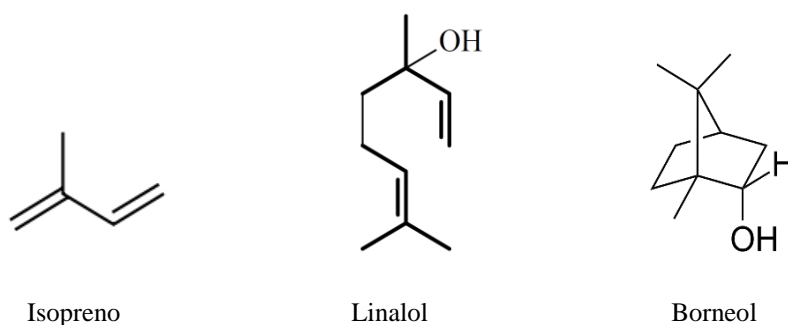
Cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são provenientes de plantas. Das drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Nas últimas décadas, companhias farmacêuticas têm se interessado em investigar plantas como fontes de novos agentes terapêuticos com eficácia, segurança e qualidade comprovada (GROPPO, 2008).

Em um artigo de revisão Almeida e Navarro (2001) identificaram 210 espécies vegetais de 79 famílias cujos extratos apresentaram efeitos analgésicos em ratos e camundongos. Estes dados mostram o potencial das plantas como fonte de drogas com efeitos analgésicos.

A atividade farmacológica de plantas ocorre predominantemente em função do seu conteúdo de metabólitos secundários. Embora a importância dos metabólitos primários não seja descartada, o elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que veem neles uma fonte promissora de novas moléculas úteis ao homem, principalmente do ponto de vista farmacêutico. Os principais metabólitos secundários vegetais são: alcaloides, taninos, flavonoides, lignanas, cumarinas, terpenoides, antraquinonas, esteróis, entre outros (SANTOS, 2004).

Para exemplificar essa grande diversidade, pode-se citar o caso de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (vinca), da família Apocynaceae, que, apenas no que diz respeito aos alcaloides, é capaz de produzir e acumular mais de 90 compostos diferentes, entre eles vimblastina e vincristina, utilizados como agentes antitumorais (ROBBERS, 1996).

Entre os metabólitos secundários com potenciais efeitos farmacológicos destacam-se os terpenoides, que formam uma grande família de compostos derivados de moléculas de isopreno, sendo estas constituídas por 5 átomos de carbono (C5) (Figura 3). Eles são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). São exemplos de monoterpenos o linalol e o borneol (Figura 3) (SOUSA, 2011).



**Figura 3.** Estruturas químicas do isopreno, linalol e borneol.

Sousa (2011) fez um levantamento de 43 substâncias com a atividade analgésica em roedores e destacou que 27 delas são monoterpenos e 8 sesquiterpenos. O autor destaca o potencial deste grupo de produtos naturais como fonte de drogas analgésicas e enfatiza que a similaridade estrutural entre as substâncias pode servir de base para a obtenção de compostos com efeitos farmacológicos melhorados.

Embora novas estratégias para a obtenção de moléculas com potenciais terapêuticos tenham surgido nas últimas décadas, é inquestionável a importância dos estudos de modificações moleculares e experimentos com animais na descoberta de novas drogas (KUBINYI, 2005).

Os progressos alcançados pela química medicinal sintética nas últimas décadas mudaram o panorama da terapêutica moderna, fazendo com que extratos vegetais brutos de composição química complexa fossem substituídos por substâncias puras, de composição e estruturas químicas definidas. Atualmente, cerca de 85% dos fármacos disponíveis no mercado são de origem sintética (BARREIRO, 2001).

A partir de então, a procura e o planejamento racional de novas drogas de origem sintética ou semi-sintética foi intensificada, dando um grande impulso à Química Medicinal,

ciência que trata da concepção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de agentes biologicamente ativos, assim como o conhecimento, a nível molecular, do metabolismo, das interações com receptores que determinam a atividade biológica e da construção de relações estrutura-atividade (PATRICK, 1997).

Uma premissa central da química medicinal é o princípio da similaridade, que afirma que moléculas estruturalmente similares apresentam atividades biológicas similares. Esta ideia tem levado muitos pesquisadores a fazerem grandes descobertas, a exemplo de Felix Hoffman, que, através da acetilação do ácido salicílico, produziu o fármaco que atualmente é o mais vendido do mundo, o AAS (MARTIN, 2002).

O grupo farmacofórico de uma molécula bioativa corresponde à disposição tridimensional de grupos doadores e receptores de hidrogênio, grupos lipofílicos e aromáticos no espaço, de maneira que este conjunto possa interagir com o sítio de ligação de uma proteína alvo para promover o efeito biológico (KUBINYI, 2005).

Uma das estratégias de sucesso da Química Medicinal é a síntese de compostos híbridos, nos quais dois grupos farmacofóricos de compostos com atividades biológicas conhecidas são unidos em uma única molécula (CAPIM, 2013). Um exemplo de êxito desta abordagem, foi a descoberta da droga híbrida *Benorylate*, usada como anti-inflamatória e antipirética (CARDOE, 1970). Esta droga foi preparada pela esterificação do AAS com o paracetamol, tendo apresentado um efeito mais prolongado e menos efeitos colaterais que o AAS, principalmente na irritação gástrica e hemorragias (BAIN, 1970).

Capim 2012 evidenciou o efeito antinociceptivo *in vivo* do álcool ( $\pm$ )-cis-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)metanol. Este mesmo autor, no ano seguinte (CAPIM, 2013), sintetizou seis híbridos deste álcool com vários AINES já utilizados na clínica, incluindo o AAS. Todos os híbridos apresentaram potências farmacológicas superiores às suas respectivas drogas precursoras, destacando-se o híbrido do diclofenaco, que apresentou efeito antinociceptivo 10 vezes superior.

O ácido salicílico possui efeitos analgésico, anti-inflamatório e antipirético descritos desde 1835, porém este fármaco irritava intensamente o estômago e tinha um sabor muito desagradável, sendo substituído pelo AAS em 1897 (JACK, 1997). Estudos têm demonstrado que substâncias derivadas do ácido salicílico, incluindo seus ésteres, têm apresentado efeitos farmacológicos semelhantes ao seu precursor (THOMAS, 2006).

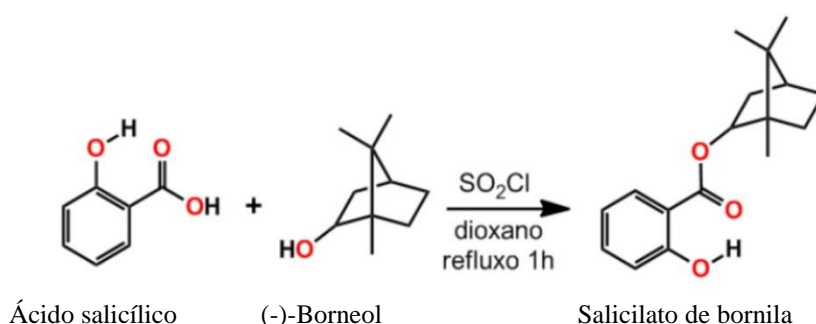
O (-)-borneol é um monoterpeno bicíclico encontrado nos óleos essenciais de muitas plantas medicinais, incluindo *Valeriana officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Lavandula officinalis*, tradicionalmente utilizadas para aliviar sintomas de ansiedade, fadiga e insônia. O

borneol pode provocar analgesia e anestesia. É um agonista parcial de receptores GABA<sub>A</sub>, com potência anestésica similar ao etomidato e superior ao diazepam (PASSOS, 2009). O uso do borneol, por vezes citado como *cânfora de Borneo* na medicina tradicional chinesa (LEWIS, 2008) foi descrito há mais de um século como estimulante afrodisíaco e em condições inflamatórias oftálmicas. Inibe receptores colinérgicos nicotínicos e apresenta uma grande quantidade de efeitos sobre o SNC de mamíferos (PARK, 2003; STOCKMAN, 1888). Silva-Filho (2011) estudou o efeito vasorrelaxante *in vitro* através do bloqueio de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes. Estudo recente demonstrou que o borneol apresenta um efeito duplo sobre o cérebro de camundongos, inicialmente aumentando e depois diminuindo a excitabilidade neuronal (LI, 2012). Wang (2009) demonstrou o efeito antinociceptivo central do borneol no teste da placa quente.

Baseando-se no princípio da similaridade entre compostos e no sucesso das estratégias de modificação molecular de substâncias biologicamente ativas, surgiu o interesse de investigar se a hibridização do ácido salicílico com o monoterpene (-)-borneol geraria um produto com efeitos farmacológicos úteis para o tratamento da dor.

### 1.6. Salicilato de bornila

O salicilato de bornila (SB) é um derivado salicílico obtido facilmente pela esterificação do ácido salicílico com o monoterpene (-)-borneol (Figura 4).



**Figura 4.** Obtenção do salicilato de bornila a partir da esterificação do ácido salicílico com o monoterpene (-)-borneol.

A primeira aplicação terapêutica do salicilato de bornila foi registrada em 1904 (*The British Medical Association*). Nessa época, conhecido por *Salit*<sup>TM</sup> (Tenneco®), era usado na forma de uma emulsão tópica para tratar reumatismo e neuralgia (FOOD AND DRUGS ANALYSIS, 1914; THOMAS, 2000). O SB já foi usado em vários medicamentos na forma de

géis, linimentos e unguentos de uso tópico para o tratamento de dores músculo-esqueléticas e articulares. Atualmente apenas a emulsão tópica denominada *Hygiodermil*® (Vifor Fribourg) contém SB e é utilizada clinicamente para aliviar irritações na pele.

Estudo recente realizado na Universidade Federal da Paraíba demonstrou o efeito anti-inflamatório do SB em modelos de inflamação aguda em camundongos (VASCONCELOS, 2012). Embora haja evidências de sua utilização em humanos, não há estudos clínicos randomizados que comprovem os efeitos farmacológicos dessa substância.

Baseado nos trabalhos que apresentam o ácido salicílico, o borneol e o éster formado por ambos como substâncias potencialmente analgésicas e promissoras para o tratamento da dor, este estudo investigou o efeito antinociceptivo do salicilato de bornila, bem como seus possíveis mecanismos, utilizando modelos comportamentais de nocicepção aguda em camundongos.

## ***OBJETIVOS***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar o efeito antinociceptivo do salicilato de bornila em modelos comportamentais de nocicepção aguda em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos do salicilato de bornila sobre o SNC de camundongos;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do salicilato de bornila;
- Caracterizar o efeito antinociceptivo a nível central ou periférico;
- Investigar a participação de NO, GMPc, receptores colinérgicos muscarínicos e receptores GABA<sub>A</sub> na antinocicepção induzida pelo salicilato de bornila.

***MATERIAL***

---



### **3. MATERIAL**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos albinos da linhagem *Swiss*, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

No biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos cada, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram livre acesso a uma dieta controlada à 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 mesmos foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6 às 18 horas.

Todos os animais foram utilizados uma única vez, sendo sacrificados por deslocamento cervical, realizado por técnico habilitado ao final de cada experimento.

#### **3.2. Condições experimentais**

Todos os testes foram realizados no Setor de Experimentação Comportamental do Biotério Prof. Dr. Thomas George do CBIotec/UFPB no período compreendido entre as 12 e 17h. Os animais eram identificados (por meio de marcações feitas em sua cauda com caneta hidrográfica) e separados em grupos de, no máximo, 5 animais por gaiola.

Aproximadamente 1 hora antes do início dos experimentos os animais eram pesados e transferidos para o local de realização dos testes, a fim de permitir sua ambientalização e minimizar o estresse provocado pela exposição a um novo ambiente. Tanto a bancada quanto os aparelhos utilizados durante os testes eram higienizados previamente com álcool 70°GL, e no decorrer do experimento, após a observação de cada animal, era utilizado álcool 10°GL para limpar os aparelhos e eliminar odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CBIotec/UFPB, sob a certidão nº 0104/13.

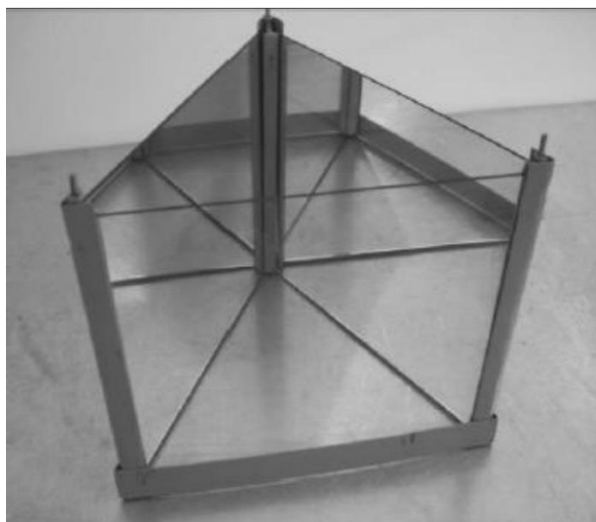
### 3.3. Substâncias utilizadas

- Ácido acético (Reagen – Brasil);
- Água destilada (CBiotec / UFPB);
- Azul de metileno (Sigma – E.U.A.);
- Bicuculina (Sigma – E.U.A.);
- Cloridrato de morfina (Merck – EUA);
- Etanol (Vetec – Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- L-arginina (Sigma – E.U.A.);
- L-NOARG (Sigma – E.U.A.);
- Salicilato de bornila (Laboratório de Química Orgânica Sintética / CBiotec / UFPB);
- Sulfato de atropina (Sigma - EUA);
- Tween 80 (polioxetileno sorbitano monoleato) (Vetec – Brasil).

### 3.4. Aparelhagem

#### 3.4.1. Aparelho utilizado no teste da formalina

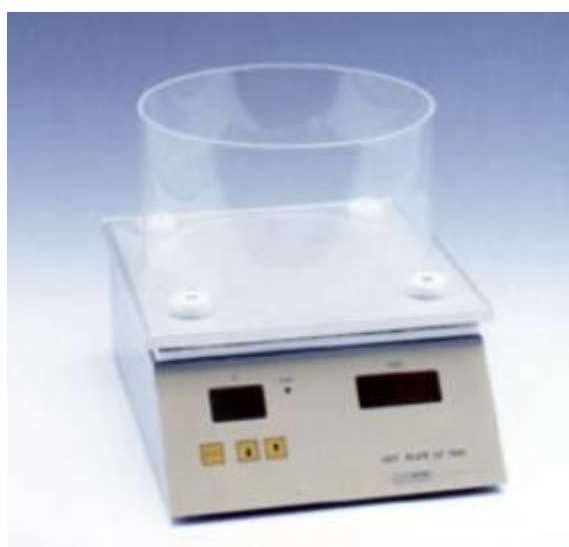
Este aparato, desenvolvido no Laboratório de Psicofarmacologia/CCS/UFPB, é formado por um encaixe de metal que forma uma caixa triangular em ângulo de 45°, com os lados e altura medindo 25 cm cada, sendo duas paredes espelhadas e uma de vidro transparente, dando ao observador um maior campo de visão (Figura 5).



**Figura 5.** Aparelho utilizado no teste da formalina.

### 3.4.2. Aparelho utilizado no teste da placa quente

A placa quente (modelo 7406 – LE) 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 0,1 °C. Neste aparelho, um cronômetro acoplado é ativado por um pedal externo, permitindo a medida precisa do tempo de reação do animal ao estímulo térmico. Acoplado à placa, há um cilindro de acrílico transparente, que isola o animal para observação sobre o aparelho (Figura 6).



**Figura 6.** Aparelho utilizado no teste da placa quente

## *MÉTODOS*

---

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção do salicilato de bornila**

O salicilato de bornila foi produzido a partir da reação de esterificação entre o ácido salicílico e o (-)-borneol. Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1 g de ácido salicílico, 1,12 g de (-)-borneol e 30 mL de dioxano, formando uma solução incolor. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de cloreto de tionila. A mistura foi então levada ao condensador de refluxo em manta aquecedora, onde foi mantida por 1h. Após o tempo de reação, o dioxano foi eliminado em rotaevaporador e o resíduo foi filtrado em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura hexano/acetato 90/10. Obteve-se 1,9g de salicilato de bornila na forma de um líquido aromático amarronzado (VASCONCELOS, 2012).

O salicilato de bornila foi preparado e gentilmente cedido pelo Laboratório de Química Orgânica Sintética / CBiotec / UFPB, sob a coordenação do Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues.

### **4.2. Tratamento dos animais**

Para a utilização nos experimentos, o salicilato de bornila foi emulsificado em água destilada com 5% de Tween 80 e administrado com seringas e agulhas adequadas na proporção de 0,1 mL/10g de peso corporal. Os grupos controle receberam somente o veículo da preparação (5% de Tween 80 em água destilada) na mesma proporção dos grupos experimentais.

### **4.3. Triagem farmacológica comportamental**

A triagem farmacológica comportamental, descrita por Almeida em 1999, é uma metodologia preliminar para avaliar o possível efeito de drogas sobre o SNC. Neste protocolo experimental são estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais, de forma que ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos é possível inferir uma relação com atividade no sistema nervoso. Essas alterações podem indicar efeitos estimulantes ou depressores do SNC, bem como efeitos sobre o SNA, permitindo o direcionamento do estudo farmacológico para testes mais específicos (ALMEIDA et al., 1999).

Os animais foram divididos em 4 grupos de 8 animais cada. Um grupo foi tratado com o SB 200 mg/kg por via oral, outro recebeu a mesma dose por via intraperitoneal, sendo os

grupos controles tratados com o veículo (Tween 80 a 5% em água destilada, i.p. e v.o.). Em todos os tratamentos o volume da solução administrada foi de 0,1 mL/10g de peso corporal. As alterações comportamentais foram registradas continuamente até 30 min após os tratamentos e nos intervalos de 60, 120, 180 e 240 min, conforme protocolo padronizado (Quadro 2) (ALMEIDA, 2006). O número de mortes também foi registrado em até 72 horas após as administrações.

Quadro 2. Protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental.

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

Fonte: Almeida (2006).

#### **4.4. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Este teste baseia-se no fato de que a administração de uma solução diluída de ácido acético por via intraperitoneal em camundongos promove irritação nesta região, com estimulação de nociceptores, provocando nos animais um comportamento atípico, denominado contorção abdominal. Trata-se de uma onda de contração dos músculos abdominais em direção caudal, as vezes acompanhada de torção do tronco e seguida da extensão das patas posteriores (KOSTER, 1959). De um modo geral, drogas com propriedades analgésicas reduzem o número ou até mesmo inibem esse comportamento (COLLIER, 1968).

Cinco grupos de 8 animais cada foram tratados, por via intraperitoneal, com o SB nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, morfina (10 mg/kg) e veículo (Tween 80 a 5% em água destilada), todos administrados com o volume de 0,1 mL de solução/10g de peso corporal. Transcorridos 30 minutos, os animais receberam também por via intraperitoneal uma solução de ácido acético 1% (0,1 mL/10g de peso corporal), sendo registrado o tempo de latência para o surgimento da primeira contorção e número total de contorções ocorridas no intervalo de 5 a 15 minutos após o tratamento com o ácido acético.

#### **4.5. Teste da formalina**

Este teste foi descrito para camundongos por Hunskaar e Hole (1987) e consiste em quantificar a resposta comportamental do animal a um estímulo nociceptivo químico de intensidade moderada e persistente. Uma solução diluída de formalina é injetada na região subplantar do camundongo e este responde ao estímulo em duas fases distintas. A primeira fase ocorre imediatamente após a injeção da formalina e dura cinco minutos, período no qual ocorre estimulação química direta de nociceptores (resposta neurogênica). A segunda fase começa 15 minutos após a injeção e dura cerca de 15 minutos, sendo a resposta nociceptiva mediada pela inflamação gerada na região intraplantar.

Cinco grupos de 8 animais cada foram tratados, por via intraperitoneal, com o SB nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, morfina (10 mg/kg) e veículo (Tween 80 a 5% em água destilada), todos administrados com o volume de 0,1 mL de solução/10g de peso corporal. Transcorridos 30 minutos, os animais receberam uma injeção de 20 µL de formalina 2,5% (formaldeído 0,93% em salina) na região subplantar da pata posterior direita. O tempo de lambida da pata foi cronometrado em segundos no intervalo de 0-5 minutos após a injeção para a primeira fase e no intervalo de 15-30 minutos para a segunda fase.



Este teste baseia-se no fato de que drogas analgésicas com ação sobre o SNC diminuem o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste, enquanto drogas de ação periférica (anti-inflamatórias) diminuem o tempo de lambida apenas na segunda fase (TJØLSEN, 1992).

#### **4.6. Teste da placa quente**

Este teste foi inicialmente proposto por Woolfe e MacDonald (1944) e posteriormente modificado por Eddy e Leimback (1953). Consiste em colocar os animais sobre uma placa aquecida a  $53 \pm 1,0$  °C e quantificar o tempo que os mesmos levam para responder ao estímulo térmico, sendo os comportamentos de pular ou lambe as patas traseiras indicativos de nocicepção. Drogas analgésicas com efeito sobre o SNC aumentam o tempo de resposta dos animais ao estímulo aplicado.

No dia anterior à execução do experimento os animais foram submetidos à placa quente e foram selecionados, de modo que apenas aqueles animais com resposta nociceptiva inferior a 15 segundos foram utilizados no teste.

No dia do teste os animais foram divididos em cinco grupos de 8 animais cada. Inicialmente, a resposta nociceptiva foi verificada antes de qualquer tratamento (leitura basal). Em seguida, os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com o SB nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, morfina (10 mg/kg) e veículo (Tween 80 a 5% em água destilada), todos administrados com o volume de 0,1 mL de solução/10g de peso corporal. O tempo de resposta ao estímulo térmico foi quantificado nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos. Os animais permaneceram na placa quente por um período máximo de 30 segundos para evitar lesão tecidual (ALMEIDA, 2006).

#### **4.7. Investigação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila**

Após verificar que o salicilato de bornila apresentou atividade antinociceptiva, conforme os resultados obtidos anteriormente, foram investigados os possíveis mecanismos pelos quais o salicilato de bornila estaria exercendo o efeito encontrado. Estes estudos basearam-se na utilização de ferramentas farmacológicas que atuam especificamente em receptores e enzimas envolvidas na transmissão da dor. Foram utilizados diferentes antagonistas, substratos e inibidores enzimáticos em doses já descritas na literatura.

A participação da via envolvida no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila foi confirmada quando um determinado bloqueador provocou a reversão do efeito inicialmente observado. Para a realização desta investigação, foi selecionado o teste da formalina por ser um teste mais específico para drogas com perfil anti-inflamatório. A dose de 200 mg/kg de salicilato de bornila foi escolhida para dar continuidade aos estudos, pois apresentou os efeitos mais significativos no modelo utilizado.

#### **4.7.1. Possível participação do sistema L-arginina-óxido nítrico**

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema L-arginina - óxido nítrico na atividade antinociceptiva do salicilato de bornila (SB), grupos de 8 camundongos foram tratados com: veículo (Tween 80 5%, i.p.), SB (200 mg/kg, i.p.), com o inibidor da síntese de óxido nítrico N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 50 mg/kg, i.p.) ou com o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.). Outros dois grupos foram injetados, inicialmente, com L-arginina e, após 15 minutos, receberam SB ou L-NOARG (SALVADORI, 2013). Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste da formalina, conforme metodologia já citada.

#### **4.7.2. Possível participação da via guanosina-3'5'-monofostato cíclico (GMPc)**

Para a investigação do envolvimento do sistema guanosina-3'5'-monofostato cíclico (GMPc) na resposta antinociceptiva do salicilato de bornila, utilizou-se o azul de metileno, um bloqueador desta via. Dois grupos contendo 8 camundongos foram tratados com veículo (Tween 80 5%, i.p.) ou SB (200 mg/kg, i.p.). Outros dois grupos foram pré-tratados com azul de metileno (20 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes das respectivas administrações do veículo ou do SB (PERIMAL, 2011). Transcorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste da formalina, como já descrito anteriormente.

#### **4.7.3. Possível participação dos receptores colinérgicos muscarínicos**

Para evidenciar a participação do sistema colinérgico na antinocicepção induzida pelo salicilato de bornila, dois grupos de 8 animais foram tratados com veículo (Tween 80 5%, i.p.) ou SB (200 mg/kg, i.p.). Outros dois grupos foram pré-tratados com o antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos atropina (1 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes dos

respectivos tratamentos com veículo e SB (HESS, 2006). Transcorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

#### **4.7.4. Possível participação dos receptores GABA<sub>A</sub>**

Visando investigar o envolvimento do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila, dois grupos de 8 animais foram tratados com veículo (Tween 80 5%, i.p.) ou SB (200 mg/kg, i.p.). Outros dois grupos foram pré-tratados com bicuculina (1 mg/kg, i.p.), antagonista seletivo de receptores GABA<sub>A</sub>, 15 minutos antes dos respectivos tratamentos com veículo e SB (HESS, 2006). Transcorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados no programa *GraphPad Prism 6.0*. Foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's para medidas não paramétricas e ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak para medidas paramétricas. Os resultados são expressos como média  $\pm$  e.p.m., sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Triagem farmacológica comportamental

Os resultados obtidos na triagem farmacológica comportamental constam na tabela 1.

**Tabela 1.** Efeitos do SB na triagem farmacológica comportamental em camundongos (n=8)

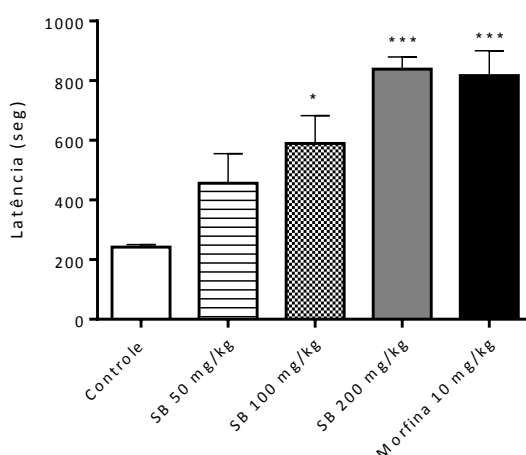
Dose (mg/kg)	Alterações comportamentais			
	30 min	60 min	120 min	240 min
<b>SB 200 v.o.</b>	(0)	(0)	(0)	(0)
<b>SB 200 i.p.</b>	(--) ambulação (-) levantar (-) tempo de autolimpeza	(--) ambulação (-) levantar (-) tempo de autolimpeza	(0)	(0)

(0) efeito ausente, (-) efeito diminuído, (--) efeito muito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso

A administração de 200 mg/kg de SB por via oral (v.o.) em um grupo de 8 camundongos não promoveu alterações comportamentais visíveis desses animais em relação ao grupo controle. No entanto, a mesma dose administrada por via intraperitoneal (i.p.) diminuiu a ambulação, o comportamento de levantar e o tempo de auto-limpeza, sendo estes efeitos evidenciados aos 30 e 60 minutos após a administração, não sendo mais observados nos intervalos de tempo subsequentes. Não houve mortes no período de até 72 horas após os tratamentos.

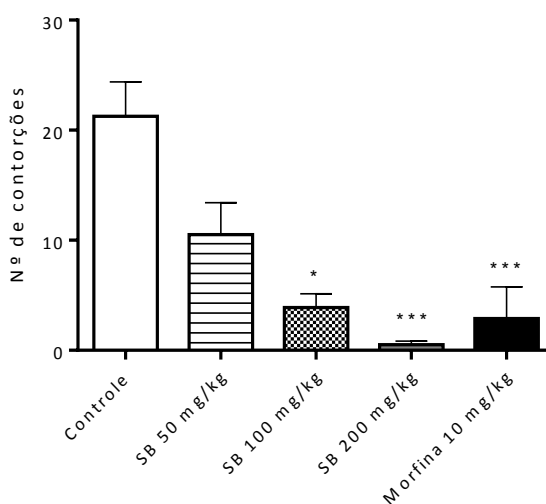
### 5.2. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O SB nas doses de 100 ( $589,8 \pm 93,0$  s) e 200 mg/kg ( $838,6 \pm 41,2$  s) e a morfina ( $817,1 \pm 82,9$  s) aumentaram o tempo de latência para a primeira contorção em relação ao grupo controle ( $242,1 \pm 8,1$  s). Na dose de 50 mg/kg ( $456,3 \pm 99,4$  s) não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 7).



**Figura 7.** Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) sobre a latência para a primeira contorção induzida por ácido acético. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo controle.

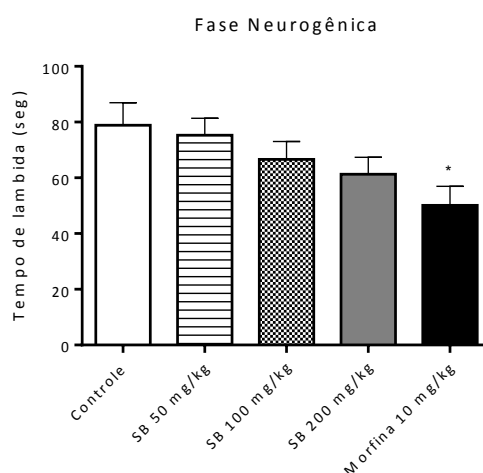
O SB nas doses de 100 ( $3,9 \pm 1,3$ ) e 200 mg/kg ( $0,5 \pm 0,3$ ) diminuiu o número total de contorções em relação ao grupo controle ( $21,3 \pm 3,1$ ). Efeito semelhante foi observado para a morfina ( $2,9 \pm 2,9$ ), mas não para o SB na dose de 50 mg/kg ( $10,5 \pm 2,9$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) sobre o número total de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo controle.

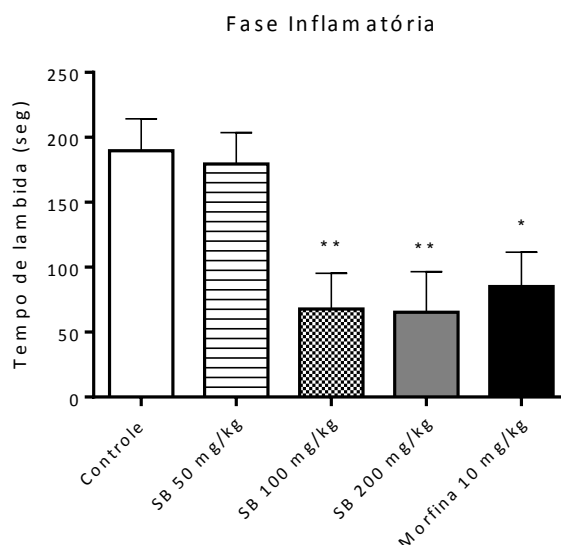
### 5.3. Teste da formalina

Nenhuma das doses do SB testadas (50:  $75,3 \pm 6,2$  s; 100:  $66,6 \pm 6,4$  s e 200 mg/kg:  $61,3 \pm 6,1$  s) alterou significativamente o tempo de lambida da pata dos animais em relação ao grupo controle ( $78,9 \pm 8,1$  s) na fase neurogênica do teste da formalina. Somente a morfina diminuiu este parâmetro ( $50,1 \pm 6,8$  s) (Figura 9).



**Figura 9.** Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

Na fase inflamatória do teste da formalina as doses de 100 ( $67,9 \pm 27,4$  s) e 200 mg/kg do SB ( $65,4 \pm 31,3$  s) reduziram o tempo de lambida da pata significativamente quando comparadas ao grupo controle ( $189,6 \pm 24,7$  s). A morfina também diminuiu este parâmetro ( $85,2 \pm 26,4$  s). O SB na dose de 50 mg/kg ( $179,5 \pm 24,0$  s) não apresentou efeito (Figura 10).

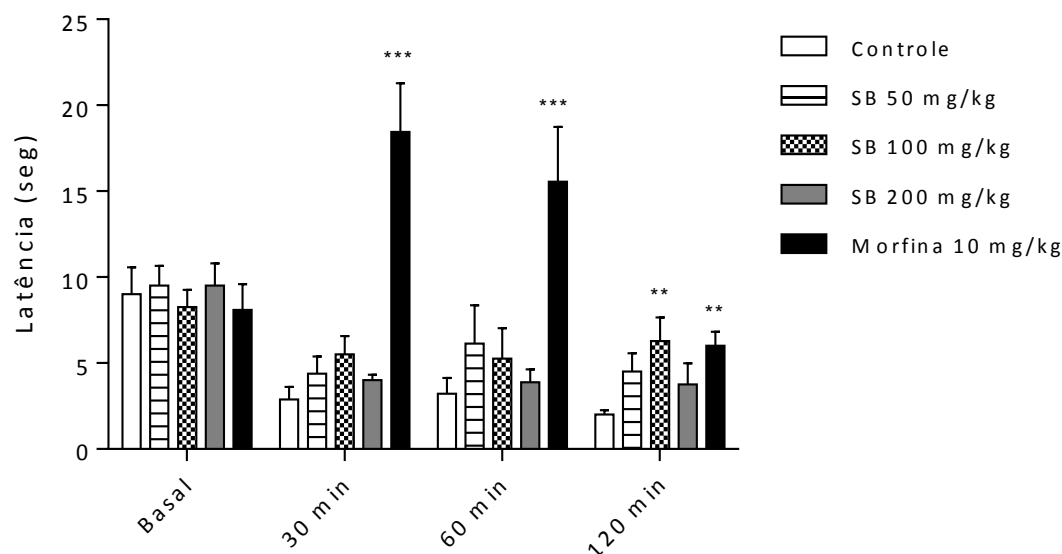


**Figura 10.** Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  versus grupo controle.

#### 5.4. Teste da placa quente

No teste da placa quente somente a dose de 100 mg/kg do SB aos 120 minutos após o tratamento ( $6,3 \pm 1,4$  s) foi capaz de aumentar o tempo de resposta dos animais em relação ao grupo controle ( $2,0 \pm 0,3$  s) de maneira significativa. A morfina aumentou o tempo de resposta dos animais aos 30 ( $18,4 \pm 2,8$  vs  $2,9 \pm 0,7$  s), 60 ( $15,6 \pm 3,2$  vs  $3,2 \pm 0,9$  s) e 120 minutos ( $6,0 \pm 0,8$  vs  $2,0 \pm 0,3$  s) após o tratamento. As doses de 50 e 200 mg/kg do SB não apresentaram efeitos significativos em todos os intervalos de tempo testados (Figura 11).



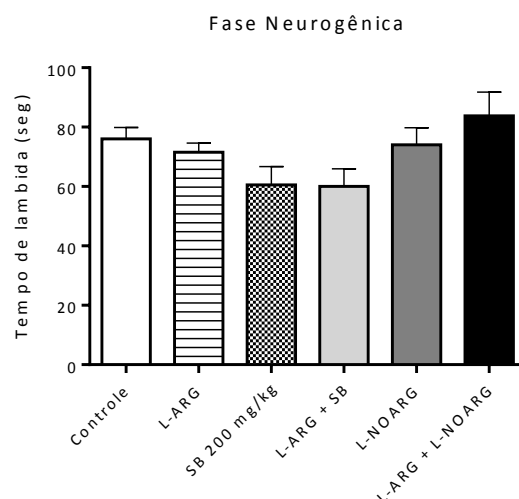


**Figura 11.** Efeito do SB (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) nos intervalos de 0, 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos no teste da placa quente. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 *versus* grupo controle.

## 5.5. Possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do salicilato de bornila

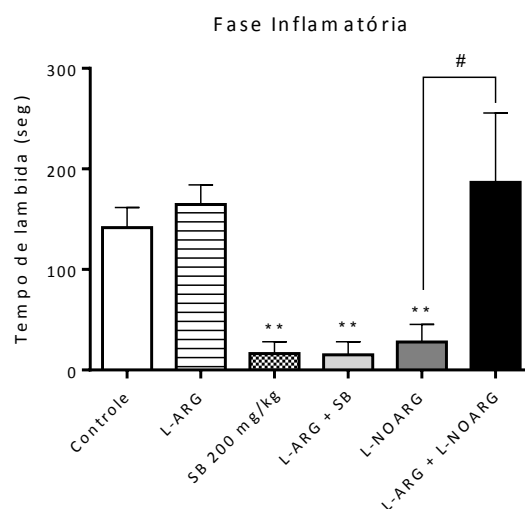
### 5.5.1. Possível participação do sistema L-arginina-óxido nítrico

Na fase neurogênica do teste da formalina os tratamentos com L-ARG ( $71,5 \pm 3,1$  s), SB 200 mg/kg ( $60,5 \pm 6,2$  s) e L-NOARG ( $74,0 \pm 5,8$  s) não alteraram a resposta dos animais ao estímulo nociceptivo em relação ao grupo controle ( $76,0 \pm 3,9$  s). O pré-tratamento com L-ARG também não modificou a resposta dos animais tratados com SB ( $60,0 \pm 5,9$  s) e L-NOARG ( $83,7 \pm 8,0$  s) (Figura 12).



**Figura 12.** Efeitos do pré-tratamento com L-ARG (600 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) e L-NOARG (50 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's).

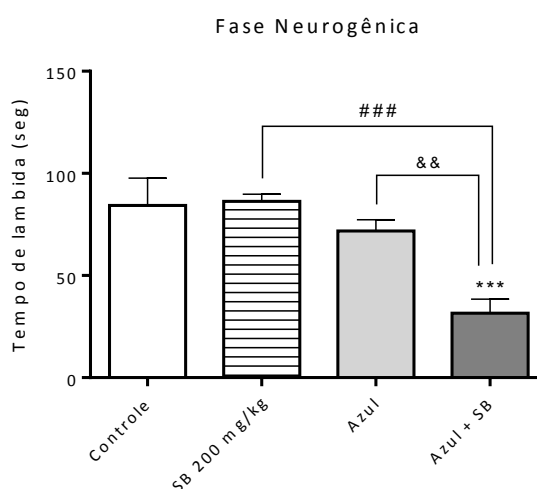
Na fase inflamatória do teste, SB ( $16,4 \pm 11,7$  s) e L-NOARG ( $27,8 \pm 17,6$  s) diminuíram significativamente o tempo de lambida da pata em relação ao grupo controle ( $141,6 \pm 20,1$  s). O pré-tratamento com L-ARG foi capaz de reverter o efeito de L-NOARG ( $186,5 \pm 69,1$  s), mas não reverteu o efeito do SB ( $15,0 \pm 13,2$  s). O tratamento somente com L-ARG ( $164,7 \pm 19,5$  s) não apresentou efeito no teste (Figura 13).



**Figura 13.** Efeitos do pré-tratamento com L-ARG (600 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) e L-NOARG (50 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (Kruskal-Wallis seguido pelo *Post Hoc* de Dunn's). \*\* $p < 0,01$  vs controle, # $p < 0,05$  vs L-NOARG.

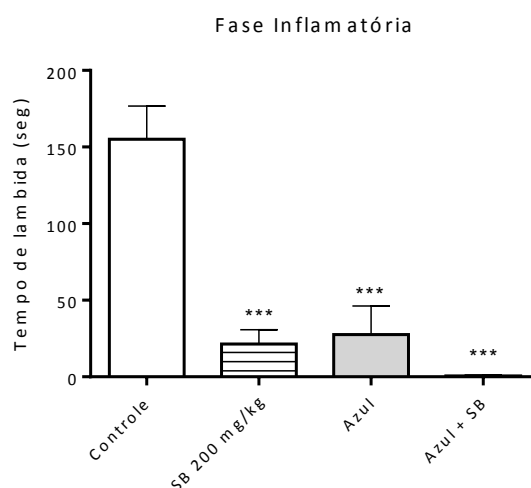
### 5.5.2. Possível participação da via guanosina-3'5'-monofostato cíclico (GMPc)

Quando administrados isoladamente o SB 200 mg/kg ( $86,3 \pm 3,6$  s) e o azul de metileno 20 mg/kg ( $71,8 \pm 5,6$  s) não alteraram a resposta nociceptiva dos animais em relação ao grupo controle ( $84,3 \pm 13,4$  s) na fase neurogênica do teste da formalina. Porém, os animais pré-tratados com azul de metileno e tratados posteriormente com SB ( $31,5 \pm 6,9$  s) apresentaram significativa diminuição no tempo de lambida da pata em relação aos grupos controle, SB e azul de metileno (Figura 14).



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento com azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak). \*\*\*p<0,001 vs controle, ###p<0,001 vs SB, &&p<0,01 vs azul.

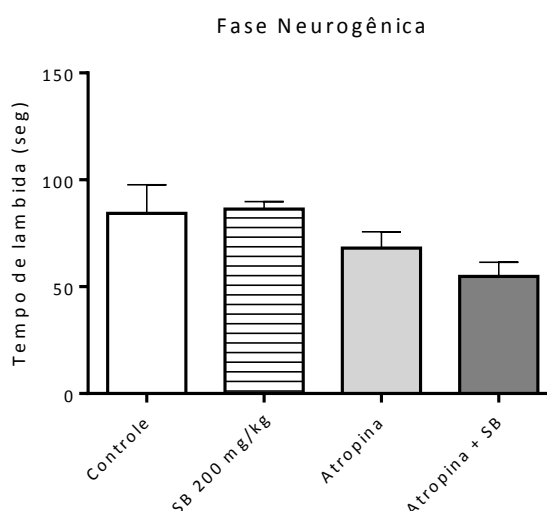
Na fase inflamatória do teste o SB ( $21,3 \pm 9,4$  s) e o azul de metileno ( $27,6 \pm 18,6$  s) reduziram a resposta nociceptiva dos animais quando comparados ao grupo controle ( $155,0 \pm 21,7$  s). O pré-tratamento com azul de metileno ( $0,6 \pm 0,6$  s) não alterou o efeito apresentado pelo SB (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito do pré-tratamento com azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak). \*\*\*p<0,001 vs controle.

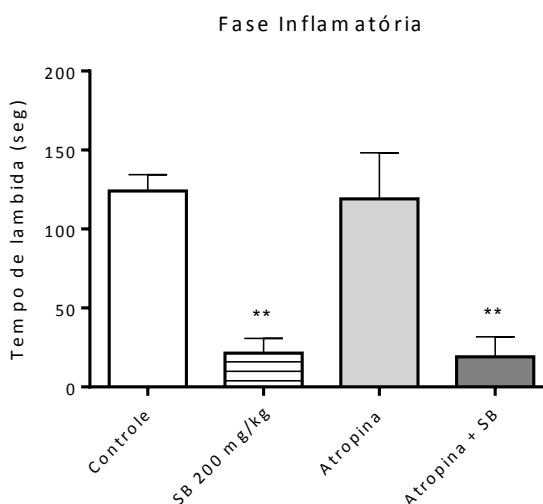
### 5.5.3. Possível participação dos receptores colinérgicos muscarínicos

Na fase neurogênica do teste da formalina o SB 200 mg/kg ( $86,2 \pm 3,6$  s) e a atropina 1 mg/kg ( $68,0 \pm 7,6$  s) não alteraram o comportamento nociceptivo dos animais em relação ao grupo controle ( $84,2 \pm 13,4$  s). Também não houve alteração deste parâmetro quando os animais foram pré-tratados com atropina e tratados com SB ( $54,8 \pm 6,7$  s) (Figura 16).



**Figura 16.** Efeito do pré-tratamento com atropina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak).

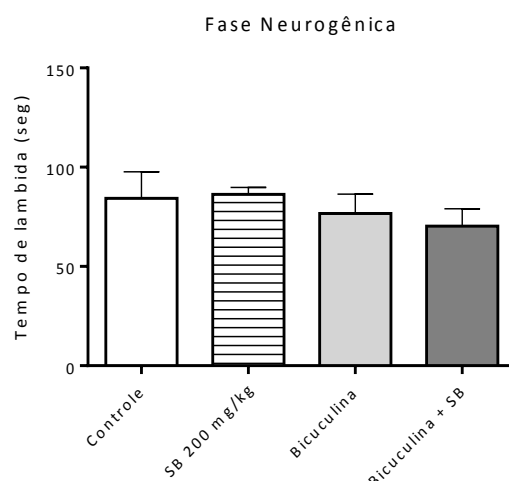
Na fase inflamatória do teste o SB ( $21,3 \pm 9,4$  s) reduziu o tempo de lambida da pata em relação ao grupo controle ( $124,0 \pm 10,4$  s), sendo que este efeito não foi revertido pelo pré-tratamento com atropina ( $19,1 \pm 12,5$  s). A atropina administrada isoladamente ( $119,1 \pm 29,1$  s) não alterou a resposta nociceptiva dos animais (Figura 17).



**Figura 17.** Efeito do pré-tratamento com atropina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak). \*\* $p < 0,01$  vs controle.

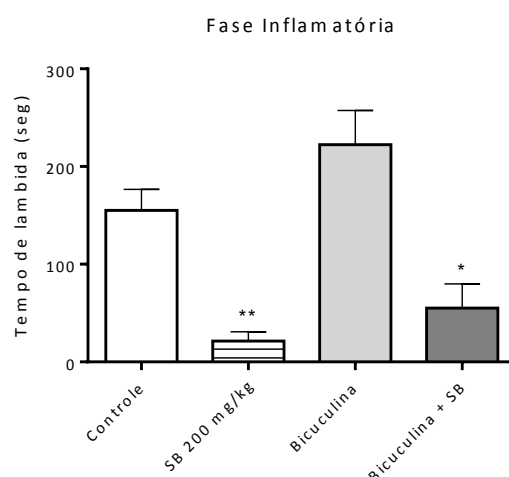
#### 5.5.4. Possível participação dos receptores GABA<sub>A</sub>

Na fase neurogênica do teste da formalina os tratamentos com SB 200 mg/kg ( $86,3 \pm 3,6$  s) e bicuculina 1 mg/kg ( $76,7 \pm 9,8$  s) não alteraram a resposta nociceptiva dos animais em relação ao grupo controle ( $84,3 \pm 13,4$  s). O pré-tratamento com bicuculina ( $70,2 \pm 8,8$  s) também não alterou este parâmetro (Figura 18).



**Figura 18.** Efeito do pré-tratamento com bicuculina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak).

O SB ( $21,3 \pm 9,4$  s) reduziu significativamente a resposta nociceptiva dos animais na fase inflamatória do teste, quando comparado ao grupo controle ( $155,0 \pm 21,7$  s). Este efeito não foi revertido pelo pré-tratamento com bicuculina ( $55,0 \pm 24,9$  s). A bicuculina isoladamente ( $222,4 \pm 34,9$  s) não alterou o tempo de lambida da pata dos animais (Figura 19).



**Figura 19.** Efeito do pré-tratamento com bicuculina (1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com SB (200 mg/kg, i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina. Os valores são expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). (ANOVA seguido pelo *Post Hoc* de Sidak). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs controle.

***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

A triagem farmacológica comportamental apoia-se no conceito básico de que drogas psicoativas promovem modificação da atividade cerebral em animais de laboratório, que, de forma prática, pode ser caracterizada pelo registro de alguns sinais ou alterações de condutas por eles apresentados. Embora essa metodologia permita somente uma avaliação qualitativa dos efeitos, ela tem-se apresentado bastante útil na detecção preliminar de novos compostos com potencial atividade sobre o SNC (ALMEIDA, OLIVEIRA, 2006).

Vasconcelos (2012) estimou que a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) do SB administrado por via oral (v.o.) é maior do que 1000 mg/kg e também caracterizou o efeito anti-inflamatório dessa substância na dose de 200 mg/kg (v.o.). Baseando-se nesses estudos, foi investigado se a dose de 200 mg/kg, administrada por diferentes vias, também seria capaz de induzir alterações sobre o SNC de camundongos.

Quando administrado por via oral o SB não apresentou efeitos psicofarmacológicos, porém a administração intraperitoneal diminuiu ambulação, comportamento de levantar e tempo de autolimpeza, alterações comportamentais indicativas de droga psicoléptica, ou seja, depressora do SNC (ALMEIDA, OLIVEIRA, 2006).

O SB é o produto da esterificação do ácido salicílico com o monoterpeneo (-)-borneol. Uma extensa revisão de literatura realizada por Stockman (1888) evidencia uma grande quantidades de efeitos do borneol sobre o SNC de animais, destacando-se letargia, sedação, perda de coordenação motora, anestesia, cessação da respiração, perda de reflexos e inibição de nervos motores. O resultado da triagem farmacológica comportamental demonstra que o efeito depressor do borneol pode estar sendo preservado mesmo após a esterificação com o ácido salicílico. Porém, outros estudos que comprovem estes efeitos ainda são necessários.

Fármacos administrados por via intraperitoneal apresentam maior biodisponibilidade em relação à administração oral. A injeção intraperitoneal é um procedimento comumente utilizado em experimentação animal, mas raramente aplicado na clínica. A cavidade peritoneal oferece grande superfície de absorção a partir da qual as substâncias entram rapidamente na circulação e conseqüentemente exercem seus efeitos (VALLE, 1991). O SB pode não ter apresentado efeito quando administrado pela via oral por estar menos biodisponível no sítio de ação devido à interferência de vários fatores, tais como: polaridade e capacidade de ionização da substância, que interfere no transporte através das membranas, ação do pH gástrico e enzimas digestivas, irregularidades na absorção ou propulsão intestinal, degradação por enzimas da flora intestinal e metabolismo hepático de primeira passagem (BUXTON, 2010). Vários estudos têm



demonstrado que substâncias administradas por via intraperitoneal apresentam efeitos farmacológicos e tóxicos mais intensos do que a administração via oral na mesma dose (GERASIMOV, 2000; AL-ALI, 2008; TUBARO, 2003).

Uma vez que o SB (200 mg/kg) apresentou perfil de droga psicoléptica apenas quando administrado por via intraperitoneal e tendo em vista a utilização racional de animais de laboratório, decidiu-se utilizar somente esta via nas experimentações subsequentes. Além disso, nos testes seguintes, foram adicionadas duas doses proporcionalmente menores (100 e 50 mg/kg), para detectar um possível efeito dose-dependente.

Para investigar o possível efeito antinociceptivo do SB foi realizado o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, que produz um estímulo nociceptivo químico em nível periférico com componente medular; o teste da formalina, que permite distinguir se o efeito antinociceptivo da substância-teste envolve mecanismos centrais ou periféricos; e o teste da placa quente, específico para analgésicos de ação central.

O ácido acético, ao ser administrado na cavidade peritoneal de camundongos, dissocia-se, liberando íons  $H^+$ , que interagem diretamente com canais iônicos presentes na superfície das terminações nervosas sensoriais, alterando a excitabilidade neuronal (JULIUS, 2001). Desse modo, o estímulo nociceptivo químico é conduzido ao SNC e em resposta ao mesmo o animal apresenta contorções abdominais características, seguidas da extensão das patas posteriores (KOSTER, 1959).

Além disso, o ácido acético promove a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$ , derivadas do metabolismo do ácido araquidônico (DERAEDT, 1980; ALMEIDA, OLIVEIRA, 2006),  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$ , liberadas por macrófagos e mastócitos peritoneais (RIBEIRO, 2000; BASTOS, 2006), os quais também são capazes de sensibilizar e estimular os neurônios aferentes primários, promovendo um aumento da liberação dos neurotransmissores excitatórios aspartato e glutamato no fluido cérebro-espinhal (FENG, 2003). Receptores vaniloides também estão envolvidos na nocicepção induzida pelo ácido acético (IKEDA, 2001).

O SB nas doses de 100 e 200 mg/kg (i.p.) diminuiu o número total de contorções abdominais e aumentou o tempo de latência para a ocorrência da primeira contorção, caracterizando o SB como uma droga potencialmente antinociceptiva. Este resultado pode ser pelo menos parcialmente explicado pelo efeito anti-inflamatório do SB (VASCONCELOS, 2012).

Capim (2013) demonstrou o efeito antinociceptivo do ácido acetilsalicílico (AAS) no teste do ácido acético e evidenciou que a esterificação do AAS com o álcool denominado ( $\pm$ )-

cis-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methanol, resultou em um produto com potência antinociceptiva duas vezes superior ao AAS. Além disso, os produtos da esterificação de outros AINES como indometacina, ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco com o mesmo álcool, originaram ésteres com potência antinociceptiva cerca de 10 vezes superior aos seus precursores. José (2008) também promoveu modificações estruturais na molécula do ácido 5-aminosalicílico, obtendo compostos com potência antinociceptiva semelhante ao composto de origem, porém com características farmacocinéticas melhoradas.

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético apresenta uma elevada sensibilidade, porém baixa especificidade. Agentes anti-inflamatórios, narcóticos, sedativos, antidepressivos tricíclicos, anticolinérgicos e anti-histamínicos se mostraram eficazes em inibir as contorções abdominais, gerando resultados falso-positivos (YEH, 1986; TAKAHASKI, 1987; ALEXANDRE-MOREIRA, 1999; BASTOS, 2006). Para melhor caracterizar o efeito apresentado pelo SB no teste do ácido acético, foi realizado o teste da formalina.

No teste da formalina é possível avaliar a resposta do animal a uma dor moderada e contínua, gerada por injúria tecidual. Por se tratar de um modelo de dor “tônica”, pode-se avaliar a dor considerando seus mecanismos modulatórios disparados pelo próprio estímulo algico. É o modelo mais válido para a avaliação de dor clínica, sobressaindo-se dos testes que empregam estímulos térmicos e mecânicos (TJØLSEN, 1992). Dubuisson (1977) reportou que a injeção de formalina em humanos provocou dor ardente e latejante no local da aplicação, cuja intensidade variou no tempo de maneira correspondente às alterações comportamentais observadas em animais.

Este modelo foi inicialmente proposto para avaliar a dor em gatos e ratos (DUBUISSON, 1977) e posteriormente adaptado para camundongos (HUNSKAAR, 1985). Estes estudos descreveram a ocorrência de duas fases distintas no comportamento nociceptivo apresentado pelos animais, nas quais a quantificação da dor é baseada no tempo total que o animal passa lambendo a pata lesionada. A primeira fase ocorre imediatamente após a administração intraplantar da formalina e dura cerca de 5 minutos, enquanto a segunda fase ocorre no intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção. Mais tarde, os mesmos pesquisadores sugeriram a participação de mecanismos nociceptivos distintos para cada fase, sendo a primeira desencadeada por uma ação direta da formalina sobre os nociceptores (fase neurogênica), e a segunda fase referente a uma resposta inflamatória (HUNSKAAR, 1986; HUNSKAAR, 1987).

A resposta nociceptiva na primeira fase do teste envolve a estimulação direta de neurônios aferentes primários, através da ativação de receptores TRPA1 em fibras do tipo C (MCNAMARA, 2007), promovendo a liberação de substância P, bradicinina, glutamato,

peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e GABA no corno dorsal da medula espinhal, sendo estas substâncias responsáveis pela indução da resposta nociceptiva do animal (SHIBATA, 1989; KANEKO, 1997; SEVOSTIANOVA, 2003; SHIELDS, 2010).

Uma interfase de 10 minutos é observada entre a primeira e segunda fase do teste, período no qual o animal não manifesta comportamento indicativo de nocicepção e constata-se uma diminuição da atividade das fibras C, além da ativação de processos inibitórios, como a liberação do neurotransmissor GABA que tem como alvo de atuação o receptor GABA<sub>A</sub> na medula espinhal (KANEKO, 1997).

Na segunda fase ocorre predominantemente a liberação de mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina, aminas simpaticomiméticas, TNF- $\alpha$  e interleucinas (MURRAY, 1988; TORNOS, 1999; RUJJANAWATE, 2003; FERREIRA, 2006). Além disso, estudos evidenciam que as alterações eletrofisiológicas que ocorrem na medula espinhal durante a primeira fase são essenciais na manifestação da segunda fase, de tal modo que somente o processo inflamatório é insuficiente para causar a resposta comportamental exibida pelos animais (TJØLSEN, 1992).

Drogas de ação central, como os analgésicos opioides, são capazes de inibir ambas as fases do teste da formalina, enquanto drogas de ação periférica, como os AINES e os corticosteroides, inibem apenas a segunda fase (SHIBATA, 1989; SANTOS, 1994; FARSAM, 2000; ADEYEMI, 2004; RUJJANAWATE, 2003).

O SB nas doses de 100 e 200 mg/kg diminuiu o tempo de lambida da pata apenas na segunda fase do teste da formalina, demonstrando que esta substância apresenta efeito anti-inflamatório, mas é destituída de efeito antinociceptivo central.

Os resultados obtidos no teste do ácido acético e no teste da formalina corroboram o estudo realizado por Vasconcelos (2012), no qual o efeito anti-inflamatório do SB foi caracterizado pela redução dos edemas de pata induzidos por carragenina, prostaglandina E<sub>2</sub> e bradicinina, diminuição da permeabilidade vascular induzida por ácido acético, redução da migração de neutrófilos e da liberação de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  (*in vivo*) e óxido nítrico (*in vitro*).

Considerando os dados até então discutidos o SB tem apresentado efeitos muito semelhantes aos fármacos denominados anti-inflamatórios não-esteroidais (VITALE, 1998; CAPIM, 2013; BURKE, 2010), podendo-se atribuir tais efeitos à estrutura química proveniente do ácido salicílico na molécula estudada. Alterações no grupo carboxila do ácido salicílico podem originar sais, ésteres ou amidas que preservam os efeitos anti-inflamatórios e reduzem os efeitos colaterais (KOROLKOVAS, 1988).

O borneol é usado para induzir analgesia e anestesia na medicina tradicional chinesa e japonesa (HATTORI, 2000), possuindo também efeito sedativo e anticonvulsivante (FANG, 2002). (+)-Borneol induz leve sedação pela via inalatória (BUCHBAUER, 1993) e é indicado para tratar dores abdominais (Wang, 2006). Li (2012) demonstrou que esta substância inicialmente aumenta e depois reduz a excitabilidade neuronal de camundongos. Além disso, estudos eletrofisiológicos *in vitro* mostraram que (+)- e (-)-borneol são capazes de ativar diretamente receptores GABA<sub>A</sub>, com eficácia superior ao diazepam (Granger, 2005). O borneol pode melhorar a penetração de outras drogas no SNC (ZHENG, 2008; ZHANG, 2011).

Estas evidências sugerem um possível efeito do SB sobre o SNC. Wang (2009) demonstrou o efeito antinociceptivo central do (+)-borneol no teste da placa quente em camundongos. Para comprovar a ausência do efeito antinociceptivo central do SB observado do teste da formalina, avaliou-se o efeito desta substância no teste da placa quente.

Neste teste, utiliza-se a temperatura como estímulo nociceptivo. Este modelo foi descrito inicialmente por Woolfe (1944) e é um teste seletivo para detecção de drogas analgésicas com efeito central (ANKIER, 1974). A placa é aquecida à temperatura constante ( $53 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e provoca respostas comportamentais, como lambida da pata traseira ou tentativa de pular (NEMIROVSKY, 2001; ORLANDI, 2011), consideradas como respostas nociceptivas integradas supraespinhalmente (ARAÚJO, 2009). Estas respostas são mediadas pela ativação de receptores vaniloides, especificamente os receptores VR-1 (limiar de ativação =  $43^{\circ}\text{C}$ ) e VRL-1 (limiar de ativação =  $52^{\circ}\text{C}$ ), presentes em fibras C e A $\delta$ , que conduzem o estímulo nocivo ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais (DICKENSON, 1997; JULIUS, 2001).

Nos intervalos de 30 e 60 minutos após a administração, o SB em todas as doses testadas não aumentou a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico, não apresentando, portanto, efeito antinociceptivo central. Porém, no intervalo de 120 após o tratamento a dose de 100 mg/kg aumentou este parâmetro.

Alguns estudos demonstram que antagonistas narcóticos e analgésicos não-narcóticos apresentaram efeito antinociceptivo no teste da placa quente à  $55^{\circ}\text{C}$  (BROGDEN, 1984; CREPAX, 1963; WOOLFE, 1944). Analgésicos suaves podem apresentar efeito no teste da placa quente em temperaturas igual ou inferiores a  $50^{\circ}\text{C}$  (TABER, 1974). Ankier (1974) detectou o efeito antinociceptivo no AAS e do paracetamol na placa quente a  $50^{\circ}\text{C}$ , sendo inativos em temperaturas superiores. Além da sensibilidade à temperatura, a variabilidade dos resultados é a maior dificuldade com este teste, sendo que a latência de resposta de animais controle variam consideravelmente entre os centros de pesquisa e até mesmo dentro de um

mesmo laboratório (VIERCK, 1984). Hunskaar (1986) demonstrou que a utilização de uma placa quente com aquecimento gradual de 2,5°C por minuto é mais sensível na detecção de analgésicos não-narcóticos, como AAS e paracetamol, do que aquelas placas com temperaturas fixas.

Considerando os dados acima citados, o fato do SB ter apresentado efeitos farmacológicos nos testes anteriores no intervalo de 30 minutos após o tratamento e não ter apresentado efeito na fase neurogênica do teste da formalina, não considera-se o resultado obtido no teste da placa quente aos 120 minutos como um efeito antinociceptivo central, podendo este ter sido surgido por um efeito periférico, que pode em alguns casos ser detectado na placa quente. Desse modo, observa-se que o borneol, ao ser esterificado, perde seu efeito antinociceptivo central, conforme evidenciado por Wang (2009). O efeito anti-inflamatório característico dos salicilatos parece ser preservado.

Kubinyi (2004) destaca que o grupo farmacofórico de álcoois bioativos pode estar relacionado à capacidade do átomo de oxigênio em formar ligações de hidrogênio. Relata ainda que átomos de oxigênio  $sp^3$  em grupos ésteres praticamente perdem a capacidade de formar tais tipo de ligações. Desse modo, o efeito do borneol pode estar sendo prejudicado devido à esterificação, o que impediria o mesmo de estabelecer ligações de hidrogênio e exercer seus efeitos sobre o SNC.

Tendo caracterizado o SB como uma droga com efeito antinociceptivo periférico, passou-se à etapa de investigação dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Para tanto, foram utilizados antagonistas e inibidores enzimáticos como ferramentas farmacológicas no teste da formalina, por se tratar de um teste mais específico e bastante sensível a drogas anti-inflamatórias. Para o estudo dos mecanismos de ação foi selecionada a dose de 200 mg/kg do SB, por ter apresentado os resultados mais significativos nos testes até então realizados.

A sensação dolorosa pode ser dividida em quatro componentes: transdução, modulação, transmissão e percepção. Diversos estudos têm mostrado que sistemas de neurotransmissores, como o oxidonitrérgico, GABAérgico, glutamatérgico, opióide, colinérgico, serotoninérgico, adrenérgico, dopaminérgico, canabinóides, entre outros podem agir de diferentes maneiras durante o processo doloroso, tornando a dor um fenômeno muito complexo (XIE, 2009). Substâncias sintéticas ou naturais com propriedades analgésicas podem atuar em algum destes componentes para promover analgesia (HESS, 2010).

Vasconcelos (2012) reportou que o SB foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico (NO) em culturas de macrófagos peritoneais estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Esta

evidência despertou o interesse de investigar a possível participação do NO no efeito antinociceptivo do SB observado no teste da formalina.

As enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) metabolizam o aminoácido L-arginina convertendo-o em citrulina e NO. Três isoformas da NOS foram identificadas: 1) NOS endotelial (eNOS), expressa no endotélio dos vasos sanguíneos; 2) NOS neuronal (nNOS), expressa constitutivamente em neurônios, células musculares cardíacas e esqueléticas e 3) NOS induzível (iNOS), expressa em macrófagos e outros tipos celulares através da ativação por estímulos pró-inflamatórios (VITECEK, 2012).

O NO exerce inúmeras funções fisiológicas no organismo, destacando-se sua ação como neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico (GARTHWAITE, 1991). Kawabata (1994) demonstrou que o NO tem efeito nociceptivo em baixas concentrações e antinociceptivo em altas concentrações, sendo que estes efeitos foram revertidos na segunda fase do teste da formalina pela N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME), um inibidor reversível competitivo inespecífico das NOS (VITECEK, 2012). Estudos realizados pelo Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) evidenciaram tanto efeito nociceptivo no teste do ácido acético (BENEDITO, 2013) quanto antinociceptivo no teste da formalina (SALVADORI, 2013) de inibidores da NOS. Estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com L-arginina.

Vários outros estudos têm demonstrado a participação do NO na nocicepção central e periférica, utilizando os testes das contorções abdominais, formalina, placa quente e hiperalgesia induzida por glutamato (FERREIRA, 1991; MALMBERG, 1993; ZAKARIA, 2005; ZACARIA, 2006), porém os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem ainda não estão bem esclarecidos.

O pré-tratamento com L-arginina não reverteu o efeito antinociceptivo induzido pelo salicilato de bornila na segunda fase do teste da formalina, como ocorreu com os animais pré-tratados com L-arginina e tratados com N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG – inibidor competitivo reversível inespecífico da NOS). Estes dados sugerem que a via L-arginina-óxido nítrico não está envolvida na antinocicepção induzida pelo SB. Pode-se sugerir ainda que o efeito do SB, nas condições experimentais testadas, não ocorre pela diminuição da produção de NO por macrófagos no tecido inflamado (*in vivo*), conforme demonstrado por Vasconcelos (2012) *in vitro*.

Outra via importante na modulação da nocicepção é a do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que está diretamente relacionada com a via do NO. Este é capaz de ativar a enzima ciclase de guanilil solúvel (CG<sub>s</sub>), que converte guanosina trifosfato (GTP) em GMPc e

fosfato inorgânico ( $P_i$ ) (DUARTE, 1990). O azul de metileno é reconhecido por ser um inibidor seletivo da  $CG_s$ , bloqueando os efeitos do NO (GARTHWAITE, 1991).

O azul de metileno pode modular vários mecanismos nociceptivos como diminuir a hiperalgesia induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA) no teste de retirada de cauda (MELLER, 1992), potencializar efeitos narcóticos centrais (XU, 1995) e bloquear antinocicepção periférica induzida por analgésicos opioides (FERREIRA, 1991).

Salvadori (2013) conseguiu demonstrar o envolvimento da via  $GMPc$  no efeito antinociceptivo do (-)-mirtenol, através da reversão do seu efeito pelo azul de metileno (20mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.

Diferindo do estudo anteriormente citado, os animais pré-tratados com azul de metileno (AM) e tratados com SB apresentaram redução do comportamento nociceptivo na primeira fase do teste da formalina. Na fase inflamatória o azul de metileno, o SB e a combinação de ambos também demonstraram efeitos antinociceptivos. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Abacioglu (2000), que evidenciou o efeito antinociceptivo do AM no teste das contorções abdominais induzidas por p-benzoquinona. Zakaria (2005) além de evidenciar este mesmo efeito, demonstrou que o pré-tratamento com o AM potencializa o efeito antinociceptivo do ácido acetilsalicílico (AAS), que apresenta estrutura química semelhante ao SB.

A antinocicepção induzida pelo AM indica a importância da via do  $GMPc$  na transmissão do impulso nociceptivo no teste utilizado. Sendo esta via importante na dor, o bloqueio dela leva à redução da sensação dolorosa, o que explicaria o aumento dos efeitos antinociceptivos do SB e do AAS pelo AM. Desse modo, não se pode afirmar que a antinocicepção induzida pelo SB é mediada por  $GMPc$ , uma vez que o efeito observado pode ser resultado de um efeito aditivo ou sinérgico das duas drogas.

Park (2003) demonstrou que o borneol inibe receptores colinérgicos nicotínicos de maneira não-competitiva *in vitro*. O aumento dos níveis de acetilcolina intraespinhal durante a analgesia induzida por anti-inflamatórios não-esteroidais, como o AAS, também é conhecido (ABELSON, 2004). Baseado nestas evidências decidiu-se investigar a participação do sistema colinérgico na antinocicepção induzida pelo SB.

A antinocicepção induzida pela administração sistêmica de morfina pode ser antagonizada pela administração intratecal de antagonistas muscarínicos (TAGUCHI et al., 1999). Vários estudos demonstraram a capacidade da atropina, um antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, em reverter os efeitos antinociceptivos centrais e

periféricos de drogas em vários modelos animais, tais como: ácido acético, formalina e placa quente (PEANA, 2003; PEANA, 2004; HESS, 2006).

A atropina não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do SB na segunda fase do teste da formalina, sugerindo que o SB exerce seu efeito independente do sistema colinérgico muscarínico.

Granger (2005) demonstrou que os isômeros (+)- e (-)-borneol são agonistas parciais de receptores GABA<sub>A</sub> *in vitro*. Já Yakushiji (1992) apresentou que anti-inflamatórios não-esteroidais, como a indometacina, podem modular a atividade de receptores GABA<sub>A</sub>, principalmente quando associados a quinolonas.

Kaneko (1997) evidenciou que a resposta nociceptiva dos animais na segunda fase do teste da formalina também envolve a modulação de receptores GABA<sub>A</sub>. Além disso, estudos têm mostrado que a bicuculina, um antagonista seletivo de receptor GABA<sub>A</sub>, é capaz de reverter o efeito antinociceptivo induzido por drogas no teste da formalina (SANTOS, 1999; GADOTTI, 2009). Surgiu então o interesse de investigar se o efeito antinociceptivo do SB estaria relacionado à ativação desses receptores.

O pré-tratamento com bicuculina não reverteu o efeito antinociceptivo do SB na segunda fase do teste da formalina, evidenciando que este efeito não é mediado pela ativação de receptores GABA<sub>A</sub>.

A antinocicepção induzida pelo SB pode estar envolvida com outras vias modulatórias da dor, como: receptores de adenosina, receptores adrenérgicos, opiídeos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, canabinóides, glutamatérgicos, canais de potássio sensíveis ao ATP, entre outros. Estudos ainda são necessários para melhor esclarecer o mecanismo pelo qual ocorre o efeito antinociceptivo do salicilato de bornila.

Considerando todos os resultados apresentados, o salicilato de bornila apresentou perfil de droga depressora do SNC e antinociceptiva periférica (anti-inflamatória), corroborando os estudos realizados por Vasconcelos (2012). Nas condições experimentais testadas, este efeito não parece estar envolvido com a via L-arginina-NO-GMPc nem com a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos e GABA<sub>A</sub>.



## ***CONCLUSÕES***

---

## 7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O salicilato de bornila apresentou perfil de droga depressora do SNC na triagem farmacológica comportamental;
- O salicilato de bornila apresentou efeito antinociceptivo no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- O efeito antinociceptivo do salicilato de bornila parece não envolver mecanismos centrais, mas envolve mecanismos periféricos;
- O efeito antinociceptivo induzido pelo salicilato de bornila não demonstrou ser mediado por NO, GMPc, receptores colinérgicos muscarínicos nem receptores GABA<sub>A</sub>.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

- ABACIOGLU, N.; TUNÇTAN, B.; AKBULUT, E.; ÇAKICI, I. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. **Life Sciences**, v. 67, p. 1127-1137, 2000.
- ABELSON, K. S.; KOMMALAGE, M.; HOGLUND, A. U. Spinal cholinergic involvement after treatment with aspirin and paracetamol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 16, n. 368, p. 116-120, 2004.
- 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.
- AL-ALI, A.; ALKHAWAJAH, A. A.; RANDHAWA, M. A.; SHAIKH, N. A. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 20(2), p. 25-27, 2008.
- 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**, cap. 11, p. 131-137, 2006.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 3-4, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 11, p. 131-137, 2006.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, 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.
- ARAÚJO, F.L.O.; MELO, C.T.V.; ROCHA, N.F.M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J. C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v.380, p.337-344, 2009.
- BAIN, L. S., BURT, R.A.P. The treatment of rheumatoid disease. A double-blind trial comparing buffered aspirin with benorylate. **Clinical Trials Journal**, v. 7 (2), p. 307-312, 1970.
- BARREIRO, EJ; FRAGA, CAM. Química Medicinal. Porto Alegre: **Artmed**, 2001.

BASBAUM, A.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E. R.; SCHAWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neuroscience**. 4. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

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 angulate* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 241-245, 2006.

BENEDITO, R. B. Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (S)-(-)-álcool perílico em camundongos. **Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba**, 2013.

BENNETT MI, SMITH BH, TORRANCE N, LEE AJ. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v. 122(3), p. 289-94, 2006.

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

BRASIL. PORTARIA Nº 1083, DE 02 DE OUTUBRO DE 2012 (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica). **Ministério da Saúde**. 2012.

BREDER, C.; SAPER, C.B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Research**, v.713, p.64-69, 1996.

BROGDEN, R.N., HEEL, R.C., SPEIGHT, T.M. AND AVERY, G.S. Piroxicam. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 28, p. 292-323, 1984.

BUCHBAUER G, JIROVETZ L, JAGER W, PLANK C, DIETRICH H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 660–4, 1993.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos-antipiréticos, farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, J. S. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Porto Alegre: **Artmed and McGraw-Hill Education**, 2010.

BUXTON, I.L. Farmacocinética e Farmacodinâmica: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, J. S. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Porto Alegre: **Artmed and McGraw-Hill Education**, 2010.

CAPIM, S. L.; CARNEIRO, P H. P.; CASTRO, P. C.; BARROS, M. R. M.; MARINHO, B. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Design, Prins-cyclization reaction promoting diastereoselective synthesis of 10 new tetrahydropyran derivatives and in vivo antinociceptive evaluations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 1-11, 2012.

CAPIM, S. L.; GONÇALVES, G. M.; SANTOS, G. C. M.; MARINHO, B. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. High analgesic and anti-inflammatory in vivo activities of six new hybrids NSAIDs tetrahydropyran derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6003–6010, 2013.

CARDOE, N. The treatment of rheumatoid disease. Preliminary assessment of a new drug: Benorylate. **Clinical Trials Journal**, v. 7 (2), p. 313-318, 1970.

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

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

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

CREPAX, P.; SILVESTRINI, B. Experimental evaluation in laboratory animals of anti-inflammatory analgesic drugs. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 101, p. 444-457, 1963.

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

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

DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 289, 1990.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DUGOWSON, CE; GNANASHANMUGAM, P. Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 17, p. 347–354, 2006.

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

FANG, Y. Q.; ZOU, Y. Y.; LI, L. Effects of FXKQY and QTY on CNS excitability. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 18, p. 40–42, 2002.

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.

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

FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. G.; OLIVEIRA, P. M.; ALVES, R. B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A. O.; RASLAN, D. S.; CASTRO, M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 148-153, 2006.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, p. 121-122, 1991.

FOOD AND DRUGS ANALYSIS. **Analyst**, v. 39, n. 465, 1914.

GADOTTI, V. M. Análise dos mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina em camundongos e ratos: estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*. Tese de Doutorado: Curso de Pós-graduação em Neurociências. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2009.

GARTHWAITE, J. Glutamate, Nitric Oxide and Cell-cell Signaling in the Nervous System. **Trends in Neurosciences**, v. 14, p. 60 – 67, 1991.

GERASIMOV, M. R.; FRANCESCHI, M.; VOLKOW, N. D.; GIFFORD, A.; GATLEY, S. J.; MARSTELLER, D.; MOLINA, P. E.; DEWEY, S. L. Comparison between Intraperitoneal and Oral Methylphenidate Administration: A Microdialysis and Locomotor Activity Study. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 51–57, 2000.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN, J.R.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A.W. Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.

GOUDET, C.; MAGNAGHI, V.; LANDRY, M.; NAGY, F.; GEREAU, R.W.; PIN, J. P. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Research**, v. 60, p. 43-56, 2009.

GRANGER, RE; CAMPBELL, EL; JOHNSTON, GAR. (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$  GABA<sub>A</sub> receptors. **Biochemical pharmacology**, v. 69, p. 1101-1111, 2005.

GROPPO, F. C. BERGAMASCHI, C. C. COGO, K. FRANZ-MONTAN, M. MOTTA, R. H. L. ANDRADE, E. D. Use of Phytotherapy in Dentistry. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 993–998, 2008.

GUTSTEIN, HB; AKIL, H. 2010. Analgésicos opióides. In: Brunton, LL *et al.* Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. Porto Alegre: **Artmed and McGraw-Hill Education**. p. 487-526, 2010.

HATTORI A. Camphor in the Edo era-camphor and borneol for medicines. **Yakushigaku Zasshi**, v. 35, p. 49-54, 2000.

HESS, S. Atividade antinociceptiva do ácido mirsinóico B. Dissertação de Mestrado: Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas. **Universidade do Vale do Itajaí**, 2006.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L. C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; SOUZA, M. M. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by myrsinoic acid B. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 209-215, 2010.

HUNSKAAR S.; BERGE O. G.; HOLE K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**, v. 21, p. 101-108, 1986.

HUNSKAAR, S.; FASMER, 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.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, 2001.

JACK, DB. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, v. 350, p. 437-39, 1997.

JENSEN, T.S.; KREBS, B.; NIELSEN, J.; RAMMUSSEN, P. Immediate and long term phantom limb pain in amputees incidence, clinical characteristics and relationship to preamputation limb pain. **Pain**, v. 21, p. 267-78, 1985.

JOSÉ, C.; ROSALES-HERNÁNDEZA, M. C.; EDUARDO, R. J.; ABIGAILA, B.; CARLOSA, Z. G.; FABILA-CASTILLOD, L. H.; JOSÉA, T. Synthesis and Theoretical Calculations of 5-Aminosalicylic Acid Derivatives as Potential Analgesic Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 25-29, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

KANEKO, M.; HAMMOND, D. L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 2, p. 928-938, 1997.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1988.

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

KUBINYI, H. Changing paragigms in drug discovery. **The Chemical Theatre of Biological Systems**. Bozen, Italy, 2005.

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

LEWIS, R. J. Synonym cross-index. In: (Ed.). **Hazardous Chemicals Desk Reference: John Wiley and Sons, Inc.**, p. 1478-1945. ISBN 9780470335406, 2008.



LI, W; CHEN, R; YANG, L; HUANG, T; XU, Q; MI, S; WANG, N. Pharmacokinetics of natural borneol after oral administration in mice brain and its effect on excitation ratio. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 37, p. 39–44, 2012.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, p. 291-300, 1993.

MARKS, D.M.; SHAH, M.J.; PATKAR, A.A.; MASAND, P.S.; PARK, G.Y.; PAE, C.U. Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors for Pain Control: Premise and Promise. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 4, p. 331-336, 2009.

MARTIN, YC; KOFRON, JL; TRAPHAGEN, LM. Do structurally similar molecules have similar biological activity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4350-4358, 2002.

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.

MELLER, S.T., DYKSTRA, C. AND GEBHART, G.F. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, v. 214, p. 93-96, 1992.

MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. **American Journal of Medicine**, v. 75, p. 4-14, 1983.

MERSKEY H, BOGDUK N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: **International Association for the Study of Pain Press**, p. 210, 1994.

MILANO, J. Avaliação do potencial antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1h-pirazol metil ésteres inéditos em camundongos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica – **Universidade Federal de Santa Maria**, 2008.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

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

MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements in the mouse paw formalin test an animal model of tonic pain. **Journal Pharmacological Methods**, v. 20, p. 175-186, 1988.

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

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

ORLANDI, L.; VILELA, F. C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; DIAS, D. F.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1469-1476, 2011.

PARK, T; PARK, Y; LEE, T; HA, H; KIM, K. Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 83-90, 2003.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(1A), p. 140-149, 2009.

PATRICK, GL. An introduction to Medical Chemistry. **University Press**, 1997.

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.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; SPANO, M. T.; D'AQUILA, P. S.; PIPPIA, P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, p. 165-174, 2004.

PERIMAL, E.K.; AKHTAR, M.N.; MOHAMAD, A.S.; KHALID, M.H.; MING, O.H.; KHALID, S.; TATT, L.M.; KAMALDIN, M.N.; ZAKARIA, Z.A.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M.R. Zerumbone-induced antinociception: involvement of the L-arginine-nitric oxide-cGMP-PKC-K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channel pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 108, p. 155-162, 2011.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical review. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71-80, 2007.

PIMENTA, C.A.M.; PORTNOI, A.G. Dor e cultura. In: CARVALHO, M.M. Dor: um estudo multidisciplinar. São Paulo: **Summus**, p. 159-173, 1999.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REITAN, J. F. Current concepts in managing cancer pain. **Drug Benefit Trends**, v. 8, p. 37-48, 1996.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

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

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. **Baltimore: Williams e Wilkins**, 1996.

ROZISKY, J. R.; MEDEIROS, L. F.; ADACHI, L. S.; ESPINOSA, J.; DE SOUZA, A.; SETTE NETO, A.; BONAN, C. D.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Morphine exposure in early life increases nociceptive behaviour in a rat formalin tonic pain model in adult life, **Brain Research**, 2010.

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.

SALVADORI, M. G. S. S. Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do (-)-mirtenol. Tese de Doutorado: **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba**, 2013.

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.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive Properties of the New Alkaloid, *cis*-8,10-Di-*N*-Propyllobelidiol Hydrochloride Dihydrate Isolated from *Siphocampylus verticillatus*: Evidence for the Mechanism of Action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 417-426, 1999.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários, cap. 16, p. 403-434. In: SIMÕES, C. M. .O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, G. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVIK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Forianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, 2004.

SCHESTATSKY P, NASCIMENTO OJ. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67(3A), p. 741-9, 2009.

SEVOSTIANOVA, N.; ZVARTAU, E.; BESPALOV, A.; DANYSZ, W. Effects of morphine on formalin-induced nociception in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, p. 109-113, 2003.

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

SHIELDS, S. D.; CAVANAUGH, D. J.; LEE, H.; ANDERSON, D. J.; BASBAUM, A. I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, p. 422-429, 2010.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N.; ARCANJO, D. D. Investigation of Mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 22, 2011.

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

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

STOCKMAN, R. The physiological action of borneol. A contribution to the pharmacology of the camphor group. **The Journal of Physiology**, v. 9, n. 2-3, p. 65-91, Aug 1888.

STUCKY, C.L.; GOLD, M.S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 11845-6, 2001.

TABER, R.I. Predictive value of analgesic assays in mice and rats, In: Braude, M. C.; Harris, L. S.; May, E. L.; Smith, J. P.; Villarreal, J. E. Narcotic Antagonists. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, vol. 8, **Raven Press**, New York, p. 191-211, 1974.

TAGUCHI, K.; KATO, M.; ABE, K.; CHIKUMA, T.; UTSUNOMIYA, I.; MIYATAKE, T. The effects of morphine-induced increases in extracellular acetylcholine levels in the rostral ventrolateral medulla of rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 1539-1544, 1999.

TEIXEIRA, M.J., SHIBATA, M.K., PIMENTA, C.A.M., CORRÊA, C.F. Dor no Brasil: estado atual e perspectivas. São Paulo: **Limay**, 196 p., 1995.

THOMAS, M. R. Salicylic and related compounds. In: (Ed.). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. **John Wiley and Sons, Inc.**, ISBN 9780471238966, 2000.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. (Ed.). *The pharmacology of pain*. Berlin: **Springer-Verlag**, p. 1-20, 1997.

TOLISSON, CD. Relief from Back Pain: The Tollison Program. **Gardner Press**, 1987.

TORNOS, M. P.; SÁENZ, M. T.; GARCÍA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A. Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 229-234, 1999.

TUBARO, A.; SOSA, S.; CARBONATTO, M.; ALTINIER, G.; VITA, F.; MELATO, M.; SATAKE, M.; YASUMOTO, T. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. **Toxicon**, v. 41, p. 783-792, 2003.

TURK, D.C., MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain, handbook of pain assessment. New York, **The Guilford Press**, p. 3-12, 1992.

VALLE, L. B. S. *Farmacologia Integrada: Fundamentos Farmacológicos da Terapêutica*. V. 1. Rio de Janeiro / São Paulo: **Atheneu**, 1991.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**. v. 110, p. 255-258, 2003.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 295-309, 2004.

VASCONCELOS, R. M. C.; LEITE, F. C.; LEITE, J. A.; MASCARENHAS, S. R.; RODRIGUES, L. C.; PIUVEZAM, M. R. Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory

effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. Early Online: p. 1–11, 2012.

VIERCK, C.J. AND COOPER, B.Y. Guidelines for assessing pain reactions and pain modulation in laboratory animal subjects. In: KRUGER, L.; LIEBESKIND, J. C. (Eds.), **Advances in Pain Research and Therapy**, vol. 6, Raven Press, New York, p. 305-322, 1984.

VILARDAGA, V. Mercado já cobiça espólio da Novalgina. **Gazeta Mercantil**. Edição de 22/05/2001.

VILELA FILHO, O.; CÔRREA, C. F. Neuroestimulação e dor. **Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, v. 6, p. 2-16, 1999.

VITALE, G.; PINI, L.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Effect of Acetylsalicylic Acid on Formalin Test and on Serotonin System in the Rat Brain. **General Pharmacology**, vol. 31, n. 5, p. 753–758, 1998.

VITECEK, J.; LOJEK, A.; VALACCHI, G.; KUBALA1, L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. **Mediators of Inflammation**. v. 2012, Article ID 318087, p. 1-22, 2012.

WANG, G.; WANG, L.; XIONG, Z.Y.; MAO, B.; LI, T. Q. Compound salviapellet, a traditional Chinese medicine, for the treatment of chronic stable angina pectoris compared with nitrates: a meta-analysis. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 1–7, 2006.

WANG, T.; ZHANG, R.; CHEN, C.; WU, H.; WU, Q.; WANG, N.; MI, S. Comparison on analgesic effect of (+)-bornyl monomaleate and natural borneol. **Zhongyao Yaoli Yu Linchuang**, v. 25, p. 53-54, 2009.

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

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.

XIE, Y. F.; HUO, F. Q.; TANG, J. S. Cerebral cortex modulation of pain. **Acta Pharmacologica Sinica**, p. 31-41, 2009.

XU, J. Y.; TSENG, L. F. Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in the spinal cord differentially modulates intracerebroventricularly administered morphine- and  $\beta$ -endorphin-induced antinociception in the mouse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, p. 8– 16, 1995.

YAKUSHIJI, T.; SHIRASAKI, T.; AKAIKE, N. Non-competitive inhibition of GABA<sub>A</sub> responses by a new class of quinolones and non-steroidal anti-inflammatories in dissociated frog sensory neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, p. 13-18, 1992.

ZAKARIA, Z. A.; SOMCHIT, M. N.; SULAIMAN, M. R.; JAIS, A. M. M.; FATIMAH, C. A. Effects of L-Arginine, L-NAME, Methylene Blue, and Their Combinations on *Corchorus olitorius* Aqueous Extract Antinociception in Mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 6, p. 430–439, 2006.

ZAKARIA, Z. A.; SULAIMANAC, M. R.; SOMCHITAC, M. N.; JAISAC, A. M. M.; ALIC. D. I. The effects of l-arginine, d-arginine, l-name and methylene blue on *channa striatus*–induced peripheral antinociception in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8(2), p. 199-206, 2005.

ZHANG, N.; LIU, P.; HE, X. Effect of single-used borneol and combining it with diazepam on content of neurotransmitter in corpus striatum of rats. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. v. 36(22), p. 3180-3, 2011.

ZHENG, C.; SHIXIANG, H.; YUANBO, L.; BINBIN, Z.; ZHAOXIANG, Y.; SHUGUANG, X. Effect of borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, p. 178–84, 2008.