

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

DIOGO VILAR DA FONSÊCA

O ORTO-EUGENOL APRESENTA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS

JOÃO PESSOA

2016

DIOGO VILAR DA FONSÊCA

O ORTO-EUGENOL APRESENTA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA

2016

DIOGO VILAR DA FONSÊCA

O ORTO-EUGENOL APRESENTA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador – UFPB

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
Examinador Interno - UFPB

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Examinador Interno - UFPB

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Examinador Externo - UFPB

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa
Examinador Externo - UFPB

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e à minha **Mãe Rainha Três Vezes Admirável**, os quais, em todas as horas de atribulações, motivaram-me para realização deste sonho tão desejado.

Aos meus pais, **Adroilton Fonsêca** e **Sônia Vilar** e a minha irmã, **Mariana Vilar**, por todo carinho e amor.

À minha esposa, **Emmanuella Arruda Feitosa Vilar**, pelo companheirismo e amor dedicado para que esse projeto fosse realizado.

A toda **minha família** pela disponibilidade de sempre quererem me ajudar sem medir esforços.

Ao meu mestre, Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o doutorado que ultrapassaram as barreiras da universidade.

A todos os professores desta pós-graduação pelos ensinamentos, em especial, às professoras **Bagnólia Araújo, Marianna Sobral e Isac Almeida de Medeiros**.

A Prof^a. Dr^a. **Márcia Regina Piuvezam**, pela parceira para a realização dos testes anti-inflamatórios.

A minha família Psicofarmacologia, em especial, Adriana Fernandes, Mirian Salvadori, Paula Salgado, Renan Marinho Braga, Ingrid Eulália Vieira de Farias, Cynthia Germoglio Farias de Melo, Marcelo Ricardo Dutra Caldas Filho pela amizade e pelos momentos de descontração, os quais tornaram essa caminhada mais leve e divertida;

Aos alunos de “ouro” de iniciação científica, **Humberto de Carvalho Aragão Neto e Terezinha Weyne Araújo Borges** do Nascimento pela atenção e disposição em ajudar.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

RESUMO

A capacidade do eugenol em reduzir a nocicepção e agir no processo inflamatório tem ganhado grande destaque na comunidade científica, surgindo o interesse em pesquisar se o orto-eugenol também possui essas mesmas atividades. Diante disso, surgiu interesse em pesquisar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do orto-eugenol e seus possíveis mecanismos de ação. A administração do veículo (Tween 80 mais água destilada), orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), morfina (10 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) aconteceram trinta minutos antes da realização dos testes farmacológicos. Os experimentos iniciaram com a triagem psicofarmacológica e determinação da DL50. O efeito do orto-eugenol sobre a coordenação motora de camundongos foi investigada no teste do Rota-rod. A atividade antinociceptiva foi avaliada utilizando testes químicos (teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da formalina e teste do glutamato) e térmico (teste da placa quente). Para estudar a participação do sistema adrenérgico, administrou-se o antagonista adrenérgico α_2 , ioimbina, quinze minutos antes da injeção do orto-eugenol no teste das contorções induzidas pelo ácido acético. O teste da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e o teste da peritonite foram utilizados para avaliar o efeito anti-inflamatório do orto-eugenol em camundongos. No teste da peritonite, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e as formas fosforiladas de NF- κ B e de p38 foram analisados no líquido peritoneal. Na triagem farmacológica comportamental, as diferentes doses testadas do orto-eugenol (200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg, i.p.) apresentaram alterações comportamentais psicodepressoras, tais como ambulação diminuída e, principalmente, analgesia. A DL50 foi de 307,5 mg/kg, com intervalo de confiança entre 212,1 e 446,0 mg/kg de peso corporal para camundongos machos e fêmeas. O pré-tratamento com o orto-eugenol não alterou a coordenação motora no teste do Rota-rod, mas reduziu o número de contorções abdominais, o tempo de lambida no teste do glutamato e ambas as fases do teste da formalina. O tempo de reação ao estímulo térmico foi significativamente aumentando no teste da placa quente, após a administração do orto-eugenol. O tratamento com a ioimbina reverteu o efeito antinociceptivo do orto-eugenol, sugerindo ativação do sistema adrenérgico. Nos testes anti-inflamatórios, o orto-eugenol inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético e a migração de leucócitos via redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β em virtude da supressão das formas fosforiladas de NF- κ B e p38 no teste da peritonite. Diante desses resultados, torna-se evidente, pela primeira vez o efeito antinociceptivo mediado pelo receptor adrenérgico α_2 e atividade anti-inflamatória por meio da regulação de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação de NF- κ B e p38.

Palavras-chaves: orto-eugenol, antinocicepção, inflamação, receptor adrenérgico, NF- κ B, p38

FONSECA, D. V. **Ortho-eugenol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activities.** 2016. 104p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB/CCS/ João Pessoa – PB.

ABSTRACT

Eugenol's ability to reduce nociception and act in the inflammatory process has gained great prominence in the scientific community, emerging interest in researching the ortho-eugenol also has these same activities. Researching ortho-eugenol's antinociceptive and anti-inflammatory activity, and its possible mechanisms of action is therefore of interest. The administration of vehicle, ortho-eugenol (50, 75 and 100 mg/kg i.p), morphine (10 mg/kg, i.p) or dexamethasone (2 mg/kg, s.c) occurred thirty minutes before the completion of pharmacological tests. The experiments started with psychopharmacological screening and determination of the LD50. The effect of ortho-eugenol on motor coordination in mice was investigated in the rota-rod test. The antinociceptive activity was assessed using chemical tests (test of writhing induced by acetic acid, formalin, test and glutamate) and thermal (hot plate test). To study the role of the adrenergic system, was administered α 2-adrenergic antagonist, yohimbine, fifteen minutes before the ortho-eugenol injection the test of writhing induced by acetic acid. The test vascular permeability induced by acetic acid and peritonitis test were used to assess the anti-inflammatory effects of ortho-eugenol in mice. In the test of peritonitis, the levels of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated forms of NF-kB and p38 were analyzed in peritoneal fluid. In the behavioral pharmacological screening, the different doses tested ortho-eugenol (200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg, i.p.)psicodepressoras showed behavioral changes such as decreased ambulation, and especially analgesia. The LD50 was 307.5 mg / kg, with a confidence interval between 212.1 and 446.0 mg / kg body weight for male and female mice. Pretreatment with ortho-eugenol did not change Rota-rod test coordination test results, but reduced the number of writhes and licking times in the glutamate assay. The reaction time from thermal stimulus was significantly increased in the hot plate test after administration of ortho-eugenol. Treatment with yohimbine reversed the antinociceptive effect of ortho-eugenol, suggesting involvement of the adrenergic system. In anti-inflammatory tests, ortho-eugenol inhibited acetic acid induced vascular permeability and leukocyte migration, reducing TNF- α and IL-1 β by virtue of its suppression of NF-kB and p38 phosphorylated forms in the peritonitis test. From these results, ortho-eugenol antinociceptive effects mediated by the adrenergic system and anti-inflammatory activity through regulation of proinflammatory cytokines and phosphorylation of NF-kB and p38 become evident for the first time.

Keywords: ortho-eugenol, anti-nociception, inflammation, adrenergic receptor, NF-kB, p38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Circuito nociceptivo.	19
Figura 3 - Aparelho da Placa Quente	33
Figura 2 - Aparelho do rota-rod.....	33
Figura 6 – Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do orto-eugenol.	34
Figura 7 - Efeito da administração do veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) na função psicomotora avaliada no teste do Rota-Rod.	47
Figura 8 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 6 mg/kg, i.p.) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	48
Figura 9 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 6 mg/kg, i.p.) sobre a latência para o surgimento da primeira contorção abdominal induzidas por ácido acético.....	49
Figura 10 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 10 mg/kg, i.p.) na primeira (A) e segunda (B) fase do teste da formalina.	50
Figura 11 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e MK-801 (0.15 mg/kg, i.p.) no teste da nocicepção induzida pelo glutamato.	51
Figura 12 - Efeito da administração do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR, 10 mg/kg , i.p.) no teste da placa quente.	52
Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com ioimbina (IOIM, 0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo orto-eugenol (O-EU, 100 mg/kg, i.p.), no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.	53
Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com ioimbina (IOIM, 0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo orto-eugenol (O-EU, 100 mg/kg, i.p.), sobre a latência para o surgimento da primeira contorção abdominal induzidas por ácido acético.....	53
Figura 15 - Efeito da administração do veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (2 mg/kg, s.c.) na permeabilidade peritoneal induzida por ácido acético.	54
Figura 16 - Efeito da administração do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e da dexametasona (DEXA, 2 mg/kg , s.c.) sobre a migração de leucócitos totais na peritonite induzida por carragenina.....	55
Figura 17 - Efeito do orto-eugenol na expressão de p-NF- κ B (A) e p-p38 (B) em leucócitos migrados para cavidade peritoneal após 4 horas da estimulação com caragenina. Os camundongos foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (75 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg , s.c.) trinta minutos antes da injeção do estímulo flogístico.....	56
Figura 18 - Efeito do orto-eugenol nos níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B) na cavidade peritoneal após quatro horas da administração de carragenina intraperitoneal. Os camundongos foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg , s.c.) trinta minutos antes da injeção do estímulo flogístico.	57

LISTA DE QUADRO

Quadro 2 – Protocolo experimental utilizado na triagem farmacológica comportamental 36

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses de orto-eugenol 45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
° C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
AMPA	Receptor do ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-

	propiónico
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenase
DEXA	Dexametasona
DL₅₀	Dose letal que mata 50% dos animais
DN	Dor Neuropática
DRG	Gânglio da Raiz dorsal
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK	Proteína cinase regulada por estímulos extracelular
Fe²⁺	Íons ferro
g	Gramas
g/kg	Gramas por quilogramas
GABA	Ácido γ-amino-butírico
GABA_A	Receptor de ácido gama amino butírico tipo A
GP	Glutathione peroxidase
h	Hora
H⁺	Íons hidrogênio
H₂O	Água
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IF-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina 1β
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
i.p.	Intraperitoneal
K⁺	Íon potássio
M	Concentração molar
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
mg/kg	Miligramas por quilogramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOR	Morfina
n°	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear κB
ng/mL	Nanogramas por mililitros
Na⁺	Íon sódio
NO	Óxido Nítrico
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato de sódio
PGE₂	Prostaglandina E2

PGF_{2α}	Prostaglandina F2-alfa
p.o.	Via oral
pH	Potencial hidrogeniônico
r.p.m.	Rotações por minuto
SG	Substância gelatinosa
s.c.	Subcutânea
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
VCAM-1	Molécula de adesão das células vasculares 1

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Fundamentação teórica	15
2.1. Dor e Nocicepção.....	15
2.2. Vias de transmissão e modulação do sistema adrenérgico na nocicepção	16
2.3. Inflamação	20
2.4. Participação da p38 MAPK e NF-κB na inflamação.....	22

2.5. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos fenilpropanoides	23
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. Material.....	31
4.1. Animais	31
4.2. Condições Experimentais.....	31
4.3. Substâncias utilizadas.....	32
4.5. Aparentagem.....	33
5. Métodos.....	34
5.1. Avaliação da toxicidade do orto-eugenol.....	35
5.1.1. Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀).....	35
5.2. Avaliação geral do orto-eugenol no sistema nervoso central.....	Erro!
Indicador não definido.	
5.2.1. Efeito do orto-eugenol na triagem psicofarmacológica.....	35
5.2.2. Teste do Rota-Rod	37
5.3. Estudo da atividade antinociceptiva do orto-eugenol.....	37
5.3.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	37
5.3.2. Teste da nocicepção induzida pelo formalina	38
5.3.3. Teste da nocicepção induzida pelo glutamato	39
5.3.4. Teste da Placa Quente	39
5.3.5. Envolvimento do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva do orto-eugenol	40
5.4. Estudo da atividade anti-inflamatória do orto-eugenol.....	41
5.4.1. Teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético	41
5.4.2. Peritonite induzida por carragenina	41
5.4.3. Expressão de Nf-κB e p38 por citometria de fluxo	42
5.4.4. Dosagem de TNF-α e IL-1β no lavado peritoneal	42
5.5. Análise estatística	43
6. Resultados	45
6.1. Avaliação da toxicidade do orto-eugenol Erro! Indicador não definido.	
6.1.1. Determinação da dose letal 50%	45
6.2. Avaliação geral do orto-eugenol no SNC Erro! Indicador não definido.	
6.2.1. Efeito do orto-eugenol na triagem psicofarmacológica.....	46
6.2.2. Efeito do orto-eugenol no teste do Rota-Rod	46
6.3. Estudo da atividade antinociceptiva do orto-eugenol.....	47
6.3.1. Efeito do orto-eugenol no teste das contorções induzidas por ácido acético	47

6.3.2.	Efeito do orto-eugenol no teste da formalina	49
6.3.3.	Efeito do orto-eugenol no teste do glutamato	51
6.3.4.	Efeito do orto-eugenol no teste da placa quente	51
6.3.5.	Envolvimento do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva do orto-eugenol	52
6.4.	Estudo da atividade anti-inflamatória do orto-eugenol	54
6.4.1.	Efeito do orto-eugenol na permeabilidade peritoneal induzida por ácido acético	54
6.4.2.	Efeito do orto-eugenol na peritonite induzida por carragenina	55
6.4.3.	Efeito do orto-eugenol na expressão de NF- κ B e p38	55
6.4.4.	Efeito do orto-eugenol nos níveis de TNF- α e IL-1 β	57
7.	Discussão	60
8.	Conclusão	72
9.	Referências	74
10.	Anexos	99
10.1.	Artigos publicados ou submetidos na vigência do doutorado	100
10.2.	Trabalhos publicados em anais de eventos científicos na vigência do doutorado	102

Introdução

1 Introdução

A dor é definida como uma sensação desagradável associada a uma experiência emocional ou sensorial com lesão tecidual real ou potencial (BONICA, 1979). A dor é uma experiência multissensorial que envolve aspectos cognitivos e afetivos. Hoje, a dor é considerada um problema de saúde pública, pois afeta cerca de 20% da população e os analgésicos são essenciais para o tratamento. De um modo geral, o indivíduo com dor apresenta alterações nos padrões de sono, irritabilidade e diminuição na capacidade de concentração (KRELING; CRUZ; PIMENTA, 2006). A nocicepção é o processo de transmissão do sinal doloroso por nociceptores que respondem a estímulos nódicos, convertendo-os em sinais elétricos para a medula espinhal, tálamo e córtex cerebral (WOOLF; MA, 2007).

A inflamação é uma resposta primária essencial para manutenção da homeostase. Os sinais cardinais da inflamação são rubor, calor, tumor, dor e perda de função. A resposta inflamatória aguda é caracterizada pela migração de granulócitos polimorfonucleares, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores pró-inflamatórios (VANE; BOTTING, 1987).

Nos últimos anos a atividade anti-inflamatória de compostos naturais tem atraído grande interesse científico devido à capacidade em atuar nos processos inflamatórios e por apresentarem menos efeitos colaterais do que os anti-inflamatórios utilizados atualmente (GÓMEZ ESTRADA; GONZÁLEZ RUIZ; MEDINA, 2011).

Muitas plantas medicinais foram amplamente usadas pela população devido as suas capacidades de aliviar a dor e inflamação. Por exemplo, a *Papaver somniferum*, na qual a morfina foi isolada em 1804, pelo farmacêutico alemão Frederick Serturmer. Embora a morfina seja utilizada até os dias atuais, seus efeitos colaterais são bastante relevantes como depressão respiratória, diminuição da motilidade gastrointestinal, náuseas e sonolência (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001). Diante desse fato, a pesquisa por compostos naturais com atividade analgésica similar, é pertinente (SARMENTO-NETO et al., 2016).

As plantas aromáticas produzem óleos essenciais que são misturas de compostos químicos voláteis e hidrofóbicos. Estudos relatam as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais como antinociceptivo e anti-inflamatório (ALMEIDA et al., 2011; HUANG et al., 2012). Essas atividades estão relacionadas aos seus constituintes, entre os quais se destacam os terpenoides por estarem em maior quantidade. No entanto, os fenilpropanoides também são componentes importantes de alguns óleos essenciais (STEINEGGER; HANSEL, 1992).

O eugenol é um fenilpropanoide presente em muitas plantas aromáticas (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992; CHENG et al., 2004). Esse composto apresenta grande variedade de propriedades biológicas e tem sido amplamente utilizada como analgésico na odontologia (BURGOYNE et al., 2010). A capacidade do eugenol em reduzir a nocicepção e agir no processo inflamatório tem ganhado grande destaque na comunidade científica (DANIEL et al., 2009; PARK et al., 2011; DAL BÓ, et al., 2012; PAULA-FREIRE et al., 2012), surgindo o interesse em pesquisar se o orto-eugenol também possui essas mesmas atividades.

Fundamentação teórica

2 Fundamentação teórica

2.1 Dor e nocicepção

Embora haja confusão entre os termos, nocicepção não é sinônimo de dor. A nocicepção representa um processo fisiológico de envolvimento central, já a dor é uma experiência subjetiva e consciente gerada a partir de uma resposta nociceptiva que, ao chegar no córtex cerebral, pode ser modulada por alterações emocionais e cognitivas através de mecanismos neuronais desconhecidos (APKARIAN et al., 2005; BUSHNELL et al., 2013). Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”.

A estreita relação entre dor e nocicepção é evidenciada desde 1904 (WOODWORTH; SHERRINGTON, 1904). Após mais de 100 anos de pesquisa, mecanismos moleculares e neuronais envolvidos no processo nociceptivo foram descobertos, assim como, o papel da consciência dolorosa para proteção do organismo contra danos teciduais (MEYER et al., 2006; BASBAUM et al., 2009). O processo nociceptivo nem sempre pode culminar na percepção da dor. Evidências sugerem que nociceptores periféricos podem ser ativados por estímulos sublimiares, logo o controle nociceptivo pode ocorrer na ausência do comportamento doloroso, gerando respostas subconscientes (MEYER et al., 2006; BALIKI; APKARIAN, 2015). Os nociceptores são ativados diariamente, então a transmissão através da via espinoencefálica lateral e medial pode controlar o direcionamento nociceptivo subconsciente com ou sem a percepção da dor. Em estudos de imagens com cérebros humanos, observou-se que a sensação desagradável da dor ativa áreas corticais específicas, mas precisamente no cíngulo anterior rostral e algumas porções da ínsula (RAINVILLE et al., 1997; SEGERDAHL et al., 2015).

Os tipos de dores podem ser classificados de acordo com a duração (aguda ou crônica) ou baseados nos mecanismos biológicos.

A dor aguda representa um mecanismo vital e protetor que permite o organismo reagir contra estímulos perigosos (WOLFF, 2004). No entanto,

segundo Baliki e Apkarian (2015), a dor aguda não é um sinal de aviso, mas sim uma incapacidade do organismo em evitá-la, isto é, a nocicepção subconsciente se torna em uma sensação desagradável consciente. Enquanto a dor crônica é um funcionamento patológico e não adaptativo do sistema nervoso presente em várias doenças como artrite, depressão e câncer (SCHAIBLE, 2007). Geralmente a dor é classificada como crônica quando perdura por mais de seis meses (RUSSO; BROSE, 1998).

2.2 Vias de transmissão e modulação na nocicepção

O entendimento das vias de transmissão e modulação da nocicepção é necessário para melhor tratamento das conduções dolorosas (CARR; ZACHARIOU, 2014).

O primeiro componente da transmissão da dor é a ativação dos neurônios nociceptivos primários com terminações nervosas livres. Há duas classes principais de nociceptores. A primeira classe é formada pelas fibras aferentes mielinizadas de médio diâmetro chamadas de A δ que medeiam a dor aguda ou “rápida”. As fibras A β são mielinizadas e possuem um diâmetro maior, respondendo a estímulos mecânicos leves. Já o segundo grupo é formado pelas fibras não-mielinizadas de pequeno diâmetro chamadas de fibras C que transmitem a dor lenta. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (BASBAUM et al., 2009). A pele, articulação e vísceras contêm fibras A δ e C nomeados de nociceptores silenciosos por não serem ativados por estímulos mecânicos ou térmicos em tecidos normais. Contudo, durante a inflamação ocorre uma sensibilização desses receptores que começam a responder a esses estímulos (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; WEIDNER et al., 1999).

Durante a inflamação, o limiar de ação dos nociceptores diminui e estímulos normalmente inócuos podem ativá-los (alodínia). Os nociceptores podem exercer funções eferentes no tecido pela liberação de neuropeptídeos (substância P, peptídios relacionados ao gene calcitonina) de suas terminações sensoriais. Assim, induz a vasodilatação, extravasamento do plasma, recrutamento de macrófagos, entre outros. Após a sensibilização das fibras

nociceptivas por esses mediadores inflamatórios, eventos não dolorosos podem causar dor. Esse processo caracteriza a dor inflamatória (LYNN, 1996; SCHAIBLE et al., 2006).

Os nociceptores se projetam para a medula espinhal e fazem sinapse com um neurônio de segunda ordem na substância cinzenta do corno dorsal que é organizado em lâminas anatômicas, para permitir que o sinal alcance o próximo nível de complexidade da dor. Por exemplo, as fibras A δ se projetam para a lâmina I e II da substância cinzenta, já as fibras C para a lâmina II e as fibras A β principalmente para a lâmina III e IV (SUGIURA et al., 1989). Os nociceptores trigêmeos são uma exceção, pois inervam diretamente o tronco encefálico, na região da ponte, em uma estrutura chamada de corno dorsal medular, devido à semelhança com o corno dorsal da medula espinhal (REN; DUBNER, 1999). Os axônios dos neurônios secundários ascendem e se projetam para o tronco encefálico ou para o sistema talamocortical por meio do trato ascendente da medula espinhal que incluem o trato espinotalâmico, espinorreticular e espinomesencefálica (SCHAIBLE, 2007)(Figura 1).

Vários neurotransmissores e receptores estão envolvidos na resposta neuronal da medula espinhal durante a inflamação e injúria de nervos periféricos. Os interneurônios são mais numerosos no corno dorsal em que acontece o balanço entre os estímulos excitatórios e inibitórios nos estados dolorosos (TODD, 2010).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório de neurônios aferentes primários e neurônios do corno dorsal. Os receptores para o glutamato estão envolvidos na ativação sináptica por estímulos nocivos (MILLAN 1999; FUNDYTUS 2001; WILLIS; COGGESHALL, 2004). A ativação de interneurônios excitatórios glutamatérgicos contribui para o dano neuronal e surgimento das dores agudas, inflamatórias e neuropáticas (WANG et al., 2013). Ao longo da medula espinhal estão localizados os neurônios GABAérgicos localizados em neurônios aferentes primários e no corno dorsal, sendo responsáveis por inibir a transmissão do estímulo nociceptivo (WILLIS; COGGESHALL 2004). Por exemplo, sabe-se que a diminuição da inibição GABAérgica e glicinérgica contribui para a hipersensibilidade da dor neuropática (MOORE et al., 2002; LU et al., 2013).

Os tratos descendentes contêm fibras que descem a partir do córtex cerebral ou dos núcleos do tronco encefálico com a finalidade de reduzir ou facilitar o processamento nociceptivo espinhal. A inibição descendente da dor faz parte do sistema antinociceptivo intrínseco (FIELDS; BASBAUM 1999). A partir do tronco encefálico, os impulsos “descem” até a medula espinhal para influenciar a transmissão de sinais no corno dorsal (FIELDS; BASBAUM 1999; OSSIPOV; PORRECA, 2005). A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma região fundamental na inibição descendente, projetando-se para medula rostral ventromedial (RVM) que recebe sinais do hipotálamo, regiões corticais e do sistema límbico (FIELDS et al., 1991; OSSIPOV; PORRECA, 2005). Opioides endógenos induzem analgesia por atuam sobre a PAG e RVM no corno dorsal da medula (OSSIPOV; PORRECA, 2005).

A resposta consciente da dor é produzida pelo sistema talamocortical que consiste em núcleos de retransmissão no tálamo lateral para as áreas somatossensorial I e II no giro pós-central (TREEDE et al. 1999). Como a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, várias redes cerebrais estão envolvidas. O sistema límbico é responsável pelo aspecto afetivo da dor, principalmente o córtex cingulado anterior que é ativado em resposta a emoções como tristeza e felicidade (TREEDE et al. 1999; VOGT, 2005) (Figura 1).

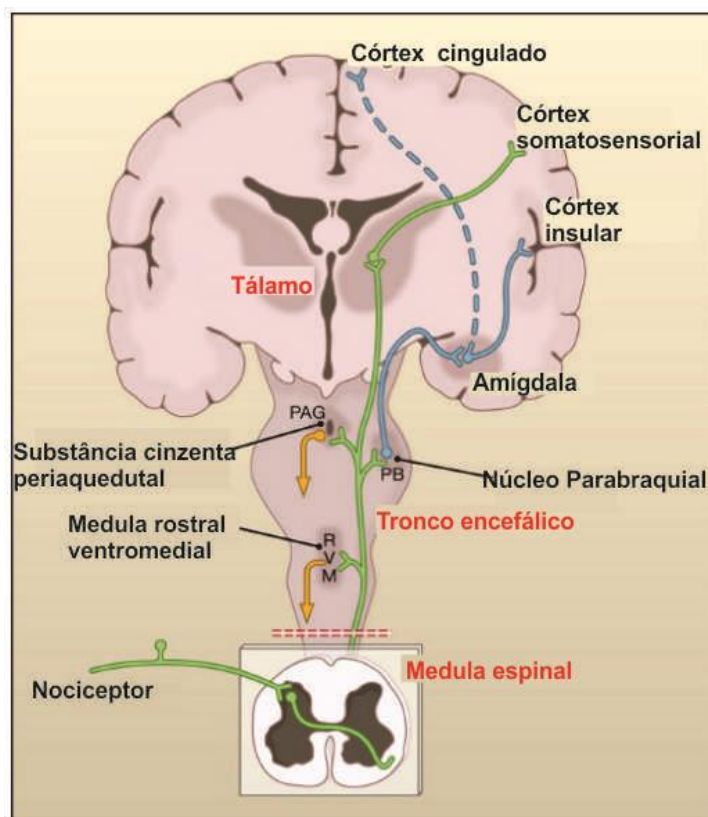
Os neurônios pós-ganglionares simpáticos liberam noradrenalina como neurotransmissor que está envolvida na regulação autonômica de vários órgãos. A noradrenalina, por meio da ação nos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 , participa do controle intrínseco da dor. O papel do sistema adrenérgico na modulação da resposta nociceptiva tem sido provado em muitos estudos. Os receptores adrenérgicos α - e β - são classicamente divididos em adrenoreceptores, no entanto os receptores adrenérgicos α_2 são os principais modulares da dor. Os subtipos de adrenoreceptores α são classificados em seis subtipos: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} (RUFFOLO; HIEBLE, 1994). Os subtipos α_2 - adrenoreceptores são acoplados a proteína inibitória regulatória ligada ao nucleotídeo guanina (proteína G_i) que reduz os níveis intracelulares de AMP cíclico ou modifica atividade do antiporte Na^+/H^+ , canais para cálcio ou canais para potássio (RUFFOLO; HIEBLE, 1994). Os adrenoreceptores α_2 estão localizados no terminal axônico dos neurônios catecolaminérgicos, por isso, são denominados de autorreceptores que uma vez ativados inibe a liberação

de neurotransmissores excitatórios (RUFFOLO; HIEBLE,1994; KAWASAKI et al., 2003; PERTOVAARA; 2013).

No corno dorsal da medula espinhal, a noradrenalina liberada na via descendente atenua a dor pela ação inibitória dos adrenorreceptores α_2 presente nos nociceptores aferentes primárias (inibição pré-sináptica). Na via supraespinhal, o efeito do sistema noradrenérgico na dor é variado, pois depende de muitos fatores, tais como o tipo de receptor adrenérgico e a área cerebral envolvida (PERTOVAARA; 2013).

A administração de agonistas adrenérgicos α_2 são alvos promissores no tratamento da dor (WADA et al., 1994). A sinergia do efeito analgésico entre agonistas α_2 -adrenérgicos e opioides estudada em modelos experimentais forneceu uma alternativa importante para o tratamento dor. No entanto, efeitos colaterais como hipotensão e sedação podem alterar essa aplicabilidade clínica (MAZE; TRANQUILLI, 1991).

Figura 1 – Circuito nociceptivo. Os nociceptores aferentes primárias levam a informação para o corno dorsal da medula espinhal que se projetará para o tálamo onde será localizada e interpretada.



Fonte: modificado de BASBAUM et al., 2009

2.3 Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica imediata, inespecífica, orquestrada pela imunidade inata para neutralizar e eliminar os estímulos nocivos, protegendo o organismo e mantendo a homeostasia (MEDZHITOV, 2010). Na infecção, lesão, trauma e várias outras razões, a resposta inflamatória deve ser autolimitada e em curto prazo para proteger o organismo (DUFFIN et al., 2010). Contudo a resposta inflamatória aguda pode se desregular e cronificar devido à incapacidade de remover produtos nocivos produzidos por neutrófilos e a incapacidade de eliminar as células inflamatórias, resultando em cicatrizes e fibroses (VAN DYKE, 2007). Muitas doenças inflamatórias podem causar morbidade e mortalidade, possuindo esse perfil crônico como asma, artrite reumatoide, esclerose múltipla e aterosclerose (NATHAN, 1987; NATHAN; DING, 2010).

O processo inflamatório envolve vários eventos não específicos ativados por estímulos ou agressões ambientais. Cada estímulo provoca uma resposta característica e, posteriormente, específica. A inflamação é acompanhada de cinco sinais clínicos: edema, vermelhidão, calor, dor e perda de função (LARSEN; HENSON, 1983).

A resposta inflamatória acontece em três fases distintas. A primeira é uma fase aguda caracterizada por vasodilatação local, hiperemia ativa causada pelas alterações das células musculares e aumento da permeabilidade capilar provocada pela contração do citoesqueleto em células endoteliais que resulta em exudação de fluidos a partir do sangue para os espaços intersticiais. A fase subaguda envolve uma hiperemia passiva, infiltração de leucócitos e fagócitos a partir do sangue para o tecido. A última fase é a proliferativa crônica em que ocorre degeneração e reparação de tecidos (FRIDOVICH, 1997; EDDOUKS; CHATTOPADHYAY; ZEGGWAGH, 2012). Os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao local inflamado constituindo a primeira linha de defesa do sistema imune inato, em virtude de suas funções fagocíticas e microbicidas. Logo depois, as células mononucleares, monócitos e macrófagos, alcançam o sítio inflamado (SAVILL et al., 2002).

A inflamação é um processo mediado pela ativação do sistema complemento, por sinais fisiológicos e bioquímicos, além da produção de

mediadores de diferentes classes químicas originados do plasma ou a partir de células, tais como aminas biogênicas, metabólitos do ácido aracdônicos, proteínas, peptídios e espécies reativas de oxigênio (WILLIANSO, 1996; SERHAN et al., 2007). Os efeitos vasculares são mediados, principalmente, por cininas, prostaglandinas e aminas vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular. Em estudos não clínicos utilizados para testar modelos de inflamação em animais, essas alterações podem ser induzidas pela administração de agentes flogísiticos como carragenina e ácido acético (EDDOUKS; CHATTOPADHYAY; ZEGGWAGH, 2012).

Na inflamação acontece a migração celular em virtude da liberação de citocinas que atraem outras células inflamatórias, regulando a amplitude e duração da resposta (HENSON; MURPHY, 1989). As quimiocinas são citocinas com funções quimiotáticas, isto é, atraindo leucócitos para os tecidos e sua mobilização da medula óssea (ZLOTNIK A; YOSHIE; 2000; LISA; FURTADO, 2012). A regulação genética que induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias geralmente depende da ativação do fator transcricional, fator nuclear- κ B (BALDWIN, 1996; HANADA; YOSHIMURA, 2002).

Para que haja a transmigração de leucócitos através dos vasos sanguíneos, é necessária a ativação de uma cascata bioquímica nos endotélios dos vasos. Durante a inflamação, as células endoteliais são ativadas por citocinas inflamatórias para expressar moléculas de adesão e sintetizar quimiocinas (MIDDLETON, 1997). Inicia-se a cascata de extravasamento de leucócitos pela adesão entre os polimorfonucleares e as moléculas de adesão (selectinas e integrinas), presentes nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (COTRAN; MAJNO, 1964; LEY et al., 2007). As selectinas (selectina-E e selectina-P) provocam o rolamento lento dos leucócitos na parede do capilar, enquanto a integrina medeia uma ligação firme entre os leucócitos e imunoglobulinas (ICAM1 e VCAM1) expressas nas células endoteliais. A transmigração é o último passo para migração de leucócitos que pode ser transcelular ou paracelular para que haja a diapedese para o tecido inflamado. À medida que a lesão se estabelece, os neutrófilos se acumulam no tecido e morrem por apoptose. Em seguida, os monócitos migram para o sítio inflamado e se diferenciam em macrófagos (FREIRE; DYKE, 2013).

A resolução da resposta inflamatória e retorno a homeostasia, não é passivo, pois precisa de um processo bioquímico que sucede na diminuição do recrutamento de granulócitos, produção de mediadores pró-inflamatório (IL-1 β , TNF- α , PGE₂), remoção do estímulo e reparação de tecido (FREIRE; VAN DYKE, 2013; ALESSANDRI et al., 2013).

2.4 Participação da p38 MAPK e NF- κ B na inflamação

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são fundamentais na cascata de transdução de sinais associados com nocicepção e inflamação (JI et al., 2003; JI, 2004). As MAPKs são ativadas por estímulos extracelulares que resulta respostas intracelulares por meio da regulação transcricional e não-transcricional (WIDMANN et al., 1999). Os três principais membros da MAPK são p38, cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK) e cinase c-Jun N-terminal (JNK) que são ativadas por fosforilação de cinases, regulando processos de proliferação celular, inflamação e nocicepção (PEARSON et al., 2001).

Estímulos como lipopolissacarídeo, carragenina, interleucina-1 (IL) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ativam receptores específicos que desencadeiam na ativação de proteínas como as p38 MAPK, envolvidas principalmente no processo inflamatória, que estimulam fatores transcricionais como proteína ativador 1(AP-1), fator nuclear kappaB (NF- κ B)(HUH et al., 2013; KIM et al., 2013). Evidências sugerem que as p38 desempenham papel importante na artrite e inflamação de fígado, rins, cérebro e pulmões (REN et al., 2012).

As p38 MAPK estão amplamente expressas em muitos tipos celulares, incluindo células do sistema imune, endoteliais e inflamatórias. A família da p38 possui quatro subtipos: α , β , γ e δ , sendo a p38 α responsável pela expressão de mediadores pró-inflamatórios tais como IL-1 β , TNF- α , PGE₂ e IL-12, bem como COX-2, IL-8, IL-6, IL-3, IL-2 e IL-1 (AMIROUCHE et al., 2013). Além disso, a p38 regula a produção de molécula de adesão das células vasculares 1(VCAM-1) que participa da resposta imune (PIETERSMA et al., 1997). Dessa

forma, as p38 MAPK são alvos terapêuticos em potencial para o tratamento de doenças inflamatórias (ZHANG; SHEN; LIN, 2007).

Além das p38 MAPK, o fator transcricional NF- κ B (NF- κ B) também regula a imunidade, apoptose e diferenciação celular. Logo, a desregulação da atividade do NF- κ B está ligada à problemas inflamatórios, autoimunes, doenças metabólicas e câncer (COURTOIS; GILMORE, 2006; BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011). Vários estímulos são capazes de ativar o NF- κ B que media várias transcrições. Em mamíferos, há cinco membros da família NF- κ B: RelA (p65), RelB e Rel-c e as proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) e NF- κ B2 (p100). O NF- κ B liga-se ao sítio κ B nos promotores de uma variedade de genes que induzirão ou reprimirão a transcrição de genes envolvidos na inflamação (PAHL, 1999; HAYDEN; GHOSH, 2004). O NF- κ B não participa apenas da fase pró-inflamatória, como também, na regulação e resolução da inflamação (GASPARANI; FILDMAN, 2012).

2.5 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos fenilpropanoides

Os óleos essenciais (OEs) são biossintetizados por glândulas secretórias presentes em várias partes de plantas (folhas, sementes, frutos, raízes, sementes, cascas) que têm gerado interesse em várias áreas em virtude das suas relevantes atividades biológicas. Na área médica, eles são usados como biocidas, principalmente, como antibacteriano contra bactérias multirresistentes (BURT, 2004; MAYAUD et al., 2008). Os OEs são também usados na indústria de perfumes, cosméticos e alimentos. Os OEs não estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas, embora participem da proteção da planta devido as suas propriedades antimicrobianas (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; O'BRYAN et al., 2015).

Os OEs são formados por uma mistura complexa que geralmente envolve mais de 100 diferentes compostos que são classificados em terpenoides, em maior quantidade, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Em estudo realizado por Sousa (2011), selecionou-se 43 constituintes de óleos essenciais com atividade antinociceptiva, sendo 62,8% monoterpenos, 18,6%

sesquiterpenos e os outros compostos representam 18,6%. Esses compostos são voláteis, instáveis e hidrofóbicos.

Os fenilpropanoides são um grande grupo de compostos orgânicos produzidos por plantas para protegê-las de infecções, radiações ultravioletas e herbívoras. Eles são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico. O grupo ácido carboxílico do ácido cinâmico é reduzido, gerando os fenilpropanoides (FRIEDRICH, 1976; SÁ et al., 2014). Segundo Carvalho et al. (2015), já foram identificados e estudados 17 fenilpropanoides com potencial anticâncer. A literatura científica mostra a participação de vários fenilpropanoides com diferentes mecanismos de ação relacionados à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em protocolos experimentais.

O eugenol é uma substância aromática natural, farmacologicamente ativa, presente em óleos essenciais de plantas como *Eugenia caryophyllus*, o “cravo-da-índia”; *Dicypelium cariophyllatum*, “o craveiro-do-Maranhão ou cravinho”; *Ocimum gratissimum*, a “alfavaca-cravo”; e o *Croton zenhtneri*, a “canela-de-cunha” (WU et al., 1994). Também conhecido como ácido eugênico ou cariofílico, o eugenol é um fenilpropanoide, sintetizado biologicamente a partir do aminoácido fenilalanina através da rota metabólica do ácido chiquímico (SENANAYAKE; WILLS; LEE, 1977). De acordo com Gong et al. (2016), o complexo formado pelo eugenol ligado à β -ciclodextrina possui alta efetividade fungicida com forte aplicabilidade clínica. O eugenol é utilizado nos cuidados dentários, para aliviar dor de dente, e como flavorizante em cosméticos e produtos alimentícios. Estudos prévios têm relatado várias propriedades biológicas do eugenol, entre as quais, destaca-se a atividade antinociceptiva mediada pela inibição dos receptores NMDA, ativação dos receptores GABA_A e opiodes (DANIEL et al., 2009; PARK et al., 2011; DAL BÓ et al., 2012; FERLAND; BEAUDRY; VACHON, 2012; PAULA-FREIRE et al., 2012). Segundo Esmaeili et al. (2015), a nanoemulsão contendo 1% de eugenol possui efeito anti-inflamatório superior ao gel comercial de piroxicam no teste do edema de pata induzido por carragenina em ratos. A suplementação diária de eugenol em ratos diabéticos resultou na diminuição das complicações neurais e vasculares, sugerindo que esse fenilpropanoide pode ser um potente alvo terapêutico para o tratamento dos sintomas da

neuropatia diabética (NANGLE et al., 2006). O tratamento oral com eugenol reduziu a inflamação e remodelagem cardíaca no modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol por meio da inibição da enzima conversora de angiotensina (MNAFGUI et al., 2015).

O metileugenol, análogo estrutural do eugenol, é o principal constituinte do rizoma de *Asari radix* no qual é utilizado para dores de garganta e outros tipos de dores (WANG et al., 2015). Vários óleos essenciais de plantas possuem o metileugenol, tais como *Myristica fragrans*, *Ocimum basilicum*, *Pimenta officinalis*, *Cinnamomum oliveri*, *Thapsia villosa*, *Doryphora sassafras*, e *Croton nepetaefolius* (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; DE VINCENZI et al., 2000; LAHLOU et al., 2004). O metileugenol é usado como flavorizante em uma ampla variedade de produtos dietéticos, como também, é encontrado em cosméticos, shampoo e fragrâncias. O metileugenol apresenta atividade antinociceptiva decorrente de sua efetividade na segunda fase do teste da formalina, podendo esse efeito está relacionada com a inibição da hiperalgesia mediada pelo receptor NMDA via receptor GABA_A (YANO et al., 2006). O metileugenol é um forte candidato a analgésico e anestésico local, por meio da inibição dos canais para sódio periféricos (SELL; CARLINI, 1976; WANG et al., 2015). A administração intraperitoneal de metileugenol em camundongos provoca alterações no sistema nervoso central observado pela perda do reflexo corneal e de endereitamento que são características de drogas anestésicas (CARLINI; DALLMEIER; ZELGER, 1981).

O α -asarone é um componente majoritário do óleo essencial de rizomas *Acorus gramineus* Solander, uma tradicional planta medicinal, utilizada na China para tratamento de traqueite crônica. A administração aguda do α -asarone produz fraca atividade anticonvulsivante, mas o tratamento diário por quatro semanas diminuiu o número de convulsões significativamente, sugerindo que a administração crônica de α -asarone provoca mudanças funcionais no cérebro, que podem estar relacionadas a uma inibição dos neurônios hipocampusais, via ativação dos receptores GABA_A e bloqueio dos canais para Na⁺ dependentes de voltagem (CHEN et al., 2012; HUANG et al., 2013; WANG et al., 2014). O extrato de *Nectandra megapota mica*, utilizado para o tratamento de dor de dente, febre e reumatismo, apresenta atividade analgésica atribuída à presença do composto majoritário, α -asarone, no

entanto o consumo desse extrato deve ser cauteloso, uma vez que o α -asarone é hepatotóxico e carcinogênico (LÓPEZ et al., 1993; SILVA FILHO et al., 2004).

O isoeugenol (figura 5), componente do óleo de *Syngium aromaticum*, é um metoxifenol usado em perfumes, sabões, detergentes e como agente aromatizante em cosméticos e produtos alimentares. O isoeugenol também possui um efeito anti-artrítico sem provocar danos à mucosa gástrica, diferentemente das drogas utilizadas na prática clínica (KAUR; SULTANA, 2012). Recentemente, Prasad e Muralidhara (2013) evidenciaram que o efeito neuroprotetor do eugenol e isoeugenol podem está relacionados a suas atividades antioxidantes e a restauração dos níveis de dopamina em várias partes do cérebro no modelo da neuropatia induzida por acrilamida, sugerindo que o isoeugenol pode ser usado como adjuvante terapêutico em outras condições neuropáticas.

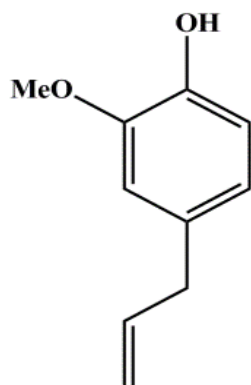
O estragol é um fenilpropanoide, relativamente não tóxico, volátil, presente no óleo essencial de inúmeras plantas, tais como *Ravensara anisata* (Ravensara), *Ocimum basilicum* (basil), *Artemisia dracuncululus* (tarragon), e *Croton zehntneri* (“canela de cunhã”, no nordeste brasileiro) utilizadas na aromaterapia e medicina popular (CRAVEIRO et al., 1981; FRANCHOME; PENOEL, 1995). Embora o estragol seja o principal constituinte de *Croton zehntneri*, que apresenta perfil depressor do sistema nervoso central, o composto isolado não possui atividade ansiolítica ou antidepressiva, sugerindo que o estragol não seja responsável pelo efeito do óleo essencial de *Croton zehntneri* (CONSENTINO et al., 2004). Em estudo eletrofisiológico com o nervo ciático de rato, observou-se que o estragol diminui a excitabilidade neuronal, tornando esse composto como um promissor anestésico local (LEAL-CARDOSO et al., 2004). No modelo experimental de edema de pata, o estragol possui atividade anti-edematogênica que envolve a participação de substância P, bradicinina, histamina, serotonina, TNF- α e óxido nítrico (PONTE et al., 2012). A atividade anti-inflamatória do estragol ocorre pela inibição da migração de leucócitos e pela estimulação da fagocitose pelos macrófagos (SILVA-COMAR et al., 2014).

O orto-eugenol é um fenilpropanoide utilizado na indústria como fragrância. O orto-eugenol, isômero sintético do eugenol, contém um anel

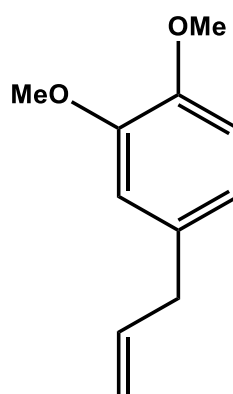
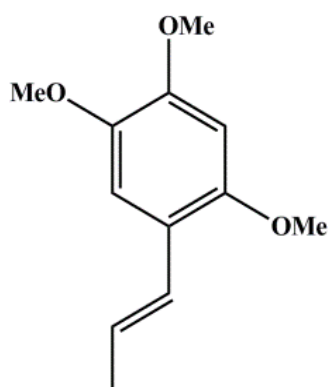
benzênico que ao alterar o tamanho e os grupos de átomos ligados ao anel muda drasticamente o sabor. Uma vez que os análogos do eugenol são apontados como promissores alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, principalmente, as que envolvem dor e inflamação, surgindo o interesse em pesquisar se o orto-eugenol também apresenta essas mesmas propriedades, tornando o presente trabalho pioneiro nesse estudo.

Quadro 1- Eugenol e seus análogos estruturais

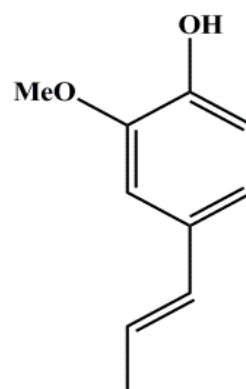
Estrutura química do eugenol



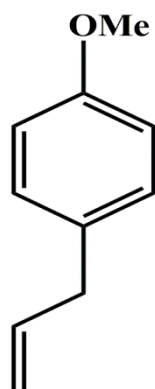
Estrutura química do metileugenol

Estrutura química do α -asarone

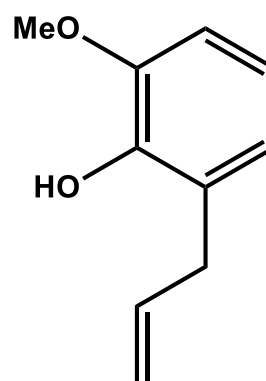
Estrutura química do isoeugenol



Estrutura química do estragol



Estrutura química do orto-eugenol



Objetivos

3 Objetivos

3.2 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do orto-eugenol em camundongos.

3.3 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do orto-eugenol pela via intraperitoneal em camundongos;
- Verificar o efeito do orto-eugenol sobre a coordenação motora de camundongos;
- Examinar a ação antinociceptiva do orto-eugenol em modelos de nocicepção químicos e térmicos;
- Avaliar a participação do sistema adrenérgico na antinocicepção induzida pelo orto-eugenol;
- Pesquisar o efeito do orto-eugenol na permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético;
- Estudar a atividade anti-inflamatória na migração de leucócitos no teste da peritonite induzida pela carragenina;
- Dosar os níveis de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal de animais tratados com orto-eugenol;
- Avaliar a expressão de NF- κ B e p38 em leucócitos migrados para o líquido peritoneal nos animais tratados com orto-eugenol após a administração da carragenina intraperitoneal.

Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Animais

Nos experimentos, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos e fêmeas, com três meses de vida, pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba.

Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas de polietileno, contendo, no máximo, 20 camundongos por caixa, os quais permaneceram sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), com livre acesso a uma dieta de ração tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas.

4.1.2 Condições Experimentais

No dia do experimento, as gaiolas de polietileno, contendo quatro animais em cada, foram levadas à sala de experimentação duas horas antes do início do experimento, a fim de proporcionar uma adaptação ao novo ambiente, para minimizar possíveis alterações comportamentais.

As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que possam interferir no comportamento dos animais.

Todos os procedimentos experimentais aconteceram no período entre 12:00 e 17:00 horas, sendo previamente aprovados pelo CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPB sob a certidão de nº 0201/2013.

4.1.3 Substâncias utilizadas

- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Anticorpos primários p-NF- κ B e p-p38 (Santa Cruz - E.U.A);
- Carragenina (Sigma – E.U.A);
- Cloreto de sódio (Merck – E. U. A.);
- Cloridrato de morfina (Merck – E. U. A.);
- Dexametasona (Sigma – E.U.A)
- Etanol (LTF / UFPB – Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- Glutamato (Sigma – E.U.A);
- Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical – E.U.A);
- Ioimbina (Sigma – E.U.A);
- Kit para dosagem de TNF- α e IL-1 β (eBioscience – E.U.A);
- Orto-eugenol (Sigma – E.U.A);
- Solução tampão fosfato (Sigma – E.U.A);
- Tween 80 (Vetec – Brasil).

4.1.4 Preparação do orto-eugenol e demais substâncias

Minutos antes do início do teste, o orto-eugenol foi emulsificado em Tween 80 (Polissorbato 80) a 1% e em água destilada, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do camundongo.

O orto-eugenol foi preparado nas doses de 100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg para administração pela via intraperitoneal (i.p.). Como controle negativo, utilizou-se Tween 80 a 1% em água destilada. A via de administração escolhida para o estudo foi a intraperitoneal em virtude da alta absorção, podendo atingir o efeito esperado em tempo bem próximo ao alcançado pela via intravenosa (LUKAS; BRINDLE, 1971).

As demais substâncias, em suas respectivas doses, foram dissolvidas em água destilada ou solução salina 0,9%. Todas as doses das substâncias foram injetadas de 0,1 mL/ 10g de animal. As únicas exceções foram formalina (20 μ L) e glutamato (30 μ L) as quais foram injetadas por via intraplantar.

4.1.5 Aparelhagem

- Aparelho de rota-rod (Insight – Brasil) (Figura 2);
- Aparelho de placa quente (Panlab – Espanha) (Figura 3);
- Caixa de observação para o teste da formalina (Brasil) (Figura 4);
- Citocentrífuga (Bio Research – E.U.A);
- Micrômetro digital (Great – Brasil);
- Microscópio óptico (Olympus – Japão);
- Leitor de microplaca ELISA (ELx808 Absorbance Microplate Reader – E.U.A)(Figura 5).

Figura 2 - Aparelho do rota-rod



Fonte: <http://insightltda.com.br/>

Figura 3 - Aparelho da Placa Quente



Fonte: <http://www.panlab.com/>

Figura 4 - Caixa de observação



Fonte: Laboratório de
Psicofarmacologia

Figura 5 - Leitor de microplaca

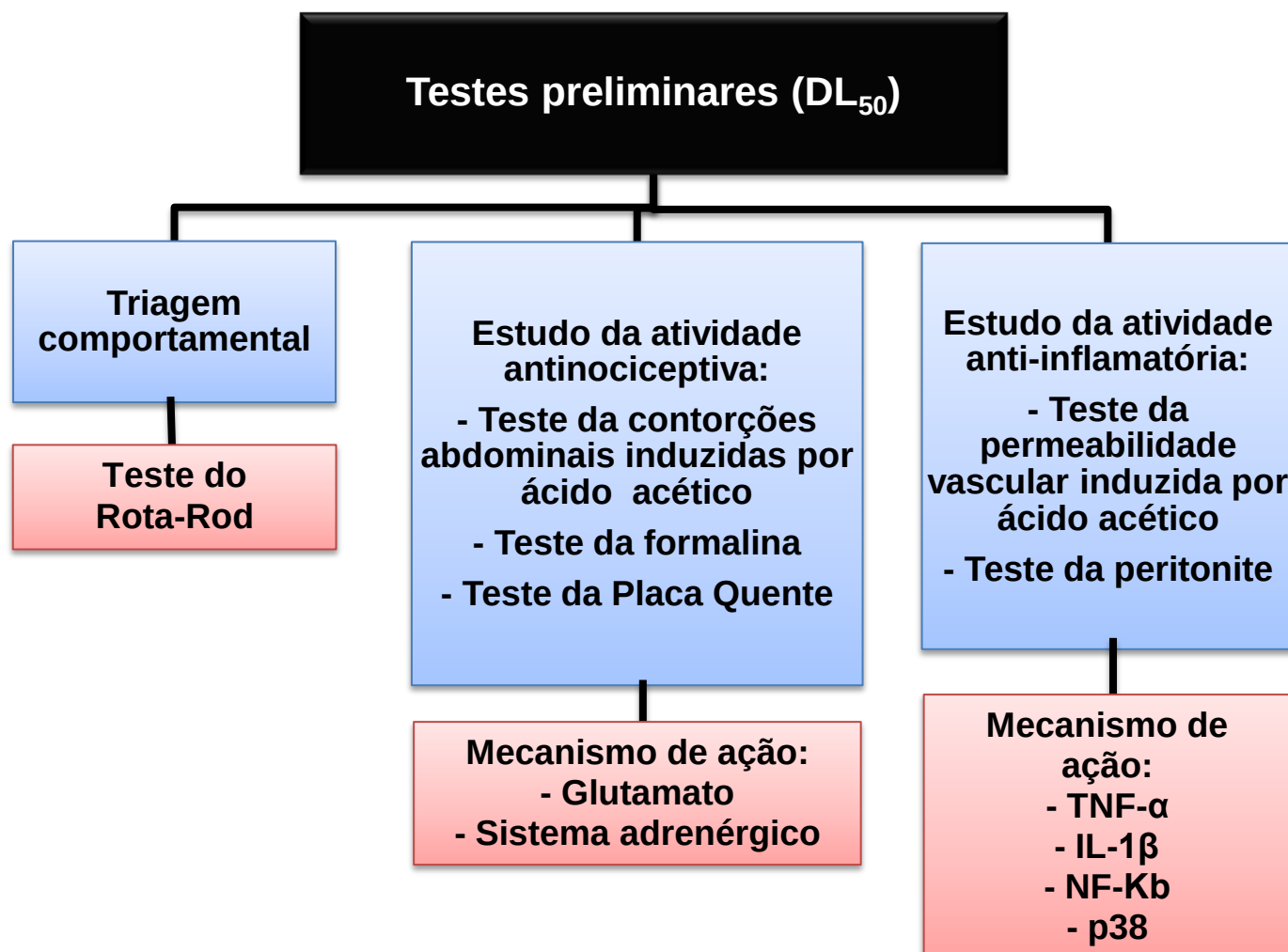


Fonte: www.biotek.com

4.2 Métodos

O delineamento metodológico do estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do orto-eugenol em camundongos está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 – Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do orto-eugenol.



4.2.1 Avaliação geral do orto-eugenol no sistema nervoso central e da sua toxicidade aguda

4.2.1.1 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀)

A determinação da dose letal 50% permite avaliar a toxicidade aguda de uma droga, pois, a partir da descoberta de uma dose capaz de provocar óbito em 50% dos animais, pode-se determinar uma margem de segurança para o estudo farmacológico (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

A determinação da toxicidade aguda ou dose letal 50% (DL 50%) foi realizada em camundongos machos (n = 6) e fêmeas (n = 6), utilizando seis grupos de doze animais, tratados uma única vez com orto-eugenol nas doses de 100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu uma solução Tween 80 (veículo) a 1%. Logo após as administrações, foi realizado a triagem psicofarmacológica durante 4 horas. As possíveis mortes ocorridas em consequência dos tratamentos iniciais foram registradas por 14 dias.

4.2.1.2 Efeito do orto-eugenol na triagem psicofarmacológica

A triagem farmacológica comportamental é o primeiro passo para a identificação e a caracterização de uma droga no SNC e SNA, avaliada por meio de um protocolo experimental (Quadro 2), proposto por Almeida e Oliveira (2006). Essa metodologia permite o direcionamento do estudo farmacológico para testes mais específicos.

Como mencionado anteriormente, após a administração em dose única do orto-eugenol (100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg mg/kg, via i.p.), os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno para a visualização dos parâmetros comportamentais durante um período de quatro horas, divididas em intervalos de 30, 60, 120 e 240 minutos dos tratamentos iniciais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). As alterações comportamentais decorrentes do tratamento da droga teste foram comparadas ao grupo que recebeu apenas o veículo, possibilitando inferir uma atuação no SNC.

Quadro 2 – Protocolo experimental utilizado na triagem farmacológica comportamental

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

Fonte: ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006.

4.2.1.3 Teste do Rota-Rod

O teste do rota-rod, inicialmente descrito por Dunham e Miya (1957), avalia a coordenação motora por meio da capacidade do animal em permanecer sobre uma barra giratória em intervalos de tempo pré-estabelecidos (MATTEI; FRANÇA, 2006). Essa metodologia é amplamente aceita como triagem para detectar alterações neurológicas associadas a modificações cerebelares produzidas por drogas como os antiepiléticos e antipsicóticos (LOSCHER; FASSBENDER; NOLTING, 1991; LUSZCZKI et al., 2005).

Vinte quatro horas antes do experimento, houve uma pré-seleção dos animais, sem administração de qualquer substância, sendo excluídos aqueles que não conseguiram permanecer sobre a barra giratória por, pelo menos, um minuto em três tentativas.

Os animais selecionados foram divididos em grupos ($n = 8$) e, em seguida, tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou diazepam (4 mg/kg, i.p.), trinta minutos antes da realização do teste. Cada camundongo teve seu tempo de permanência na barra giratória cronometrado por no máximo 3 min, e as observações ocorreram aos 30, 60 e 120 minutos dos tratamentos iniciais. O aparelho de rota-rod consiste em uma barra giratória, dividida em quatro compartimentos iguais, separados por paredes plásticas que rotaciona 7 r.p.m.

4.2.2 Estudo da atividade antinociceptiva do orto-eugenol

4.2.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é bastante utilizado na triagem de substâncias com potencial efeito antinociceptivo (COLLIER et al., 1968). A administração do ácido acético causa uma resposta dolorosa visceral no abdômen caracterizada pela liberação

de mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, citocinas e eucosanoides) e ativação de neurônios nociceptivos (REJÓN-ORANTES et al., 2013).

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n = 8) e pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50,75 e 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos dos tratamentos iniciais, administrou-se uma solução de ácido acético 1% na cavidade peritoneal que provocou uma contorção abdominal caracterizada pela extensão dos membros posteriores e contração da musculatura abdominal (Figura 18). Cada animal foi colocado em uma caixa de observação individual e o número de contorções abdominais foi registrado por dez minutos após administração do estímulo nociceptivo. O efeito nociceptivo foi exibido pela porcentagem de inibição em relação ao número de contorções do grupo controle.

4.2.2.2 Teste da nocicepção induzida pelo formalina

A fim de melhor esclarecer a atividade antinociceptiva do orto-eugenol, realizou-se o teste da formalina como forma de diferenciar se o efeito apresentado foi central ou periférico, uma vez que essa metodologia possui duas fases distintas (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Esse teste consiste na administração intraplantar de uma solução de formalina a 2,5% que provoca o comportamento de lambida ou mordida da pata como resposta nociceptiva representada pela fase neurogênica e inflamatória, respectivamente (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). A primeira fase (0-5 min) ocorre imediatamente após a injeção do estímulo e consiste na ativação direta sobre os nociceptores periféricos como TRPA1 presentes nas fibras aferentes primárias, principalmente nas fibras sensoriais tipo C. Enquanto a segunda fase (15-30 min) é resultado de uma sensibilização periférica e da medula espinhal decorrente do aumento de vários mediadores tais como bradicinina, serotonina, substância P, óxido nítrico e prostaglandina E₂ (TJØLSEN et al., 1992; PARADA et al., 2001; FISCHER et al., 2014). Segundo Malmberg e Yaksh (1995), na primeira fase do teste da formalina ocorre aumento significativo na medula espinhal de aspartato, taurina, glutamato, glicina, serina e PGE₂. Entre

as duas fases, há a interfase que é resultado da inativação de receptores transientes e hiperpolarização neuronal (FISCHER et al., 2014).

Os camundongos receberam uma solução de formalina 2.5% (20µL) na região subplantar da pata traseira esquerda (n = 8 por grupo), trinta minutos após os tratamentos com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). O tempo total de lambida ou mordida da pata foi registrado na primeira (0-5 min) e segunda fase (15-30 min) do teste da formalina. Os animais foram colocados individualmente em um aparato espelhado para observação do comportamento nociceptivo.

4.2.2.3 Teste da nocicepção induzida pelo glutamato

O glutamato é o principal aminoácido excitatório liberado pelo sistema nervoso central e periférico em respostas nociceptiva (YASHPAL et al., 2001). A administração do glutamato provoca uma ativação direta das fibras aferentes primárias, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e neuropeptídeos, assim como ativação dos receptores glutamatérgicos (BORDI; UGOLINI, 1999). Estudos relatam que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato está relacionada a receptores de NMDA e não-NMDA localizados na região espinhal, supraespinhal e periférica (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Os grupos de camundongos (n = 8) foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos das administrações, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µL de uma solução de glutamato (30 µmol/pata) na pata posterior direita e, logo em seguida, foram colocados individualmente em caixas de observação. O parâmetro observado foi o tempo de lambida da pata ou mordida que foi registrado por 15 minutos após a injeção do glutamato.

4.2.2.4 Teste da Placa Quente

O teste da placa quente avalia substâncias com possível ação analgésica central. A placa aquecida à temperatura constante provoca

respostas comportamentais como lambida da pata ou movimento de pular (NEMIROVSKY et al., 2001; ORLANDI et al., 2011). O estímulo térmico promove ativação das fibras (A δ e C) que levam o impulso para o corno dorsal da medula espinhal e aos centros corticais em que são interpretados (DICKENSON; BESSON, 1997).

Para a realização desse teste, os animais foram pré-selecionados e considerados aptos àqueles que obtivessem um tempo de resposta à dor inferior a dez segundos, quando colocados sobre uma superfície metálica aquecida a $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os camundongos selecionados foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.) e então foram colocados individualmente sobre a placa quente em 30, 60 e 120 min após os tratamentos iniciais. No intuito de minimizar a destruição tecidual da pata do animal, o tempo sobre a placa não ultrapassou 30 s. O parâmetro registrado foi o tempo de latência para pular ou lambida a pata traseira. Quanto maior o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente, maior seria o efeito antinociceptivo central do orto-eugenol.

4.2.2.5 Envolvimento do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva do orto-eugenol

Com base nos resultados obtidos pelo eugenol (PARK et al., 2011), foi avaliada a participação do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva do orto-eugenol, utilizando o antagonista adrenérgico, ioimbina, em dose já estudada na literatura (LOPES et al., 2010; CAVALCANTE-SILVA et al., 2014; MARTINS et al., 2015).

Para esse teste, os animais foram pré-tratados com veículo ou ioimbina (antagonista adrenérgico α_2 , 0,15 mg/kg, i.p.), quinze minutos antes da administração do orto-eugenol (100 mg/kg, i.p.). Decorridos trinta minutos da administração do orto-eugenol, os camundongos foram submetidos ao teste do ácido acético. A dose de orto-eugenol selecionado para o estudo foi de 100 mg/kg,i.p., pois apresentou maior porcentagem de inibição no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

4.2.3 Estudo da atividade anti-inflamatória do orto-eugenol

4.2.3.1 Teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético

O teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético foi realizado de acordo com o método modificado descrito por Whittle, 1964. Os camundongos foram tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Após 20 min foi injetado pela via caudal uma solução de azul de Evans 1% (10 mg/kg). Depois de trinta e cinco minutos dos tratamentos iniciais, todos os animais receberam uma solução de ácido acético 1% pela via intraperitoneal. Vinte minutos após o desafio com ácido acético, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram, posteriormente, os peritônios lavados com 2 mL de salina. Após esse procedimento as amostras obtidas dos peritônios foram transferidas para tubos do tipo falcon em que foram centrifugadas (CR422, JONAM) por 10 min/1500 rpm/8 °C. As absorbâncias dos sobrenadantes foram analisadas em 620 nm, utilizando o espectrofotômetro (ELx808 Absorbance Microplate Reader).

4.2.3.2 Peritonite induzida por carragenina

A inflamação aguda possui como principal característica a migração de células no local da lesão. A administração intraperitoneal da carragenina provoca um infiltrado de neutrófilos para cavidade peritoneal. Esse evento ocorre em consequência da vasodilatação, do aumento da permeabilidade vascular e da liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e prostanoídes (HALL et al., 1998).

A migração de leucócitos foi induzida pela administração intraperitoneal de carragenina (1%, 300 μ L) em camundongos tratados trinta minutos antes com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Quatro horas após administração do estímulo, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de salina. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado e o lavado peritoneal foi punccionado e colocado em tubos tipo *eppendorf*, para que fossem

centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -80 °C para posterior dosagem das citocinas. Do líquido coletado do peritônio, foi retirado uma alíquota de 10 µL da amostra que foi dissolvida em 140 µL da solução de Turk para contagem total de leucócitos na Câmara de Neubauer e visualizada em um microscópio óptico. Os resultados foram expressos como número de leucócitos/mL.

4.2.3.3 Expressão de NF-κB e p38 por citometria de fluxo

O pellet de células formado a partir da centrifugação do líquido peritoneal obtido a partir do teste da peritonite induzida pela carragenina, foi ajustado para uma concentração celular de 1×10^6 /mL em que foi retirado 300 µL para o tubo de citometria que foi centrifugado por 7 min a 1300 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 150 µL de citofix (BD Biosciences) que foi deixado em repouso por 30 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, foi adicionado 150 µL de PBS e, novamente, a solução foi centrifugada por 7 min a 1300 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de tampão permeabilizante. A solução formada foi deixada em repouso por 30 min a 4 °C e centrifugada, posteriormente, por 7 min a 1300 rpm a 4 °C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e BSA a 0,5%. Por último, adicionou-se os anticorpos fluorescentes conjugados por 30 min a temperatura ambiente (anti-p-Nf-κB p65 e anti-p38) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Após duas lavagens com 300 µL de PBS, as células foram ressuspendidas em 300 µL de PBS e levadas para a leitura no citômetro (BD Biosciences TM, FACScalibur).

4.2.3.4 Dosagem de TNF-α e IL-1β no lavado peritoneal

Após 4h da administração da carragenina nos grupos pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.), o líquido peritoneal foi removido e centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido para quantificação das citocinas TNF-α e IL-1β pela técnica de ELISA sanduíche que foi realizado seguindo as instruções dos fabricantes (eBioscience, San Diego, USA).

Para a realização do experimento, as placas de ELISA de 96 poços (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF- α e anti-IL1 β , e incubadas durante a noite a 4 °C. Após esse período, os poços foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionou-se 50 μ L das amostras e diferentes concentrações das citocinas recombinantes. As placas foram novamente incubadas por uma noite a 4 °C.

Logo em seguida, os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada aos poços da placa e então incubadas por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão e expressos como quantidade total por mililitro (pg/mL).

4.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Dunnett para comparação entre as médias. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ e.p.m (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (p) menor que 0,05. A determinação da DL₅₀ foi calculada por regressão não-linear.

A porcentagem de inibição foi determinada pela comparação entre as médias do grupo controle e experimental, calculadas pela seguinte fórmula (OYEMITAN et al., 2008; IJEOMA et al., 2011; TAHER, 2012).

$$\text{Porcetagem de inibição} = 100 - \frac{\text{média do grupo experimental}}{\text{média do grupo controle}} \times 100$$

Resultados

5 Resultados

5.1 Avaliação geral do orto-eugenol no sistema nervoso central e da sua toxicidade aguda

5.1.1 Determinação da dose letal 50%

A toxicidade aguda do orto-eugenol foi avaliada por meio da contabilização do número de mortes em cada dose por um período de 14 dias, conforme apresentados na Tabela 1. Durante os 14 dias de observação, não houve mortalidade nos animais tratados com a dose 100 mg/kg, mas as doses de 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg apresentam as seguintes porcentagens de mortalidade: 8,3%, 25%, 33,3%, 58,3% e 100%, respectivamente.

Diante dos resultados, calculou-se a DL_{50} e o valor obtido foi de 307,5 mg/kg, com intervalo de confiança entre 212,1 e 446,0 mg/kg de peso corporal para camundongos machos e fêmeas.

Tabela 1 – Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses de orto-eugenol

Doses do orto-eugenol (mg/kg)	% de mortes em 14 dias
100	0
200	8,3
225	25
250	33,3
300	58,3
400	100

(n = 12 animais por grupo, constituído por 6 machos e 6 fêmeas)

5.1.2 Efeito do orto-eugenol na triagem psicofarmacológica

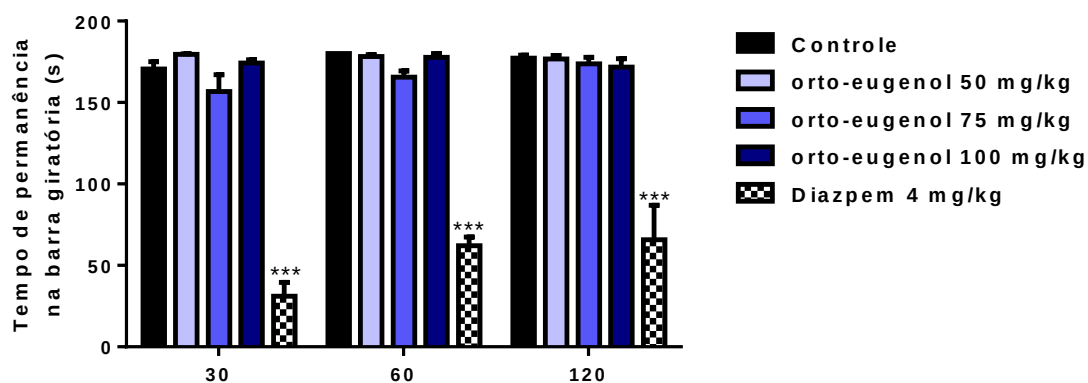
Os camundongos tratados pela via intraperitoneal com orto-eugenol apresentaram diferenças comportamentais importantes, quando comparados ao controle. As doses de 100, 200, 225, 250 e 300 mg/kg i.p. provocaram uma analgesia intensa, principalmente, na primeira hora de observação, persistindo durante as quatro horas analisadas. Esse parâmetro foi avaliado pelo tempo de reação do animal ao ter sua cauda pressionada por uma pinça. Outros alterações comportamentais registradas foram diminuição da ambulação, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular. Observou-se que nas doses de 300 e 400 mg/kg i.p, os animais reduziam a frequência cardíaca e apresentavam as extremidades azuladas.

Uma redução na resposta ao toque diminuído e na ambulação foi observada nas duas primeiras horas da administração do orto-eugenol na dose de 200 mg/kg, como também nas doses de 225, 250 e 300 mg/kg, a qual perdurou durante toda a análise.

5.1.3 Efeito do orto-eugenol no teste do Rota-Rod

O tratamento com orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) não alterou o tempo de permanência sobre a barra giratória nos tempos de observação em 30 ($179,5 \pm 0,3$ s; $156,7 \pm 10,4$ s; $174,3 \pm 1,9$ s), 60 ($178,3 \pm 1,0$ s; $165,6 \pm 3,9$ s; $177,8 \pm 2,3$ s) e 120 ($176,8 \pm 2,2$ s; $173,7 \pm 4,0$ s; $171,8 \pm 5,0$ s) minutos dos tratamentos iniciais quando comparado ao controle ($170,5 \pm 4,6$ s; $170,3 \pm 8,6$ s; $177,2 \pm 1,8$ s). O diazepam (4 mg/kg, i.p.), droga depressora do sistema nervoso central, reduziu ($p < 0.01$) o tempo no aparelho de Roda-Rod em 85,9 % ($24,0 \pm 8,0$ s), 68,4% ($53,8 \pm 9,4$ s) e 65,6% ($60,5 \pm 20,8$ s) nos respectivos tempos testados (Figura 7).

Figura 7 - Efeito da administração do veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) na função psicomotora avaliada no teste do Rota-Rod.



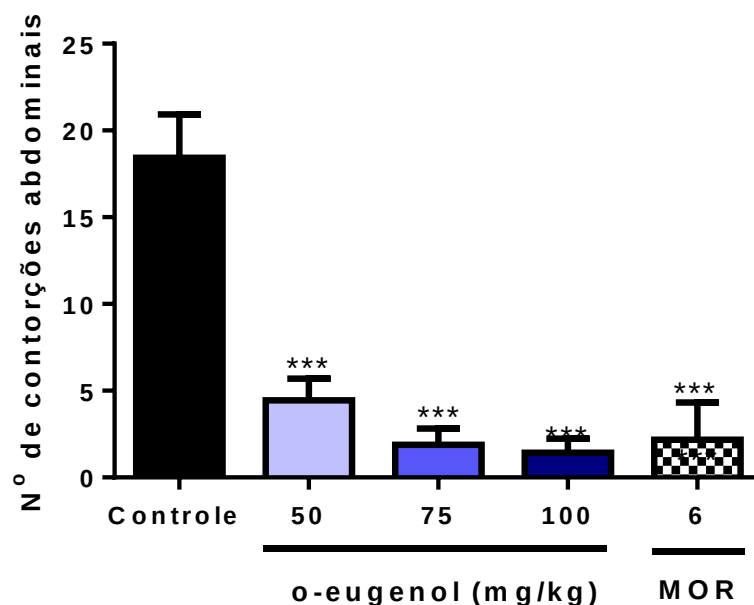
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2 Estudo da atividade antinociceptiva do orto-eugenol

5.2.1 Efeito do orto-eugenol no teste das contorções induzidas por ácido acético

O orto-eugenol nas doses de 50 ($4,4 \pm 1,2$), 75 ($1,9 \pm 1,0$) e 100 ($1,4 \pm 0,8$) mg/kg apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparado ao grupo controle ($18,4 \pm 4,5$), apresentando as respectivas porcentagens de inibição: 76,0%, 89,7% e 92,4%. A morfina (6 mg/kg, i.p.), como esperado, diminuiu ($p < 0,001$) o número de contorções em 88,0% ($2,2 \pm 2,2$) (Figura 8).

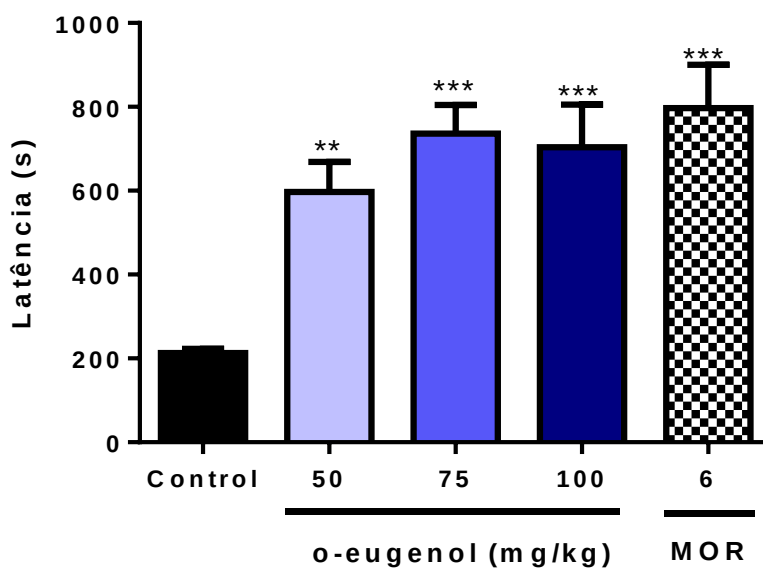
Figura 8 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 6 mg/kg, i.p.) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m ($n = 8$) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

No referido teste, todas as doses utilizadas de orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) apresentaram um aumento significativo ($p < 0.01$; $p < 0.001$) da latência para o surgimento das contorções ($597,3 \pm 71,3$; $736,5 \pm 68,3$; $703,8 \pm 101,6$; respectivamente) em relação ao grupo controle ($212,6 \pm 10,2$) e semelhante à morfina ($796,7 \pm 103,3$), de acordo com a figura 9.

Figura 9 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 6 mg/kg, i.p.) sobre a latência para o surgimento da primeira contorção abdominal induzidas por ácido acético.

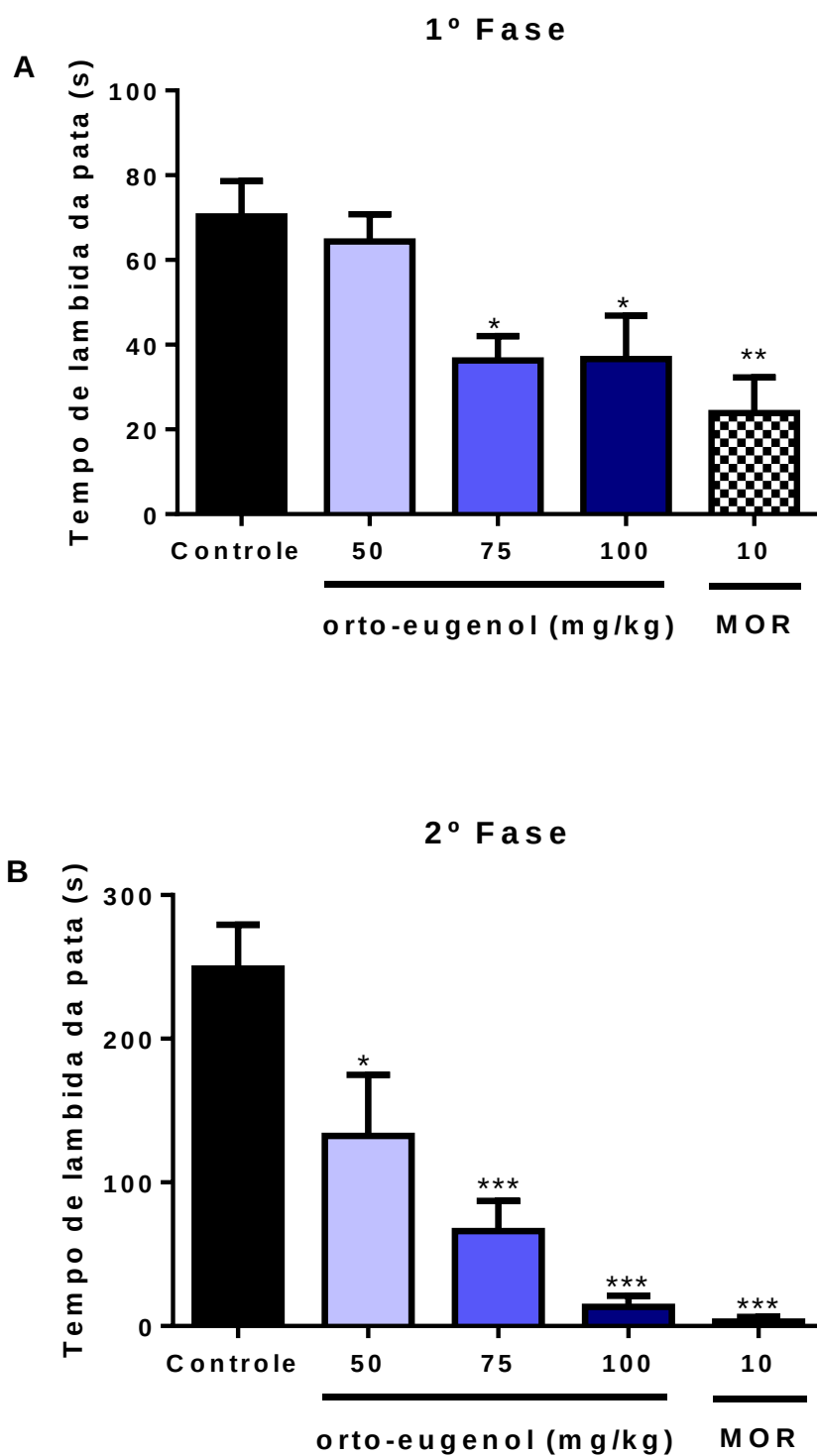


Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2.2 Efeito do orto-eugenol no teste da nocicepção induzida pela formalina

Na primeira fase (Figura 10A) do teste da formalina, as doses de 75 ($36,3 \pm 5,7$ s) e 100 ($36,6 \pm 10,3$ s) de orto-eugenol reduziram ($p < 0,05$) o tempo de lambida em 48,3% e 47,9% quando comparado ao grupo controle ($70,3 \pm 8,4$ s). A administração do orto-eugenol nas doses de 50 ($132,4 \pm 42,4$ s), 75 ($66,0 \pm 21,3$ s) e 100 ($13,4 \pm 7,7$ s) mg/kg diminui ($p < 0,05$; $p < 0,01$) o tempo de lambida na segunda fase do teste da formalina em 46,8%, 73,5% e 94,6%, respectivamente, ao comparar com o grupo controle ($248,9 \pm 30,5$ s)(Figura 10B). A morfina reduziu o tempo de lambida na primeira fase em 66,0% ($23,4 \pm 8,4$ s) e 98,7% ($3,1 \pm 3,1$ s) na segunda fase do teste da formalina.

Figura 10 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR: 10 mg/kg, i.p.) na primeira (A) e segunda (B) fase do teste da formalina.

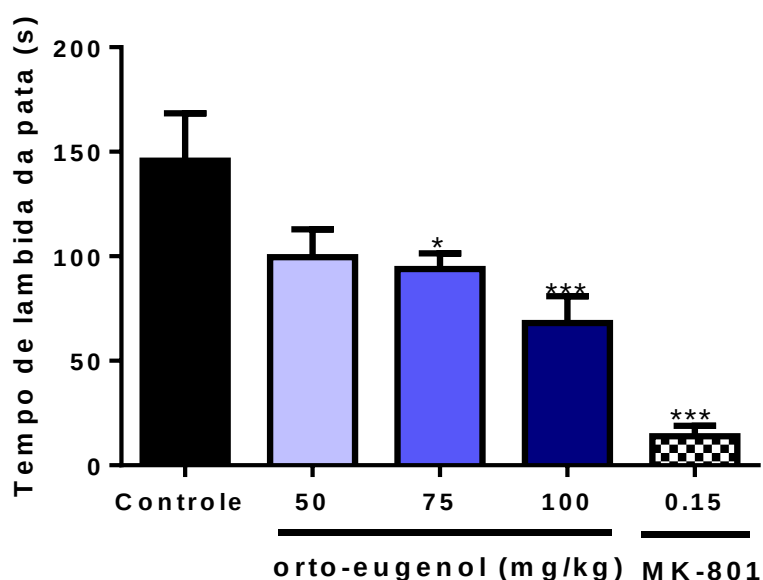


Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n = 8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2.3 Efeito do orto-eugenol no teste da nocicepção induzida pelo glutamato

O pré-tratamento com orto-eugenol nas doses de 75 ($93,8 \pm 7,5$ s) e 100 ($68,1 \pm 12,8$ s) mg/kg reduziram ($p < 0,05$; $p < 0,001$) o tempo de lambida no teste do glutamato, apresentando valores de inibição de 35,7% e 53,3%, comparado ao grupo controle ($145,8 \pm 22,6$ s). A dose mais baixa de orto-eugenol (50 mg/kg) não foi efetiva no teste do glutamato. O MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor NMDA, também reduziu ($p < 0,001$) em 90,5% ($13,9 \pm 5,0$ s) o efeito nociceptivo induzido pelo glutamato (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e MK-801 (0.15 mg/kg, i.p.) no teste da nocicepção induzida pelo glutamato.



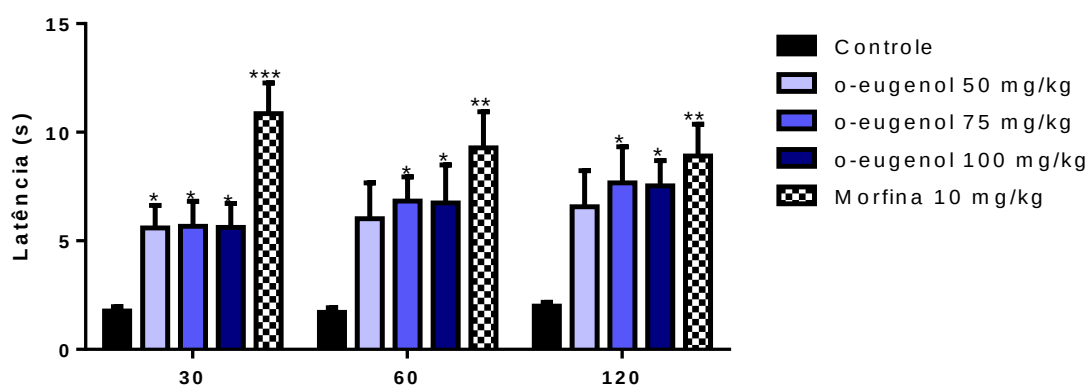
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m ($n = 8$) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2.4 Efeito do orto-eugenol no teste da placa quente

Segundo a Figura 12, 30 min após o tratamento com orto-eugenol nas doses de 50 ($5,6 \pm 1,0$ s), 75 ($5,7 \pm 1,1$ s) e 100 ($5,6 \pm 1,0$ s) mg/kg aumentaram ($p < 0,05$) o tempo de latência em relação ao controle ($1,8 \pm 0,2$

s). Nos tempos de 60 e 120 min após a administração de orto-eugenol também se observou a atividade antinociceptiva ($p < 0,05$) nas doses de 75 ($6,8 \pm 1,1$ s; $7,7 \pm 1,7$ s) e 100 ($6,7 \pm 1,7$ s; $7,5 \pm 1,2$ s) mg/kg comparado ao grupo controle ($1,7 \pm 0,2$ s; $2,0 \pm 0,2$ s). A morfina (10 mg/kg) aumentou ($p < 0,001$; $p < 0,01$) o tempo de reação em todos os tempos testados ($10,9 \pm 1,4$ s; $9,3 \pm 1,7$ s; $8,9 \pm 1,5$ s).

Figura 12 - Efeito da administração do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (MOR, 10 mg/kg , i.p.) no teste da placa quente.



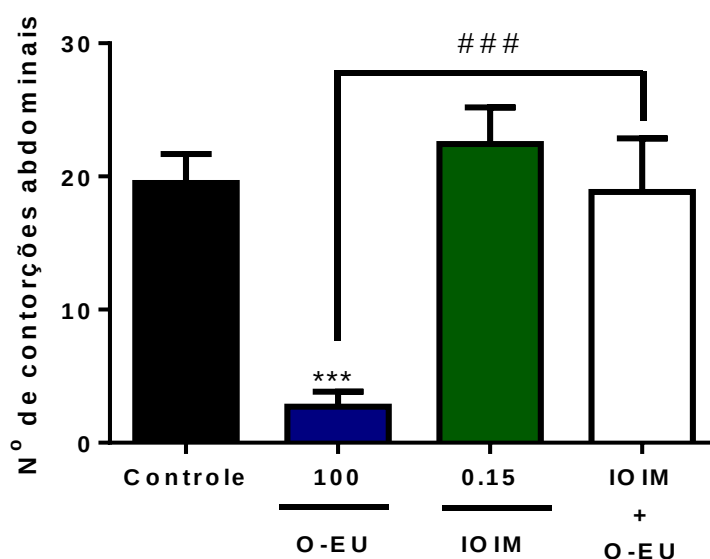
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m ($n = 8$) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2.5 Envolvimento do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva do orto-eugenol

Como apresentado na Figura 13, o efeito antinociceptivo do orto-eugenol ($2,7 \pm 1,1$) foi revertido ($p < 0,001$) pela pré-administração da ioimbina ($18,8 \pm 4,0$). O tratamento isolado com a ioimbina ($22,4 \pm 2,8$) não alterou o número de contorções abdominais quando comparado ao grupo controle ($19,5 \pm 2,2$).

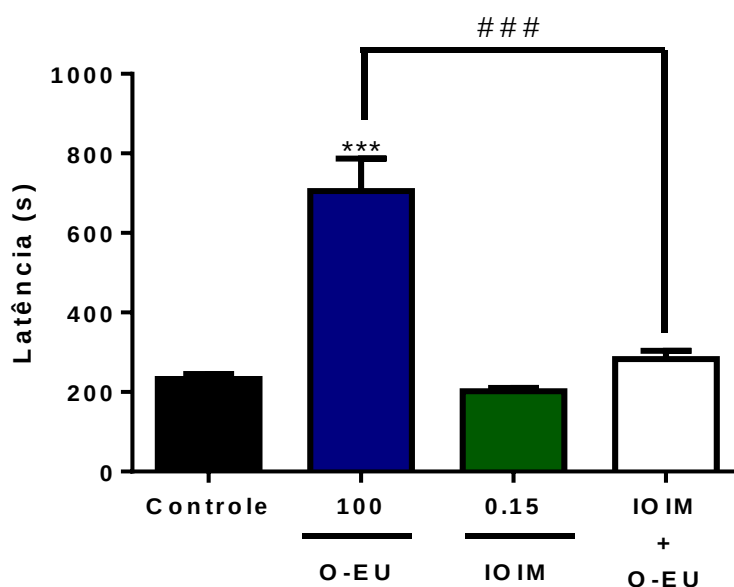
A latência para o surgimento da primeira contorção do orto-eugenol ($705,6 \pm 81,1$ s) também foi alterado ($p < 0,001$) com o pré-tratamento com ioimbina ($282,7 \pm 20,8$ s). O tempo de latência da ioimbina ($202,3 \pm 8,0$ s) não foi alterado em relação ao grupo controle ($232,2 \pm 12,7$ s) (Figura 14).

Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com ioimbina (IOIM, 0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo orto-eugenol (O-EU, 100 mg/kg, i.p.), no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *** $p < 0,001$ versus grupo controle, ### $p < 0,001$ versus orto-eugenol.

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com ioimbina (IOIM, 0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo orto-eugenol (O-EU, 100 mg/kg, i.p.), sobre a latência para o surgimento da primeira contorção abdominal induzidas por ácido acético.



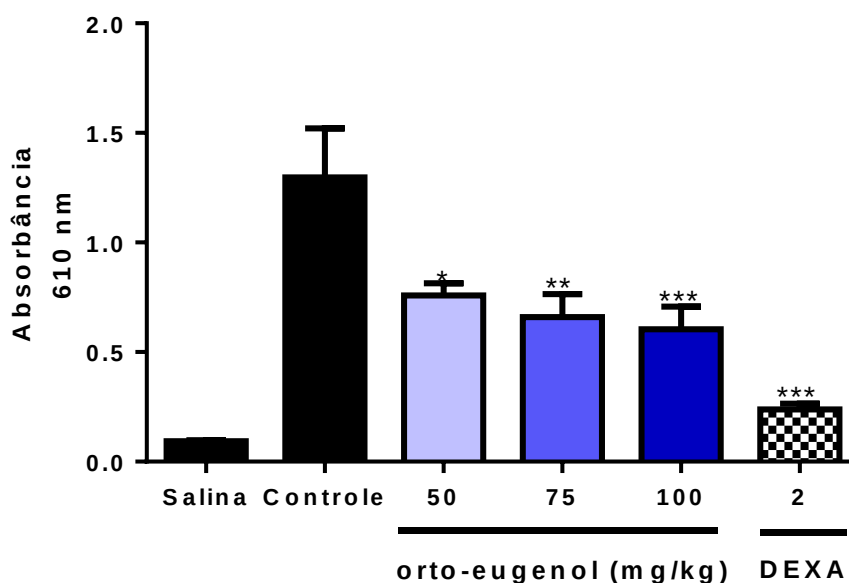
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n = 8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *** $p < 0,001$ versus grupo controle, ### $p < 0,001$ versus orto-eugenol.

5.3 Estudo da atividade anti-inflamatória do orto-eugenol

5.3.1 Efeito do orto-eugenol na permeabilidade peritoneal induzida por ácido acético

Conforme a figura, o orto-eugenol nas doses de 50 ($0,76 \pm 0,1$), 75 ($0,7 \pm 0,1$) e 100 ($0,6 \pm 0,1$) mg/kg reduziu ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) a absorbância e, conseqüentemente, o aumento da permeabilidade capilar peritoneal induzida por ácido acético em 41,6%, 49,2% e 53,4% comparado ao grupo controle ($1,3 \pm 0,2$). A dexametasona (2 mg/kg, s.c.) inibe a permeabilidade peritoneal induzida por ácido em acético em 81,6% ($0,2 \pm 0,0$) (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da administração do veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (2 mg/kg, s.c.) na permeabilidade peritoneal induzida por ácido acético.

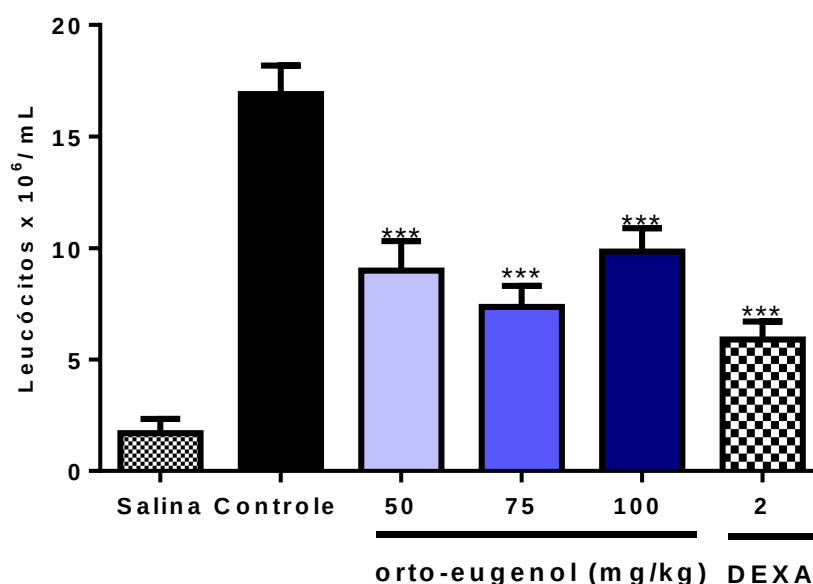


Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.3.2 Efeito do orto-eugenol na peritonite induzida por carragenina

O orto-eugenol administrados trinta minutos antes da administração da carragenina (1%, 300 μ L) inibiu a migração de leucócitos nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg ($p < 0,001$) em 46,9% ($9,0 \pm 1,3$), 56,5% ($7,4 \pm 1,0$) e 41,8% ($9,8 \pm 1,0$), respectivamente, quando comparado ao controle ($16,9 \pm 1,3$). Como previsto, a dexametasona reduziu a migração de leucócitos em 65,1% ($5,9 \pm 0,8$, $p < 0,001$) (Figura 16).

Figura 16 - Efeito da administração do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e da dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) sobre a migração de leucócitos totais na peritonite induzida por carragenina.



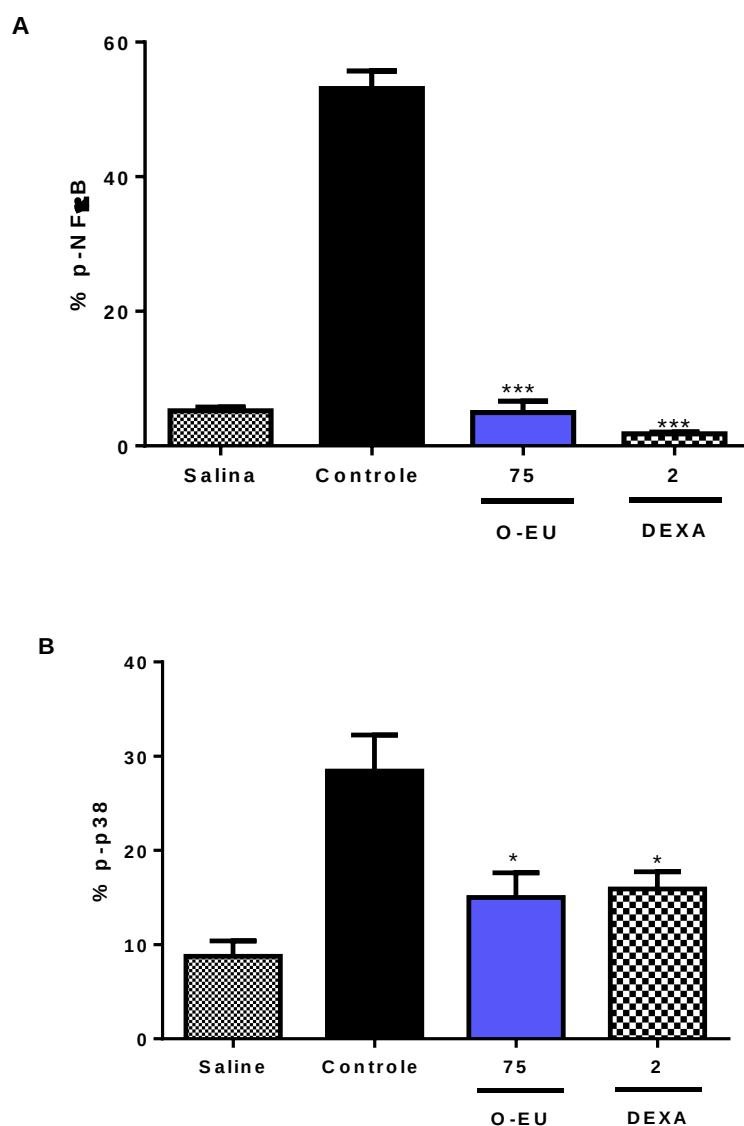
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.3.3 Efeito do orto-eugenol na expressão de NF- κ B e p38

Como mostrado na Figura 17A e 17B, o tratamento com a carragenina aumentou a expressão da forma ativada de NF- κ B e p38 que foi reduzida pelo

orto-eugenol em 48,2% (** $p < 0,001$) e 13,4% (* $p < 0,05$) respectivamente, comparado ao grupo controle. A dexametasona, anti-inflamatório esteroideal, inibiu a expressão de p-NF- κ B e p-p38 em 51,3% (** $p < 0,001$) e 12,5% (* $p < 0,05$). A porcentagem expressa o número de células peritoneais nas quais a fosforilação de NF- κ B e p38 foi induzida comparada as células não estimuladas.

Figura 17 - Efeito do orto-eugenol na expressão de p-NF- κ B (A) e p-p38 (B) em leucócitos migrados para cavidade peritoneal após 4 horas da estimulação com caragenina. Os camundongos foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (75 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) trinta minutos antes da injeção do estímulo flogístico.

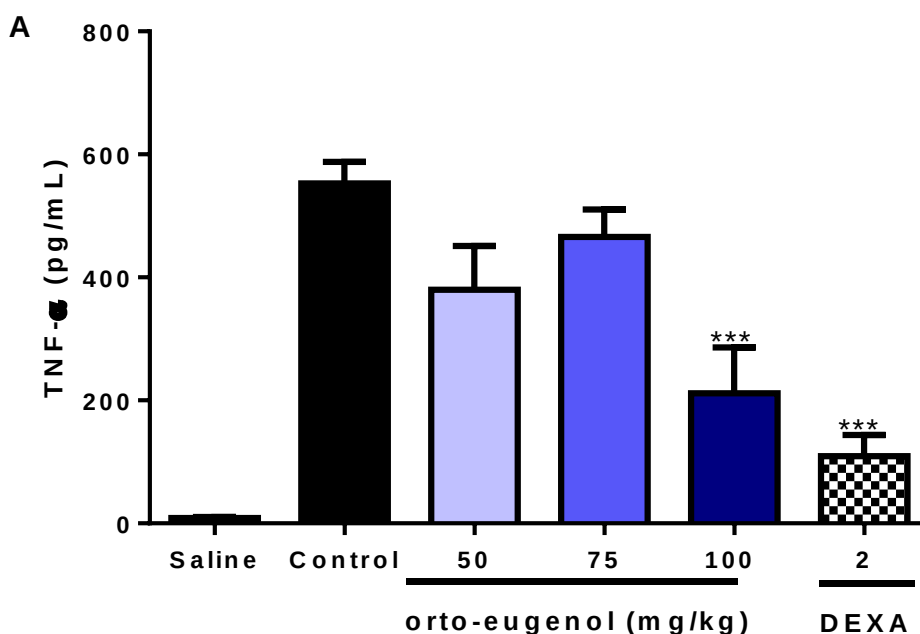


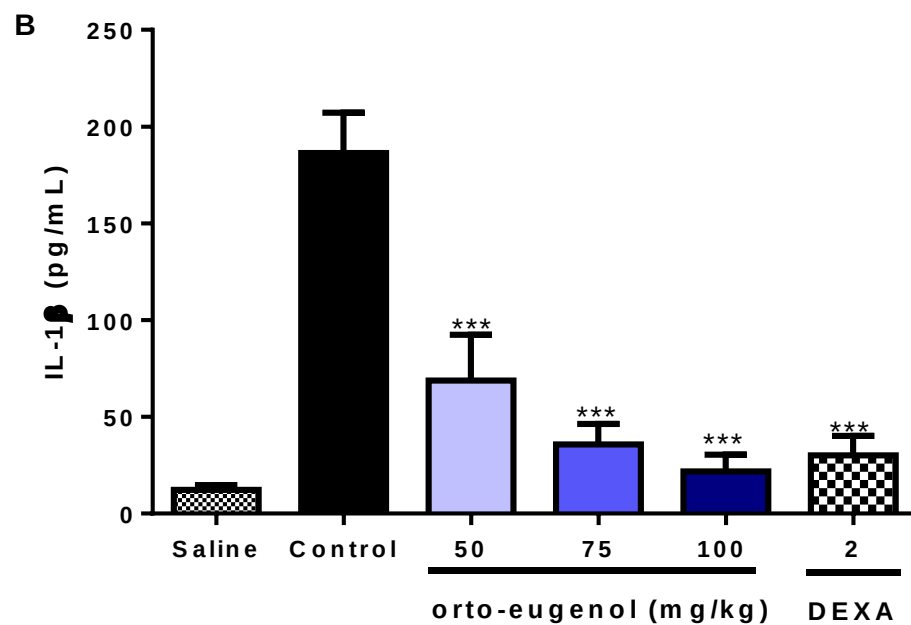
Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n = 8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.3.4 Efeito do orto-eugenol nos níveis de TNF- α e IL-1 β

Após quatro horas da administração da carragenina, o orto-eugenol reduziu ($p < 0.001$) os níveis de TNF- α na dose de 100 mg/kg em 61,7% ($211,7 \pm 74,6$ pg/mL) quando comparado ao grupo controle ($552,9 \pm 34,9$ pg/mL). Ao avaliar os níveis de IL-1 β , observou-se que o orto-eugenol nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg ($p < 0,001$) diminuiu em 63,0% ($68,8 \pm 23,7$ pg/mL), 80,3% ($35,7 \pm 10,7$ pg/mL) e 88,3% ($21,8 \pm 8,7$ pg/mL) quando comparado ao grupo controle ($186,3 \pm 21,0$ pg/mL). A dexametasona reduziu tanto os níveis de TNF- α em 80,2% ($109,3 \pm 34,3$ pg/mL) quanto os níveis de IL-1 β em 83,8% ($21,8 \pm 8,7$ pg/mL)(Figura 18A e B).

Figura 18 - Efeito do orto-eugenol nos níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B) na cavidade peritoneal após quatro horas da administração de carragenina intraperitoneal. Os camundongos foram pré-tratados com veículo, orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) trinta minutos antes da injeção do estímulo flogístico.





Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n = 8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *** p < 0,001 *versus* grupo controle.

Discussão

6 Discussão

Diversos estudos têm sido desenvolvidos em grandes centros de pesquisa, com o objetivo de descobrir e comprovar as atividades biológicas de constituintes isolados de vários óleos essenciais de plantas utilizadas na medicina popular. Dentre esses componentes, o eugenol se destaca por seus efeitos farmacológicos comprovados e por sua baixa toxicidade (LEAL-CARDOSO et al., 2002). Os análogos do eugenol são apontados como promissores alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, principalmente, as que envolvem dor e inflamação (FERLAND; BEAUDRY; VAACHON, 2012; YANO et al., 2006; CHO et al., 2002).

Nesse contexto, a pesquisa envolvendo uma molécula de estrutura similar ao eugenol, orto-eugenol, é muito importante, pois não foram encontrados quaisquer relatos na literatura científica a respeito de suas atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias em camundongos.

Os estudos com o orto-eugenol foram iniciadas com a determinação da toxicidade aguda, e, para tal, ocorreu a administração do fenilpropanoide nas doses de 100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg por via intraperitoneal, sendo observado o número de mortes por um período de 14 dias. Essa etapa é fundamental para o uso seguro de uma substância, visto que fornece informações das doses capazes de provocar efeitos tóxicos em um estudo pré-clínico (EATON; KLAASSEN, 1996; SÁ; ALMEIDA, 2006).

Segundo Sober et al. (1950), o eugenol apresenta a DL_{50} de 1,93g/Kg em ratos, pela via oral, que foi bastante superior ao encontrado no presente estudo (307,5 mg/kg, i.p.) em camundongos. Essa diferença provavelmente se deve ao fato de que ao administrar uma substância por via oral a biodisponibilidade pode apresentar-se diferente daquela quando administrado na via intraperitoneal, devido o metabolismo de primeira passagem (ABDEL-BARRY; AL-HAKIEM, 2000, PIRES et al., 2004).

Com o objetivo de traçar o perfil de efeitos do orto-eugenol no sistema nervoso central e autônomo, utilizou-se a triagem farmacológica que são vários parâmetros comportamentais propostos por Almeida e Oliveira (2006) para investigação da atividade psicofarmacológica de novas moléculas. Nesse

experimento, os grupos de camundongos tratados com orto-eugenol nas doses de 100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg pela via intraperitoneal apresentaram alterações comportamentais sugestivas de drogas depressoras do SNC, tais como a diminuição da ambulação e da resposta ao toque diminuído e a perda do reflexo corneal e auricular.

Outro parâmetro observado, a analgesia, foi avaliado por meio do aumento da latência na resposta do animal ao sofrer uma pressão no terço inferior da cauda (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Esse efeito foi observado de maneira intensa em todas as doses analisadas, indicando que testes para avaliar a atividade antinociceptiva do orto-eugenol forneceria resultados promissores.

Estudos sugerem que compostos capazes de alterar a atividade locomotora são capazes de alterar a resposta nociceptiva (LE BARS et al., 2001; VILLALBA et al., 2014). O orto-eugenol em nenhuma das doses testadas no teste do Rota-Rod modificou a coordenação motora dos animais tratados, excluindo um efeito relaxante muscular e, consequentemente, uma resposta falso-positiva no comportamento nociceptivo, uma vez que não apresentou alteração significativa entre o grupo controle e experimental. O eugenol nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg i.p. também não alterou a coordenação motora em camundongos, sugerindo baixa neurotoxicidade dessas drogas (PAULA-FREITE et al., 2012). O fenilpropanoide, α -asarone na dose de 100 mg/kg i.p., apresentou diminuição na atividade locomotora e incoordenação motora observada no teste do Rota-Rod, mostrando que compostos com estruturas químicas similares, podem apresentar perfis toxicológicos diferentes (PAGES et al., 2010).

O teste das contorções abdominais é um modelo de dor visceral clássico utilizado para triagem de novas substâncias analgésicas ou anti-inflamatórias (MOHAMAD et al., 2010). Nesse teste, a administração do estímulo nociceptivo também estimula a liberação de vários mediadores inflamatórios como bradicinina, substância P, histamina, serotonina e eicosanoides (DERAEDT et al., 1980). A injeção do ácido acético ativa tanto nociceptores somáticos quanto viscerais que inervam o peritônio, causando uma inflamação nas paredes musculares subcutâneas e nos órgãos subdiafragmáticos, levando a um comportamento caracterizado pela contração dos músculos abdominais e

extensão dos membros inferiores do corpo do animal (SATYANARAYANA et al., 2004).

Nossos dados mostraram que o orto-eugenol reduz o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, assim como, aumentou a latência para a primeira contorção nas três doses testadas. Portanto, o mecanismo de ação do orto-eugenol pode estar relacionado à redução na liberação de mediadores inflamatórios ou bloqueio direto dos receptores. Embora o eugenol também seja efetivo nos testes das contorções abdominais (DANIEL et al., 2009), apresentou uma porcentagem de inibição inferior nas mesmas doses testadas quando comparado aos resultados obtidos pelo orto-eugenol no presente estudo. Dal Bó et al. (2013) mostraram que o eugenol é mais efetivo no teste das contorções abdominais quando administrado por via oral do que pela via intraperitoneal, no entanto, em um estudo piloto realizado em nosso laboratório, o orto-eugenol apresentou melhores resultados quando injetado pela via intraperitoneal.

Vários fármacos com diferentes atividades farmacológicas são capazes de reduzir o número de contorções abdominais, revelando a não seletividade desse teste, por isso, a diminuição no número de contorções requer confirmação em outros modelos de nocicepção como o teste da formalina (AOKI et al., 2006; KAWAURA et al., 2011).

O teste de formalina avalia dois tipos diferentes de dor o que permite particularizar o efeito analgésico de vários fármacos com diferentes mecanismos de ação (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os analgésicos narcóticos como a morfina são efetivos nas duas fases do teste da formalina, embora a primeira fase seja mais efetiva para esses fármacos (KARIM et al., 1993). Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais como o diclofenado suprimem a resposta apenas na segunda fase (ORTIZ et al., 2008). Omote et al. (2000) demonstraram que a administração subcutânea de formalina induz a liberação de óxido nítrico por meio da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) no sistema nervoso periférico o que contribui para a nocicepção induzida pela formalina. Li et al. (2012) provaram que a administração subcutânea de formalina na pata traseira do animal aumenta a expressão de *c-Fos* e p-p38 MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno p38) no corno dorsal da medula espinhal.

O presente estudo evidencia o efeito antinociceptivo do orto-eugenol nas duas fases do teste da formalina, sugerindo um mecanismo de ação semelhante aos fármacos opioides. Segundo PARK et al. (2011), o eugenol possui atividade antinociceptiva apenas na segunda fase do teste, embora as doses testadas sejam inferior as testadas no presente estudo. Em cultura de macrófagos de camundongos, o eugenol mostrou inibição de COX-2, sem afetar a COX-1 (KIM et al., 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido nos processos de aprendizagem, memória, doenças neurodegenerativas, além de ser fundamental na transmissão nociceptiva e participa da liberação de várias substâncias no corno dorsal, como também, induz a exocitose de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, cininas e prostaglandina E2 (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; MILLAN, 2002). O óxido nítrico está envolvido na liberação e síntese de mediadores inflamatórios, tais como espécies reativas de oxigênio, bradicinina e citocinas (LIMA et al., 2012). Em processos inflamatórios ou dano tecidual, ocorre elevação na liberação de glutamato pelas fibras aferentes primárias (MILLER et al., 2011). O glutamato, uma vez administrado na pata, causa ativação de receptores específicos em sítios periféricos, espinhais e supraespinhais por um mecanismo dependente da ativação da via L-citrulina-óxido-nítrico (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Sabe-se que a administração do glutamato leva ativação de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) e metabotrópicos. Os canais iônicos de NMDA são bloqueados pelo magnésio que, quando ocorre despolarização neuronal, esse íon sai e ocorre o influxo de Na^+ e Ca^{2+} . Os receptores AMPA e kainato são permeáveis ao íon Na^+ . Os receptores metabotrópicos do glutamato são divididos em três grupos. O primeiro grupo possui localização pós-sináptica e são acoplados à proteína $G_{q/11}$, já o segundo e terceiro grupos são localizados pré-sinápticamente e são acoplados à proteína G_i , modulando a ação inibitória do glutamato (MILLER et al., 2011).

O orto-eugenol teve efeito antinociceptivo no teste do glutamato, sugerindo uma possível interação com o sistema glutamatérgico e/ou diminuição do processo inflamatório. Sabe-se que o eugenol modula a via dolorosa em nível espinhal por meio da regulação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (DAL BÓ et al. 2013). O análogo estrutural do

eugenol, metileugenol, inibe a dor induzida pela formalina via ativação dos receptores GABA_A que pode está envolvida na inibição da hiperalgesia mediada pelos receptores NMDA (YANO et al., 2006). Estudos mostram que o α -asarone apresenta efeito neuroprotetor via inibição dos receptores NMDA e diminuição na produção em excesso de óxido nítrico em determinadas regiões cerebrais (CHO et al., 2002; LIMON et al., 2009). Mais estudos são necessários para esclarecer a ação do orto-eugenol sobre os receptores do glutamato, uma vez que compostos com estruturas semelhantes possuem diferentes interações com o sistema glutamatérgico. De acordo com Aragão-Neto et al. (2015), o 2-alilfenol, análogo do eugenol, demonstra características de fármacos analgésicos, uma vez que foi efetivo no teste do ácido acético, teste da formalina e inibe o sistema glutamatérgico.

No intuito de elucidar o efeito antinociceptivo central do orto-eugenol, realizou-se o teste da placa quente que é um modelo utilizado para identificação de analgésicos com ação central enquanto que os anti-inflamatórios não possuem atividade neste teste. O parâmetro nociceptivo avaliado foi o tempo que o animal leva para pular com as quatro patas ou lambe a pata traseira. Ambos comportamentos representam uma integração sensorial supraespinhal, pois a estimulação térmica está associada com ativação das fibras A δ e C que transmite a informação dolorosa para o corno dorsal da medula espinhal e subsequentemente para os centros corticais (LE BARS et al., 2001; RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003).

O orto-eugenol aumentou a latência para resposta à placa quente em 30, 60 e 120 minutos após os pré-tratamentos, sugerindo um efeito antinociceptivo central o que corrobora com o resultado encontrado na primeira fase do teste da formalina. Segundo Silva-Filho et al. (2004), embora o α -asarone seja efetivo no teste da placa quente, possui propriedades sedativas o que pode mascarar o efeito analgésico desse composto.

A condução dolorosa é modulada por vários mecanismos que envolvem a interação entre estruturas centrais e periféricas (OSSIPOV et al., 2010). Com o objetivo de elucidar o possível mecanismo de ação do orto-eugenol, utilizou-se a ioimbina, antagonista adrenérgicos α_2 , no teste do ácido acético.

Os adrenoreceptores α_2 possui um papel fundamental na regulação da dor. No corno dorsal da medula espinhal, os adrenoreceptores α_2 são

encontrados nas fibras aferentes nociceptiva primárias (STONE et al., 1998). Por exemplo, a antinocicepção causada pela administração da morfina supraespinhalmente foi antagonizada pela injeção espinhal de ioimbina, antagonista adrenérgico α_2 (JENSEN; YAKSH, 1984; WIGDOR; WILCOX, 1987). Em estudo clínico, observou-se que a administração intratecal de agonista adrenérgicos α_2 melhora a dor crônica via diminuição da hiperalgesia e alodinia (HASSENBUSCH et al., 2002; RAUCK; NORTH; EISENACH, 2015). A clonidina ao ativar os receptores adrenérgicos α_2 inibe a liberação pré-sináptica de glutamato das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal, resultando na ativação do sistema noradrenérgico descendente, causando analgesia (PAN et al., 2002).

No presente estudo, mostrou-se que o bloqueio dos receptores adrenérgicos pela ioimbina reverteu a antinocicepção causada pelo orto-eugenol, sugerindo a participação dos receptores adrenérgicos α_2 nesse efeito. O eugenol também possui efeito analgésico mediado pelos receptores adrenérgicos α_2 (PARK et al., 2011). O bis-eugenol apresenta efeito antidepressivo via alterações dos sistemas adrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, como também, aumenta os níveis de serotonina, dopamina e noradrenalina no córtex estriado (AMARAL et al., 2012). Tais resultados mostram a forte interação entre os análogos estruturais do eugenol com o sistema adrenérgico.

Embora não haja registros eletrofisiológicos com o orto-eugenol, há estudos com análogos estruturais que podem sugerir essa atividade antinociceptiva. O metileugenol tem ação analgésica por inibir os canais para sódio periféricos (SELL; CARLINI, 1976; WANG et al., 2015). O efeito analgésico do eugenol pode ser atribuído à inibição dos canais para Ca^{2+} e Na^+ dependente de voltagem (LEE et al., 2005; PARK et al., 2006; CHUNG et al., 2008). Em estudo eletrofisiológico com o nervo ciático de rato, observou-se que o estragol diminui a excitabilidade neuronal de maneira dose-dependente, explicando sua ação anestésica local (LEAL-CARDOSO et al., 2004).

A dor está relacionada a várias doenças, aparecendo como um sinal do processo inflamatório. As drogas anti-inflamatórias são utilizadas para tratamento da dor e inflamação, no entanto, seu uso em longo prazo traz vários efeitos indesejáveis como úlceras pepticas. Dessa forma, novas terapias que

aliviam o processo inflamatório, dor e com menos efeitos colaterais são necessárias (TIELEMANS et al., 2014). Como o orto-eugenol reduziu a fase inflamatória induzida pela formalina, mais estudos foram realizados para confirmar essa possível atividade anti-inflamatória.

O ácido acético, ao ser administrado na cavidade peritoneal, eleva os níveis de mediadores químicos como serotonina, PGE2 e histamina no fluido peritoneal, resultando em um aumento da permeabilidade vascular e migração de células para o sítio inflamado (CHOI et al., 2006). A alteração na permeabilidade vascular ocorre devido à contração do citoesqueleto das células endoteliais, tornando o vaso permeável as proteínas plasmáticas e fluidos (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Uma vez que o orto-eugenol inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético, sugere-se que o composto em estudo possui atividade anti-inflamatória aguda por meio da diminuição na síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios que modifica o mecanismo de transmissão nociceptiva pelas fibras aferentes primárias.

O recrutamento celular para um tecido inflamado é um processo que envolve marginalização, interação entre leucócitos-endotélio, adesão e migração de células, principalmente neutrófilos, para o sítio inflamatório (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991). A administração da carragenina i.p. causa uma inflamação prolongada caracterizada por agregação de leucócitos, extravasamento de líquido, além da participação de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β), óxido nítrico, leucotrienos e PGE2, que são responsáveis pelas modificações vasculares e teciduais (LORAM et al., 2007; MAZZON; CUZZOCREA, 2007). Fármacos como os anti-inflamatórios que agem na via do ácido araquedônico, são eficazes no modelo da peritonite induzida por carragenina por meio da inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos (ALMEIDA et al., 1980). A inflamação em excesso com migração exacerbada de neutrófilos e liberação descontrolada de citocinas causa destruição tecidual, por isso, a pesquisa por novos fármacos que modulem o processo inflamatório é importante (SERHAN, 2007; FAVACHO et al., 2011).

Os dados mostram que o orto-eugenol reduz a migração de leucócitos induzida pela carragenina para cavidade peritoneal, corroborando com os resultados obtidos no teste da permeabilidade vascular. Os fenilpropanoides,

eugenol, anetol e estragol, também reduzem a migração de células estimulada por agentes quimiotáticos, por meio da diminuição do número de leucócitos que rolaram, aderiram e migraram para o tecido perivascular presente na fáscia espermática interna do escroto, mostrando que a atividade anti-inflamatória desses compostos está relacionada à inibição da infiltração de leucócitos (ESTEVÃO-SILVA et al., 2014; SILVA-COMAR et al., 2014).

No modelo da peritonite, a carragenina induz uma resposta inflamatória não específica por meio da ativação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), dentre esses, os receptores do tipo Toll (TLR) são os mais estudados e ativados em resposta a ligantes específicos (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; TSUJI et al., 2003). Por exemplo, o TLR-4 reconhece o lipopolissacarídeo e a carragenina, desencadeando ativação do fator transcricional NF- κ B e ativação da proteína cinase ativada por mitógeno - MAPK (TSUJI et al., 2003; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; CHEN et al., 2014). Quando o TLR-4 reconhece um PAMP (padrões moleculares associados a patógenos), ocorre a dimerização dos TLR induzindo a transdução de sinal iniciada pela proteína transportadora MyD88 que recruta as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) que são sequencialmente fosforiladas, desligando-se do complexo receptor e se associando ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) que, por sua vez, ativa o fator de crescimento β associado à cinase 1 (TAK1) que ativa tanto o NF- κ B quanto a família da MAP cinase (KAWAI; AKIRA, 2005; 2010; HENNESSY; PARKER; O'NEILL, 2010). A partir dessa etapa, a TAK1 ativará, por meio de fosforilação do IKK β , o complexo IKK que é formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e por uma subunidade regulatória (NEMO/IKK γ). O IKK β ativada irá fosforilar o I κ B α que torna o fator de transcrição nuclear (NF- κ B) livre para ser translocado para o núcleo, induzindo a ativação de genes responsáveis pela produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão responsáveis pela imunidade inata e adaptativa (GHOSH; KARIN, 2002; BONIZZI; KARIN, 2004; LAWRENCE; FONG, 2010; GAMBLE et al., 2012). No presente estudo, observamos que o orto-eugenol diminui a ativação de NF- κ B em células peritoneais.

A TAK1 também pode ativar, simultaneamente, a família das MAP cinases que regula respostas intracelulares como diferenciação, proliferação e

sobrevivência celular (NEBREDÁ; PORRAS, 2000; MANNING; DAVIS, 2003; SCHIEVENM, 2005). A família da MAP cinases é formada pela ERK1/2, p38 e JNK nas quais ativavam vários fatores transcricionais como AP-1 (KAWAI; AKIRA, 2010). A p38 desempenha papel fundamental na inflamação na pesquisa de novas drogas. A p38 ativada, isto é, fosforilada inicia a cascata de regulação de síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e COX-2 (SCHIEVEN, 2009). A diminuição da ativação da p38 e NF- κ B pelo orto-eugenol no teste da peritonite pode justificar a redução nas quantidades de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal. Diante desses resultados, sugere-se que o orto-eugenol pode inibir a ativação da TAK1, resultando da redução da ativação da p38 e NF- κ B. Uma vez inibida a p38 pelo orto-eugenol, haverá um bloqueio dos efeitos deletérios de várias citocinas que ainda poderiam ser produzidas.

No progresso da inflamação, várias citocinas são liberadas. O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória e, como o óxido nítrico, responsáveis pela ativação de células T e macrófagos, como também, estimula a secreção de outras citocinas inflamatórias, estando envolvido em processos imunos fisiológicos e inflamatório (BEUTLER; CERAMI, 1989). Contudo, quando a expressão é inapropriado, o TNF- α desempenha um papel importante no desenvolvimento de inflamações crônicas (SZEKANECZ, 2008). A IL-1 β é uma citocina que estimula a infiltração de neutrófilos, e que pode agir como mediador final ou através da indução e secreção de eicosanoides e quimiocinas (ZHANG et al., 2001).

Na isquemia cerebral com reperfusão subsequente ocorre um processo inflamatório local que pode ser reduzido com a administração do metileugenol devido à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas (CHOI et al., 2010). Segundo Moradi et al. (2014), o anetol possui um potente efeito inibitório na periodontite através da supressão de citocinas pró-inflamatórias, podendo esse fenilpropanoide ser uma nova estratégia terapêutica para doenças inflamatórias crônicas. O anetol apresentou maior eficácia na resposta inflamatória quando associado ao ibuprofeno devido à ação inibitória na produção de isoformas de TNF e COX (WISNIEWSKI-REBECCA et al., 2015). Dessa forma, a redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β desencadeada pela administração do orto-eugenol é fundamental para conter

uma resposta inflamatória exacerbada o que corrobora com os resultados encontrados por outros fenilpropanoides.

Em estudo realizado com eugenol, observou-se que esse composto reduz a quimiotaxia de leucócitos induzida por N-formilmetionina-leucil-fenilalanina que, ao ser administrada intraperitonealmente, ativa a proteína cinase ativada por mitógeno p38 e a 3-fosfadilinositol cinase, resultando na produção de citocinas e liberação de prostanoídes que acarreta na migração de leucócitos (FUJITA et al., 2005; MENEZES et al., 2008; ESTEVÃO-SILVA et al., 2014). Em linhagem de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo, o efeito do isoeugenol medeia bloqueio da fosforilação de ERK1/2 e p38 cinase, degradação de I- κ B α e ativação de NF- κ B (CHOI et al., 2007; PARK et al., 2007). O efeito antialérgico do metileugenol é atribuída a supressão de ERK1/2, p38, JNK, PLA2 e 5-lipoxina, assim como, inibição da COX-2 (TANG et al., 2015). No modelo de doença de Parkinson em camundongos, o α -asarone, mostrou-se um agente neuroprotetor por atenuar a neuroinflamação por meio da inibição do NF- κ B (KIM et al., 2015).

Em culturas de macrófagos RAW246.7 estimulados por LPS, o bis-eugenol inibe a atividade transcricional de NF- κ B em células (MURAKAMI et al., 2005). Já a atividade anti-inflamatória do isoeugenol é devido a sua capacidade em inibir a produção de óxido nítrico e a expressão da ciclooxigenase 2 em macrófagos, sendo esses efeitos mediados, pelo menos em parte, pelo bloqueio da fosforilação de ERK1/2 e p38 cinase (LI et al., 2006; CHOI et al., 2007). O isoeugenol diminui a produção de IL-2 por meio da redução da expressão e inibição de NF- κ B (PARK et al., 2007). A atividade anti-inflamatória do anetol envolve a participação de substância P, serotonina, bradicinina e histamina, assim como, bloqueio da ativação de NF- κ B via bloqueio da degradação de I κ B- α e supressão das respostas celulares induzidas pelo TNF (KOPP; GHOSH, 1994; CHAINY et al., 2000; PONTE et al., 2012; KANG et al., 2013; RITTER et al., 2014). Tais resultados reforçam a hipótese de que o orto-eugenol, assim como outros fenilpropanoides, possuem atividade anti-inflamatória via inibição da família da MAP cinase e NF- κ B.

Em suma, o orto-eugenol apresenta atividade antinociceptiva central e periférica em modelos de nocicepção aguda em camundongos sem alterar a coordenação motora. Embora não se saiba o mecanismo exato, sugere-se o

envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito antinociceptivo do orto-eugenol, uma vez que foi antagonizado pela ioimbina. As propriedades anti-inflamatórias do orto-eugenol envolvem a supressão da ativação de NF- κ B e p38 com consequente redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β . Diante desses resultados, torna-se evidente o potencial clínico do orto-eugenol para o tratamento da dor e inflamação.

Conclusão

7 Conclusões

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que o orto-eugenol:

- ✓ Apresenta toxicidade moderada em camundongos sem alterar a coordenação motora;
- ✓ Apresentou atividade antinociceptiva central e periférica em modelos de nocicepção com envolvimento do receptor adrenérgico α_2 ;
- ✓ Possui atividade anti-inflamatória via diminuição da migração de leucócitos no modelo da peritonite induzida por carragenina por meio da redução da expressão de TNF- α e IL-1 β via diminuição na ativação de NF- κ B e p38.

Referências

8 Referências

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, n.4, p.783-801, 2006.

ABDEL-BARRY, J.A.;AL-HAKIEM, M.H.Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of *Trigonella foenum-graecum* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 65-68, 2000.

ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v.139, n.2, p. 189-1212, 2013.

ALMEIDA, A.P.; BAYER, B.M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.214, n.1, p.74-79, 1980.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v.8, n.4, p. 310-322, 2001.

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

ALMEIDA, R.N.; AGRA, M.D.E. F, MAIOR, F.N.; DE SOUSA, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. **Molecules**, v.16, n.3, p. 2726-2742, 2011.

AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.; DE AQUINO NETO, M.R.; MOURA, B.A.; DE CARVALHO, A.M.; VASCONCELOS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.; VASCONCELOS, S.M.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, F.C. Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.27, n.5, p.471-482, 2013.

AMIROUCHE, A.; TADESSE, H.; LUNDE, J.A.; BÉLANGER, G.; CÔTÉ, J.; JASMIN, B.J. Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics. **Human Molecular Genetics**, v.22, n.15, p. 3093-3111, 2013.

AOKI, M.; TSUJI, M.; TAKEDA, H.; HARADA, Y.; NOHARA, J.; MATSUMIYA, T.; CHIBA, H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.550, n.1-3, p.78-83, 2006.

APKARIAN, A.V.; BUSHNELL, M.C.; TREEDE, R.D.; ZUBIETA, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v.9, n.4, p. 463-484, 2005.

ARAGAO NETO, H. C. ; FONSÊCA, D. V. ; SALGADO, P.R.R. ; MELO, C. G. F. ; BRAGA, R. M. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; ALMEIDA, R. N. **Antinociceptive activity of phenylpropanoid 2-allylphenol**. In: 23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, 2015.

BAKER, R.G.; HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metabolism**, v.13, n.1, p. 11-22, 2011.

BALDWIN, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v.14, p. 649-683, 1996.

BALIKI, M.N.; APKARIAN, A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, v.87, n.3, p.474-491, 2015.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. Principles of Neuroscience. New York: Appleton and Lange, p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, n.2, p. 267-284, 2009.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v.924, n.2, p.219-228, 2002.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. **Annual Review of Immunology**, v.7, p. 625-655, 1989.

BONICA, J.J. The need of a taxonomy. **Pain**, v.6, n.3, p. 247-248, 1979.

BONIZZU, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v.25, n.6, p.280-288, 2004.

BORDI, F.; UGOLINI, A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. **Progress in Neurobiology**, v.59, n.1, p.55-79, 1999.

BURGOYNE, C.C.; GIGLIO, J.A.; REESE, S.E.; SIMA, A.P.; LASKIN, D.M. The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.68, n.1, p.144-148, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-253, 2004.

BUSHNELL, M.C.; CEKO, M.; LOW, L.A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, n.7, p. 502-511, 2013.

CARR, F.B.; ZACHARIOU, V. Nociception and pain: lessons from optogenetics. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, n.69, p. 1-9, 2014.

CARVALHO, A.A.; ANDRADE, L.N.; DE SOUSA, É.B.; DE SOUSA, D.P. Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. **BioMed Research International**, 392674, 2015. doi: 10.1155/2015/392674.

CARLINI, E.A.; DALLMEIER, K.; ZELGER, J.L. Methyleugenol as a surgical anesthetic in rodents. **Experientia**, v.37, n.6, p.588-589, 1981.

CAVALCANTE-SILVA, L.H.; FALCÃO, M.A.; VIEIRA, A.C.; VIANA, M.D.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; SOUSA, J.C.; DA SILVA, T.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; NOËL, F.; DE MIRANDA, G.E.; SANTOS, B.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Assessment of mechanisms involved in antinociception produced by the alkaloid caulerpine. **Molecules**, v.19, n.9, p.14699-14709, 2014.

CHAINY, G.B.; MANNA, S.K.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v.19, n.25, p.2943-2950, 2000.

CHAVANNE, M.; JULLIEN, A.; BEAUDOIN, G. J.; FLAMAND, E. Chimie organique expérimentale, Modulo: Mont-Royal (Québec), p.751-756, 1986.

CHEN, C.C.; ZIMMER, A.; SUN, W.H.; HALL, J.; BROWNSTEIN, M.J.; ZIMMER, A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.99, n.13, p. 8992-8997, 2002.

CHEN, Q.X.; MIAO, J.K.; LI, C.; LI, X.W.; WU, X.M.; ZHANG, X.P. Anticonvulsant Activity of Acute and Chronic Treatment with α -Asarone from *Acorus Gramineus* in Seizure Models. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.1, p.23-30, 2013.

CHEN, H.; WANG, F.; MAO, H.; YAN, X. Degraded λ -carrageenan activates NF- κ B and AP-1 pathways in macrophages and enhances LPS-induced TNF- α secretion through AP-1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, n.7, p.2162-2170, 2014.

CHO, J.; KIM, Y.H.; KONG, J.Y.; YANG, C.H.; PARK, C.G. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. **Life Sciences**, v.71, n.5, p.591-599, 2002.

CHOI, J.H.; JUNG, B.H.; KANG, O.H.; CHOI, H.J.; PARK, P.S.; CHO, S.H.; KIM, Y.C.; SOHN, D.H.; PARK, H.; LEE, J.H.; KWON, D.Y. The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *cynanchi paniculati* radix. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.5, p.971-975, 2006.

CHOI, C.Y.; PARK, K.R.; LEE, J.H.; JEON, Y.J.; LIU, K.H.; OH, S.; KIM, D.E.; YEA, S.S. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase. **European Journal of Pharmacology**, v.576, n.1-3, p.151-159, 2007.

CHOI, Y.K.; CHO, G.S.; HWANG, S.; KIM, B.W.; LIM, J.H.; LEE, J.C.; KIM, H.C.; KIM, W.K.; KIM, Y.S. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free Radical Research**, v.44, n.8, p.925-935, 2010.

CHUNG, G.; RHEE, J.N.; JUNG, S.J.; KIM, J.S.; OH, S.B. Modulation of CaV2.3 calcium channel currents by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.87, n.2, p.137-141, 2008.

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.

COSENTINO, R.M.; NORTE, M.C.; LAZARINI, C. Estragole-induced behavioural changes in rats. **Phytotherapy research**, v.18, n.11, p.921-924, 2004.

COTRAN, R.S.; MAJNO, G. The delayed and prolonged vascular leakage in inflammation. I. Topography of the leaking vessels after thermal injury. **American Journal of Pathology**, v.45, p.261-281, 1964.

COURTOIS, G.; GILMORE, T.D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, v.25, n.51, p. 6831-6843, 2006.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, CE, Brazil, 1981.

DAL BÓ, W.; LUIZ, A.P.; MARTINS, D.F.; MAZZARDO-MARTINS, L.; SANTOS, A.R. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.27, n.5, p.517-525, 2012.

DANIEL, A.N.; SARTORETTO, S.M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, p.212-217, 2009.

DE VINCENZI, M.; SILANO, M.; STACCHINI, P.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol. **Fitoterapia**, v.71, n.2, p.216-221, 2000.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v.61, n.1, p.17-24.

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

DING, J.; HUANG, C.; PENG, Z.; XIE, Y.; DENG, S.; NIE, Y.Z.; XU, T.L.; GE, W.H.; LI, W.G.; LI, F. Electrophysiological characterization of methyleugenol: a novel agonist of GABA(A) receptors. **ACS Chemical Neuroscience**, v.5, n.9, p.803-811, 2014.

DUFFIN, R.; LEITCH, A.E.; FOX, S.; HASLETT, C.; ROSSI, A.G. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. **Immunological Reviews**, v.236, p. 28-40, 2010.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.46, n.3, p.208-209, 1957.

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

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYAY, D.; ZEGGWAGH, N.A. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.142087, 2012.

ESMAEILI, F.; RAJABNEJHAD, S.; PARTOAZAR, A.R.; MEHR, S.E.; FARIDI-MAJIDI, R.; SAHEBGHARANI, M.; SYEDMORADI, L.; RAJABNEJHAD, M.R.; AMANI A. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2015. DOI: 10.3109/10837450.2015.1078353

ESTEVIÃO-SILVA, C.F.; KUMMER, R.; FACHINI-QUEIROZ, F.C.; GRESPAN, R.; NOGUEIRA DE MELO, G.A.; BARONI, S.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan. **Journal of Natural Medicines**, v.68, n.3, p.567-575, 2014.

FAVACHO, H.A.S.; OLIVEIRA, B.R.; SANTOS, K.C.; MEDEIROS, B.J.L.; SOUZA, P.J.C.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.T.C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Euterpe oleracea oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, p. 105-114, 2011.

FERLAND, C.E.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. **Phytotherapy Research**, v.26, n.9, p.1278-1285, 2012.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**, v.14, p. 219-245, 1991.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R (eds) Textbook of pain. Churchill Livingstone, London, p. 309–329, 1999.

FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain**, v.155, n.3, p.511-521.

FRANCHOME, P.; PENOEL, D. L'Aromathérapie Exactement: Encyclopedie de l'Utilisation Thérapeutique des Huiles Essentielles. Roger Jollois Edition, Limoges, France, 1995.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.30, p. 18515-18517, 1997.

FRIEDRICH, H. Phenylpropanoid constituents of essential oils. **Lloydia**, v.39, n.1, p. 1-7, 1976.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v.15, n.1, p. 29-58, 2001.

FUJITA, T.; ZAWAWI, K.H.; KURIHARA, H.; VAN DYKE, T.E. CD38 cleavage in fMLP- and IL-8-induced chemotaxis is dependent on p38 MAP kinase but independent of p44/42 MAP kinase. **Cellular Signalling**, v.17, n.2, p.167-175, 2005.

GAMBLE, C.; MCINTOSH, K.; SCOTT, R.; HO, K.H.; PLEVIN, R.; PAUL, A. Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. **British Journal of Pharmacology**, v.165, n.4, p. 802-819, 2012.

GASPARINI, C.; FELDMANN, M. NF- κ B as a target for modulating inflammatory responses. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, n.35, p. 5735-5745, 2012.

GHIA, J.E.; LI, N.; WANG, H.; COLLINS, M.; DENG, Y.; EL-SHARKAWY, R.T.; CÔTÉ, F.; MALLET, J.; KHAN, W.I. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. **Gastroenterology**, v.137, n.5, p. 1649-1660, 2009.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v.109 n. S81-S96, 2002.

GÓMEZ ESTRADA, H. A.; GONZÁLEZ RUIZ, K. N.; MEDINA, J. D. Anti-inflammatory Activity of Natural Products. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.10, n. 3, p. 182-217, 2011.

GONG, L.; LI, T.; CHEN, F.; DUAN, X.; YUAN, Y.; ZHANG, D.; JIANG, Y. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. **Food Chemistry**, v.196, p. 324-330, 2016.

HALL, J.C.; HEEL, K.A.; PAPADIMITRIOU, J.M.; PLATELL, C. The pathobiology of peritonitis. **Gastroenterology**, v.114,n.1, p.185-196, 1998.

HAN, H.C.; LEE, D.H.; CHUNG, J.M. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. **Pain**, v.84, n.2-3, p. 253-261, 2000.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, n.4-5, p. 413-421, 2002.

HASSENBUSCH, S.J.; GUNES, S.; WACHSMAN, S.; WILLIS, K.D. Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study. **Pain Medicine**, v.3, n.2, p.85-91, 2002.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes & Development**, v.18, n.18,p. 2195-2224, 2004.

HENNESSY, E.J.; PARKER, A.E.; O'NEILL, L.A. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, n.4, p.293-307, 2010.

HENSON, P.M.; MURPHY, R.C. Mediators of the inflammatory process. Elsevier, Amsterdam, p.404, 1989.

HOWARD, F.M. "Chronic pelvic pain," **Obstetrics and Gynecology**, v. 101, n. 3, p. 594–611, 2003.

HOWARD, F.M. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v.16, n.5, p. 540-550, 2009.

HUANG, C.; LI, W.G.; ZHANG, X.B.; WANG, L.; XU, T.L.; WU, D.; LI, Y. Alpha-asarone from *Acorus gramineus* alleviates epilepsy by modulating A-Type GABA receptors. **Neuropharmacology**, v.65, p.1-11, 2013.

HUANG, G.J.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; SHAO, Y.Y.; CHEN, C.C.; HOU, W.C.; KUO, Y.H. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3 beta-ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.12, p. 7445-7452, 2010.

HUANG, C.C.; LIN, K.J.; CHENG, Y.W.; HSU, C.A.; YANG, S.S.; SHYUR, L.F. Hepatoprotective effect and mechanistic insights of deoxyelephantopin, a phyto-

sesquiterpene lactone, against fulminant hepatitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.3, p. 516-530, 2013.

HUH, J.E.; JUNG, I.T.; CHOI, J.; BAEK, Y.H.; LEE, J.D.; PARK, D.S.; CHOI, D.Y. The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v.698, n.1-3, p. 57-66, 2013.

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

IJEOMA, U.F.; ADERONKE, S.O.; OGBONNA, O.; AUGUSTINA, M.A.; IFEYINWA, C.N. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of Ipomoea involucrata leaves in mice and rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.2, p.121-124, 2011.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. **Brain Research**, v.321, n.2, p.287-297, 1984.

JI, R.R.; SAMAD, T.A.; JIN, S.X.; SCHMOLL, R.; WOOLF, C.J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v.36, n.1, p. 57-68, 2002.

JI, R.R. Peripheral and central mechanisms of inflammatory pain, with emphasis on MAP kinases. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v.3, n.3, p. 299-303, 2004.

JI, R.R.; KOHNO, T.; MOORE, K.A.; WOOLF, C.J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, v.26, n.12, p. 696-705, 2003.

KANG, P.; KIM, K.Y.; LEE, H.S.; MIN, S.S.; SEOL, G.H. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Life Sciences**, v.93, n.24, p.955-961, 2013.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. **Advances in Immunology**, v.121, n. 41-89, 2014.

KARIM, F.; KANUI, T.I.; MBUGUA, S. Effects of codeine, naproxen and dexamethasone on formalin-induced pain in the naked mole-rat. **Neuroreport**, v.4, n.1, p.25-28, 1993.

KAUR, G.; SULTANA, S. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.8, p.2689-2695, 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v.17, n.4, p.338-344, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v.11, n.5, p.373-384, 2010.

KAWASAKI, Y.; KUMAMOTO, E.; FURUE, H.; YOSHIMURA, M. Alpha 2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. **Anesthesiology**, v.98, n.3, p. 682-689, 2003.

KAWAURA, K.; MIKI, R.; URASHIMA, Y.; HONDA, S.; SHEHATA, A.M.; SOEDA, F.; SHIRASAKI, T.; TAKAHAMA, K. Típepidine enhances the antinociceptive-like action of carbamazepine in the acetic acid writhing test. **European Journal of Pharmacology**, v.651, n.1-3, p.106-108, 2011.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, v.265, n.5174, p.956-959, 1994.

KÖNIG, B.; JAEGER, K.E.; KÖNIG, W. Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.104, n.1, p. 33-41, 1994.

KIM, S.S.; OH, O.J.; MIN, H.Y.; PARK, E.J.; KIM, Y.; PARK, H.J.; NAM HAN, Y.; LEE, S.K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. **Life Sciences**, v.73, n.3, p.337-348, 2003.

KIM, B.W.; KOPPULA, S.; KUMAR, H.; PARK, J.Y.; KIM, I.W.; MORE, S.V.; KIM, I.S.; HAN, S.D.; KIM, S.K.; YOON, S.H.; CHOI, D.K. α -Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-induced behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v.97, p.46-57, 2015.

KIM, M.; LI, Y.X.; DEWAPRIYA, P.; RYU, B.; KIM, S.K. FLORIDOSIDE suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia. **BMB Reports**, v.46, n.8, p. 398-403, 2013.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n.11, p.4651-4655, 1991.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A.F.; MAGALHÃES, P.J.; LEAL-CARDOSO, J.H.; GLORIA, P.D. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sciences**, v.74, n.19, p.2401-2412, 2004.

LARSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v.1, p. 335-359, 1983.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.10, p.787-95, 2002.

LAWRENCE, T.; FONG, C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, n.4, p.519-523, 2010.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, n.4, p.597-652, 2001.

LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An Acad Bras Cienc**. v.71, n.2, p.207-213, 1999.

LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; PINTO DUARTE, G.I.; SANTOS, M.A., MAGALHÃES, P.J. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. **Canadian Journal of Physiology & Pharmacology**, v.80, n.9, p.901-916, 2002.

LEAL-CARDOSO, J.H.; MATOS-BRITO, B.G.; LOPES-JUNIOR, J.E.; VIANA-CARDOSO, K.V.; SAMPAIO-FREITAS, A.B.; BRASIL, R.O.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; ALBUQUERQUE, A.A. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.8, p.1193-1198, 2004.

LEE, M.H.; YEON, K.Y.; PARK, C.K.; LI, H.Y.; FANG, Z.; KIM, M.S.; CHOI, S.Y.; LEE, S.J.; LEE, S.; PARK, K.; LEE, J.H.; KIM, J.S.; OH, S.B. Eugenol

inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *Journal of Dental Research*, v.84, n.9, p.848-851, 2005.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.9, p. 678-689, 2007.

LOSCHER, W.; FASSBENDER, C.P.; NOLTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs: II. Maximal electroshock seizure models. **Epilepsy Research**, v.8, n.2, p.79-94, 1991.

LUKAS, G.; BRINDLE, S.D.; GREENGA, R.D.P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 178, p. 562-566, 1971.

LUSZCZKI, J.J.; ANDRES, M.M.; CZUCZWAR, P.; CIOCZEK-CZUCZWAR, A.; WOJCIK-CWIKLA, J.; RATNARAJ, N.; PATSALOS, P.N.; CZUCZWAR, S.J. Levetiracetam selectively potentiates the acute neurotoxic effects of topiramate and carbamazepine in the rotarod test in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, n.6, p.609-616, 2005.

LI, Q.; OUYANG, H.; WANG, P.; ZENG, W. The antinociceptive effect of intrathecal escin in the rat formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v.674, n.2-3, p.234-238, 2012.

LI, W.; TSUBOUCHI, R.; QIAO, S.; HANEDA, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. **Biomedical Research**, v.27, n.2, p. 69-74, 2006.

LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.; CARVALHO, F.A.; MIÚRA, L.M.; LEITE, J.R.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, n.2, p.283-292, 2012.

LIMÓN, I.D.; MENDIETA, L.; DÍAZ, A.; CHAMORRO, G.; ESPINOSA, B.; ZENTENO, E.; GUEVARA, J. Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta (25-35). **Neuroscience Letters**, v.453, n.2, p.98-103, 2009.

LIRA, S.A.; FURTADO, G.C. The biology of chemokines and their receptors. **Immunologic Research**, v.54, n.1-3, p. 111-120, 2012.

LU, Y.; DONG, H.; GAO, Y.; GONG, Y.; REN, Y.; GU, N.; ZHOU, S.; XIA, N.; SUN, Y.Y.; JI, R.R.; XIONG, L. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. **Journal of Clinical Investigation**, v.123, n.9, p. 4050-4062, 2013.

LÓPEZ, M.L.; HERNÁNDEZ, A.; CHAMORRO, G.; MENDOZA-FIGUEROA, T. alpha-Asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes. **Planta medica**, v.59, n.2, p.115-120, 1993.

LORAM, L.C.; FULLER, A.; FICK, L.G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Journal of Pain**, v.8, n.2, p.127-136, 2007.

LYNN, B. Neurogenic inflammation caused by cutaneous polymodal receptors. **Progress in brain research**, v.113, p. 361-368, 1996.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, n.7, p. 521-532, 2005.

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

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v.114, n.5, p.1069-1075, 1995.

MANNING, A.M.; DAVIS, R.J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.7, p. 554-565, 2003.

MARTINS, D.F.; EMER, A.A.; PAULA BATISTI, A.; DONATELLO, N.; CARLESSO, M.G.; MAZZARDO-MARTINS, L.; VENZKE, D.; MICKE, G.A.; PIZZOLATTI, M.G.; PAULA PIOVEZAN, A.; DOS SANTOS, A.R. Inhalation of Cedrus atlantica essential oil Alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation Pathways in a mouse model of postoperative pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v.S0378-8741, n.15, p.30116-1, 2015.

MAZE, M.; TRANQUILLI, W. Alpha-2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. **Anesthesiology**, v.74, n.3, p. 581-605, 1991.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respiratory Research**, v.8, n.75, p.1-19, 2007.

MAYAUD, L.; CARRICAJO, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, n.3, p. 167-173, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v.140, n.6, p. 771-776, 2010.

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; AND RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In Wall and Melzack's Textbook of Pain, S.B. McMahon and M. Koltzenburg, eds. (Elsevier), p. 3–34, 2006.

MENEZES, G.B.; REZENDE, R.M.; PEREIRA-SILVA, P.E.; KLEIN, A.; CARA, D.C.; FRANCISCHI, J.N. Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration in vivo and in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v.598, n.1-3, p.118-122, 2008.

MNAFGUI, K.; HAJJI, R.; DERBALI, F.; GAMMOUDI, A.; KHABBABI, G.; ELLEFI, H.; ALLOUCHE, N.; KADRI, A.; GHARSALLAH, N. Anti-inflammatory, Antithrombotic and Cardiac Remodeling Preventive Effects of Eugenol in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Wistar Rat. **Cardiovascular Toxicology**, 2015. doi 10.1007/s12012-015-9343-x

MOHAMAD, A.S.; AKHTAR, M.N.; ZAKARIA, Z.A.; PERIMAL, E.K.; KHALID, S.; MOHD, P.A.; KHALID, M.H.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.H.; SULAIMAN, M.R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.647, n.1-3, p.103-109, 2010.

MIDDLETON, J.; NEIL, S.; WINTLE, J.; CLARK-LEWIS, I.; MOORE, H.; LAM, C.; AUER, M.; HUB, E.; ROT, A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. **Cell**, v.91, n.3, p. 385-395, 1997.

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

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v.66, n.6, p.355-474, 2002.

MILLER, K.E.; HOFFMAN, E.M.; SUTHARSHAN, M.; SCHECHTER, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, n.3, p. 283-309, 2011.

MOORE, K.A.; KOHNO, T.; KARCHEWSKI, L.A.; SCHOLZ, J.; BABA, H.; WOOLF, C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v.22, n.15, p. 6724-6731, 2002.

MORADI, J.; ABBASIPOUR, F.; ZARINGHALAM, J.; MALEKI, B.; ZIAEE, N.; KHODADOUSTAN, A.; JANAHMADI, M. Anethole, a Medicinal Plant Compound, Decreases the Production of Pro-Inflammatory TNF- α and IL-1 β in a Rat Model of LPS-Induced Periodontitis. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n.4, p.1319-1325, 2014.

MÖSSNER, R.; LESCH, K.P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.12, n.4, p. 249-271, 1998.

MURAKAMI, Y.; SHOJI, M.; HIRATA, A.; TANAKA, S.; YOKOE, I.; FUJISAWA, S. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.434, n.2, p.326-332, 2005.

NANGLE, M.R.; GIBSON, T.M.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Planta Medica**, v.72, n.6, p.494-500, 2006.

NATHAN, C.F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v.80, n.6, p. 1550-1560, 1987.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v.140, n.6, p. 871-882, 2010.

NEBREDA, A.R.; PORRAS, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, n.6, p. 257-260, 2000.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v.93, n.1, p.197-203, 2001.

O'BRYAN, C.A.; PENDLETON, S.J.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. Potential of Plant Essential Oils and Their Components in Animal Agriculture - in vitro

Studies on Antibacterial Mode of Action. **Frontiers in Veterinary Science**, v.2, n.35, p.1-8, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, W.M ; BENEDITO, R.B; PEREIRA, W.B; TORRES, P.A; RAMOS, C.F.A.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.M. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.27, n.4, p.419-426, 2013.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAMA, Y.; HAZAMA, K.; NAMIKI, A. Activation of peripheral NMDA-nitric oxide cascade in formalin test. **Anesthesiology**, v.93, n.1, p.173-178, 2000.

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, n.3, p.1469-1476, 2011.

ORTIZ, M.I.; LOZANO-CUENCA, J.; GRANADOS-SOTO, V.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G. Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.91, n.1, p.32-37, 2008.

OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F. Descending modulation of pain. In: Merskey H, Loeser JD, Dubner R (eds) The paths of pain 1975–2005. IASP Press, Seattle, p 117–130, 2005.

OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.11, p. 3779-3787, 2010.

OYEMITAN, I.A.; IWALEWA, E.O.; AKANMU, M.A.; OLUGBADE, T.A. Antinociceptive and antiinflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* G.Baker (Annonaceae) in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v.5, n.4, p. 355-362, 2008.

PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v.18, n.49, p. 6853-6866, 1999.

PAN, Y.Z.; LI, D.P.; PAN, H.L. Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II(o) neurons by presynaptic alpha(2)-adrenergic receptors. **Journal of Neurophysiology**, v.87, n.4, p.1938-1947, 2002.

PARADA, C.A.;TAMBELI, C.H.;CUNHA, F.Q.;FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, n.4, p.937-944, 2001.

PARK, C.K.; LI, H.Y.; YEON, K.Y.; JUNG, S.J.; CHOI, S.Y.; LEE, S.J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. **Journal of Dental Research**, v.85, n.10, p.900-904, 2006.

PARK, K.R.; LEE, J.H.; CHOI, C.; LIU, K.H.; SEOG, D.H.; KIM, Y.H.; KIM, D.E.; YUN, C.H.; YEA, S.S. Suppression of interleukin-2 gene expression by isoeugenol is mediated through down-regulation of NF-AT and NF-kappaB. **International Immunopharmacology**, v.7, n.9, p.1251-1258, 2007.

PARK, S.H.; SIM, Y.B.; LEE, J.K.; KIM, S.M.; KANG, Y.J.; JUNG, J.S.; SUH, H.W. The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. **Archives of Pharmacal Research**, v.34, n.3, p.501-507, 2011.

PAULA-FREIRE, L.I.; ANDERSEN, M.L.; MOLSKA, G.R.; KÖHN, D.O.; CARLINI, E.L. Evaluation of the Antinociceptive Activity of Ocimum gratissimum L. (Lamiaceae) Essential Oil and Its isolated Active Principles in Mice. **Phytotherapy Research**, v.27, n.8, p.1220-1224, 2012.

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. **European Journal of Pharmacology**, v.716, n.1-3, p.2-7, 2013.

PERRETTI, M.; LEROY, X.; BLAND, E.J.; MONTERO-MELENDEZ, T. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, n.11, p. 737-755, 2015.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B.E. KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v.22, n.2, p. 153-183, 2001.

PONTE, E.L.; SOUSA, P.L.; ROCHA, M.V.; SOARES, P.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H.; ASSREUY, A.M. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v.64, n.4, p. 984-990, 2012.

PIETERSMA, A.; TILLY, B.C.; GAESTEL, M.; DE JONG, N.; LEE, J.C.; KOSTER, J.F.; SLUITER, W. p38 mitogen activated protein kinase regulates

endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.230, n.1, p. 44-48, 1997.

PIRES, C.O.; TAQUEMASA, A.V.C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAUJO, C.E.P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.176-182, 2004.

PRASAD, S.N.; MURALIDHARA. Neuroprotective Efficacy of Eugenol and Isoeugenol in Acrylamide-Induced Neuropathy in rats: Behavioral and Biochemical evidence. **Neurochemical Research**, v.38, n.2, p.330-345, 2013.

RAINVILLE, P.; DUNCAN, G.H.; PRICE, D.D.; CARRIER, B.; BUSHNELL, M.C. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. **Science**, v.277, n.5328, p. 968-971, 1997.

RAUCK, R.L.; NORTH, J.; EISENACH, J.C. Intrathecal clonidine and adenosine: effects on pain and sensory processing in patients with chronic regional pain syndrome. **Pain**, v.156, n.1, p.88-95, 2015.

REJÓN-ORANTES, J.C.; SUARÉZ, D.P.; REJÓN-RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ, S.H.; LIÉVANO, O.E.; RODRÍGUEZ, D.L.; MORA, M.P. Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n.2, p.522-526, 2013.

REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **Journal of Orofacial Pain**, v.13, n.3, p. 155-163, 1999.

REN, F.; ZHANG, H.Y.; PIAO, Z.F.; ZHENG, S.J.; CHEN, Y.; CHEN, D.X.; DUAN, Z.P. Inhibition of glycogen synthase kinase 3b activity regulates Toll-like receptor 4-mediated liver inflammation. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v.20, n.9, p. 693-697, 2012.

RITTER, A.M.; AMES, F.Q.; OTANI, F.; DE OLIVEIRA, R.M.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Effects of anethole in nociception experimental models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. doi: 10.1155/2014/345829.

RUFFOLO, R.R Jr.; HIEBLE, J.P. Alpha-adrenoceptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v.61, n.1-2, p.1-64, 1994.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.1, p.91-95, 2003.

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

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

SÁ, R. C. S.; ANDRADE, L.N.; DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, R.; DE SOUSA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v.19, n.2, p. 1459-1480, 2014.

SATYANARAYANA, P.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.28, n.4, p.641-649, 2004.

SARMENTO-NETO, J.F.; DO NASCIMENTO, L.G.; FELIPE, C.F.; DE SOUSA, D.P. Analgesic Potential of Essential Oils. **Molecules**, v.21, n.1, p.1-29, 2016.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.12, p. 965-975, 2002.

SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **Journal of Neurophysiology**, v.60, n.6, p. 2180-2195, 1988.

SCHAIBLE, H.G. Basic mechanisms of deep somatic tissue. In: McMahon SB, Koltzenburg M (eds) Textbook of pain. Elsevier, London, p 621–633, 2005.

SEGERDAHL, A.R.; MEZUE, M.; OKELL, T.W.; FARRAR, J.T.; TRACEY, I. The dorsal posterior insula subserves a fundamental role in human pain. **Nature Neuroscience**, v.18, n.4, p. 499-500, 2015.

SELL, A.B.; CARLINI, E.A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**, v.14, n.4, p.367-377, 1976.

SENANAYAKE, U.M.; WILLS, R.B.H.; LEE, T.H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. **Phytochemistry**, v.16, n.12, p.2032-2033, 1977.

SEO, H.; LI, H.Y.; PEREZ-REYES, E.; LEE, J.H. Effects of eugenol on T-type Ca²⁺ channel isoforms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.347, n.2, p.310-317, 2013.

SERHAN, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. **Annual Review of Immunology**, v.25, p. 101-137, 2007.

SERHAN, C.N.; BRAIN, S.D.; BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L.A.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G.; WALLACE, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.21, n.2, p. 325-332, 2007.

SCHIEVEN, G.L. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.5, n.10, p. 921-928, 2005.

SCHIEVEN, G.L. The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.9, n.11, p. 1038-1048, 2009.

SILVA FILHO, A.A.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CARVALHO, J.C.; BASTOS, J.K. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.9, p.1179-1184, 2004.

SILVA-COMAR, F.M.; WIIRZLER, L.A.; SILVA-FILHO, S.E.; KUMMER, R.; PEDROSO, R.B.; SPIRONELLO, R.A.; SILVA, E.L.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

SOBER, H.A.; HOLLANDER, F.; SOBER, E.K. Toxicity of eugenol; determination of LD₅₀ on rats. **Experimental Biology and Medicine**, v.73, n. 1, p.148-151, 1950.

SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.16, n.3, p. 2233-2252, 2011.

STEINEGGER, E.; HÄNSEL, R. *Pharmakognosie*, 5rd ed. Berlin: Springer Verlag, 1992.

STONE, L.S.; BROBERGER, C.; VULCHANOVA, L.; WILCOX, G.L.; HÖKFELT, T.; RIEDL, M.S.; ELDE, R. Differential distribution of alpha_{2A} and

alpha2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v.18, n.15, p.5928-5937, 1998.

SUGIURA, Y.; TERUI, N.; HOSOYA, Y. Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. **Journal of Neurophysiology**, v.62, n.4, p. 834-840, 1989.

SZEKANECZ, Z. Pro-inflammatory cytokines in atherosclerosis. **Israel Medical Association Journal**, v.10, n.7, p. 529-530, 2008.

TAHER, Y.A. Antinociceptive activity of Mentha piperita leaf aqueous extract in mice. **Libyan Journal of Medicine**, v.7, p.1-5, 2012.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v.21, p.335-376, 2003.

TANG, F.; CHEN, F.; LING, X.; HUANG, Y.; ZHENG, X.; TANG, Q.; TAN, X. Inhibitory effect of methyleugenol on IgE-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 cells. **Mediators of Inflammation**, 2015. doi: 10.1155/2015/463530.

TIELEMANS, M.M.; VAN ROSSUM, L.G.; EIKENDAL, T.; FOCKS, J.J.; LAHEIJ, R.J.; JANSEN, J.B.; VAN OIJEN, M.G. Gastrointestinal symptoms in NSAID users in an 'average risk population': results of a large population-based study in randomly selected Dutch inhabitants. **International Journal of Clinical Practice**, v.68, n.4, p.512-519, 2014.

TISSERAND, R.; BALACS, T. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. Churchill Livingstone, New York, 1995.

TODD, A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v.11, n.12, p. 823-836, 2010.

TREEDE, R.D.; KENSHALO, D.R.; GRACEY, R.H.; JONES, A.K. The cortical representation of pain. **Pain**, v.79, n.2-3, p. 105-111, 1999.

TSUJI, R.F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N.M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical & Experimental Allergy**, v.33, n.2, p.249-258, 2003.

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.

VAN DYKE, T.E. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. **Periodontol** 2000, v.45, p. 10–13, 2007.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal**, v.1, n.2, p. 89-96, 1987.

VILLALBA, B.T.; IANISKI, F.R.; WILHELM, E.A.; FERNANDES, R.S.; ALVES, M.P.; LUCHESE, C. Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. **Life Sciences**, v.115, n.1-2, p.36-43, 2014.

VOGT, B.A. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, n.7, p. 533-544, 2005.

VON BANCHET, G.S.; PETROW, P.K.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H.G. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. **Arthritis Research**, v.2, n.5, p. 424-427, 2000.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v.55, n.7, p.999-1003, 1992.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12, n.2, p. 121-127, 2000.

WADA, T.; HASEGAWA, Y.; ONO, H. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes in facilitation of rat spinal motoneuron activity. **European Journal of Pharmacology**, v.340, n.1, p. 45-52, 1997.

WANG, X.; ZHANG, J.; EBERHART, D.; URBAN, R.; MEDA, K.; SOLORZANO, C.; YAMANAKA, H.; RICE, D.; BASBAUM, A.I. Excitatory superficial dorsal horn interneurons are functionally heterogeneous and required for the full behavioral expression of pain and itch. **Neuron**, v.78, n.2, p. 312-324, 2013.

WANG, Z.J.; LEVINSON, S.R.; SUN, L.; HEINBOCKEL, T. Identification of both GABAA receptors and voltage-activated Na(+) channels as molecular targets of anticonvulsant α -asarone. **Frontiers in Pharmacology**, 2014. doi: 10.3389/fphar.2014.00040.

WANG, Z.J.; TABAKOFF, B.; LEVINSON, S.R.; HEINBOCKEL, T. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its

antinociceptive and anesthetic actions. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.36, n.7, p.791-799, 2015.

WEIDNER, C.; SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; HANSSON, B.; HANDWERKER, H.O.; TOREBJÖRK, H.E. Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. **Journal of Neuroscience**, v.19, n.22, p. 10184-10190, 1999.

WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M.B.; JOHNSON, G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, v.79, n.1, p. 143-180, 1999.

WILLIS, W.D.; COGGESHALL, R.E. Sensory mechanisms of the spinal cord, 3rd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.

WILLIAMSON, K. L. Macroscale and Microscale Organic Experiments, 2nd ed., D. C. Heath: Lexington (Massachusetts), 1994, 106-107.

WILLIANS, E.M. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley and Sons. Chichester, Eng., 1996.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.22, p.246-53, 1964.

WIGDOR, S.; WILCOX, G.L. Central and systemic morphine-induced antinociception in mice: contribution of descending serotonergic and noradrenergic pathways. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.242, n.1, p.90-95, 1987.

WISNIEWSKI-REBECCA, E.S.; ROCHA, B.A.; WIIRZLER, L.A.; CUMAN, R.K.; VELAZQUEZ-MARTINEZ, C.A.; BERSANI-AMADO, C.A. Synergistic effects of anethole and ibuprofen in acute inflammatory response. **Chemico-Biological Interactions**, v.242, p.247-253, 2015.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v.55, n.3, p. 353-364, 2007.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v.140, n.6, p. 441-451, 2004.

WOODWORTH, R.S.; SHERRINGTON, C.S. **Journal of Physiology**, v.31, n.3-4, p. 234-243, 1904.

WU, B.N.; HWANG, T.L.; LIAO, C.F.; CHEN, I.J. Vaninolol: a new selective beta 1-adrenoceptor antagonist derived from vanillin. **Biochemical Pharmacology**, v.48, n.1, p.101-109, 1994.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; KASE, Y.; TAKEDA, S.; WATANABE, S.; ABURADA, M.; MIYAMOTO, K. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, n.553, v.1-3, p. 99-103, 2006.

YASHPAL, K.; FISHER, K.; CHABOT, J.G.; CODERRE, T.J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, v.94, n.1, p.17-29, 2001.

Anexos

9 Anexos

9.1 Certidão da comissão de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 28 de maio de 2013.

CEUA Nº 0201/13

Ilmo(a). **Reinaldo Nóbrega de Almeida**

Departamento Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(a) : **Diogo Vilar da Fonsêca, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E DAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DO ISOEUGENOL EM CAMUNDONGOS NORMAIS E DIABÉTICOS.**

Com previsão de empregar **48 Camundongos SWISS Fêmeas; 422 Camundongos SWISS Machos;** - ANIMAIS PROVÉM DO **BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/03/13 a 01/03/16**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBIotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – ceua@lbf.ufpb.br

9.2 Artigos publicados ou submetidos na vigência do doutorado

1. DE QUEIROZ, RONALDO ; DE CARVALHO, FABÍOLA ; FONSÊCA, DIOGO ; BARBOSA-FILHO, JOSÉ ; SALGADO, PAULA ; PAULO, LUCIANO ; DE QUEIROZ, ANA ; PORDEUS, LIANA ; DE SOUZA, SEVERINO ; SOUZA, HELIVALDO ; LIRA, BRUNO ; DE ATHAYDE-FILHO, PETRÔNIO . Antinociceptive Effect of Hydantoin 3-Phenyl-5-(4-ethylphenyl)-imidazolidine-2,4-dione in Mice. **Molecules** (Basel. Online), v. 20, p. 974-986, 2015.
2. SALGADO, PAULA ; DA FONSÊCA, DIOGO ; BRAGA, RENAN ; DE MELO, CYNTHIA ; ANDRADE, LUCIANA ; DE ALMEIDA, REINALDO ; DE SOUSA, DAMIÃO . Comparative Anticonvulsant Study of Epoxycarvone Stereoisomers. **Molecules** (Basel. Online), v. 20, p. 19660-19673, 2015.
3. FONSÊCA, DIOGO V.; SALGADO, PAULA R. R. ; DE CARVALHO, FABÍOLA L. ; SALVADORI, MIRIAN GRACIELA S. S. ; PENHA, ANTÔNIA ROSÂNGELA S. ; LEITE, FAGNER C. ; BORGES, CLÓVIS JOSÉ S. ; PIUVEZAM, MARCIA R. ; PORDEUS, LIANA CLÉBIA DE MORAIS ; SOUSA, DAMIÃO P. ; ALMEIDA, REINALDO N. . Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. xx, p. n/a-n/a, 2015.
4. SANTOS, ALINE KELLY FELÍCIO DE SOUSA ; DA FONSECA, DIOGO VILAR ; SALGADO, PAULA REGINA RODRIGUES ; MUNIZ, VANESSA MORAIS ; DE ARRUDA TORRES, PAULA ; LIRA, NARLIZE SILVA ; DA SILVA DIAS, CELIDARQUE ; DE MORAIS PORDEUS, LIANA CLÉBIA ; BARBOSA-FILHO, JOSÉ MARIA ; DE ALMEIDA, REINALDO NOBREGA . Antinociceptive activity of Sargassum polyceratum and the isolation of its chemical components. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 25, p. 683-689, 2015.
5. MAIA, A. K. H. L. ; QUEIROZ, R. B. D. ; FONSÊCA, D. V. ; PINHO, A. S. ; GOLZIO, S. S. ; ALENCAR, J. L. ; TAVARES, J. F. ; ALMEIDA, R. N. ; MORAIS, L. C. S. L. . Antinociceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, p. 152-162, 2014.
6. SA,R.C.S. ; OLIVEIRA, L.E.G ; FONSÊCA, D. V. ; BHATTACHARYYA, J. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; ALMEIDA, R. N. Central Nervous System effects of *Dioclea grandiflora* pods on mice. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, p. 446-456, 2013.

-
7. CARVALHO, F. L.; FONSÊCA, D. V.; PENHA, A. R. S.; SALVADORI, M. G. S. S.; SALGADO, P. R. R.; PEREIRA, C. K. S.; LEITE, F. C.; PIUVEZAM, M. R.; SOUSA, S. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; PORDEUS, L. C. M.; ALMEIDA, R. N. Involvement of pro-inflammatory cytokines and nociceptive pathways on the pharmacological activity of hydantoin derivative 5-(4-isopropylphenyl)-3-phenyl-imidazolidine-2,4-dione. **Pharmaceutical biology**, 2015 (ARTIGO SUBMETIDO).
 8. SOUTO MAIOR, F. N.; FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P. R. R.; MONTE, L. O.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. **Pharmaceutical biology**, 2015 (ARTIGO SUBMETIDO).

9.3 Trabalhos publicados em anais de eventos científicos na vigência do doutorado

1. FONSÊCA, D. V.; ARAGAO NETO, H. C. ; GOLZIO, A. M. F. O. ; VIDAL, A. A. J. ; ROCHA, H. A. O. ; ALMEIDA, R. N. . Atividade antioxidante do fenilpropanóide 2-alilfenol. **4º Encontro de Química da Universidade Federal da Paraíba**, 2015.
2. SALVADORI, M. G. S. S.; FONSÊCA, D. V. ; ARAGAO NETO, H. C. ; SALGADO, P.R.R. ; BRAGA, R. M. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; MELO, C. G. F. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; ALMEIDA, R. N. . Glutamatergic system involvement in activity antinociceptive o- eugenol. **9th IBRO World Congress on Neuroscience**, 2015, Rio de Janeiro.
3. ARAGAO NETO, H. C.; FONSÊCA, D. V. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; BARBOSA FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. . ATIVIDADE ANTICONOCICEPTIVA CENTRAL DO ORTO-EUGENOL. **6º Curso e Conferências em Neurociências e Comportamento**, 2015, João Pessoa.
4. FONSÊCA, D. V.; ARAGAO NETO, H. C. ; SALGADO, P.R.R. ; LEITE, F.C. ; MELO, C. G. F. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; BRAGA, R. M. ; ALMEIDA, R. N. . Ortho-eugenol exhibits anti-inflammatory activity: involvement of the proinflammatory cytokines. **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.
5. MELO, C. G. F. ; SALGADO, P.R.R. ; FONSÊCA, D. V. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; BRAGA, R. M. ; ARAGAO NETO, H. C. ; SOUSA, D.P. ; ALMEIDA, R. N. . Evaluation of anticonvulsant activity of the monoterpene synthetic (1s)-(-)-verbenone. **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.
6. CALDAS FILHO, M. R. D. ; FONSÊCA, D. V. ; MELO, C. G. F. ; BRAGA, R. M. ; ARAGAO NETO, H. C. ; SOUSA, D.P. ; ALMEIDA, R. N. . Investigation of antinociceptive activity of the monoterpene (+)-3-carene in mice. **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.

7. SALGADO, P.R.R.; FONSÊCA, D. V. ; BRAGA, R. M. ; MELO, C. G. F. ; ARAGAO NETO, H. C. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; LEITE, F.C. ; SOUSA, D.P. ; ALMEIDA, R. N. Comparative anticonvulsant activity of the isomers of epoxy-carvone in mice. **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.
8. ARAGAO NETO, H. C.; FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P.R.R. ; MELO, C. G. F. ; BRAGA, R. M. ; CALDAS FILHO, M. R. D. ; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive activity of phenylpropanoid 2-allylphenol. **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.
9. ROCCA, V. L. ; FONSÊCA, D. V. ; ALMEIDA, R. N. ; SOUZA, D.P. . Evaluation of acute toxicity and the antinociceptive effects of monoterpene geraniol. **I Simpósio de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba**, 2014, João Pessoa.
10. FREITAS, G. A. ; FONSÊCA, D. V. ; OLIVEIRA, K. H. D. ; LUNA, V. R. ; LIMA, E. Q. ; PORDEUS, L. C. M. Efeitos da administração oral do sumo de spondias sp. na resposta antinociceptiva de camundongos. **IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2014, João Pessoa.
11. SANTOS, A.K.F.S. ; MONTE, L. O. ; SALGADO, P.R.R. ; FONSÊCA, D. V. ; Muniz, V. M. ; Dias, C. S. ; TORRES, P.A ; ALMEIDA, R. N. . Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratum* em camundongos. **IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2014, João Pessoa.
12. FREITAS, G. A. ; CUNHA, M. M. ; MARTINS, S. F. ; CARVALHO, F.L ; OLIVEIRA, K. H. D. ; Luna, V. R. ; SOUSA, I. B. M. B. E. ; FONSÊCA, D. V. ; MORAIS, L. C. S. L . CARACTERIZAÇÃO PSICOFARMACOLÓGICA DA *Lavandula Angustifolia* Miller EM MODELOS ANIMAIS. **I Congresso norte-nordeste de neurociências e comportamento**, 2014, João Pessoa.
13. FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P.R.R. ; Muniz, V. M. ; SANTOS, A. K. F. S. ; ROCCA, V. L. ; CARVALHO, F.L ; SALVADORI, M. G. S. S. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; ALMEIDA, R. N. . Antinociceptive activity of two analogues structural eugenol. **46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2014, Fortaleza.

-
14. ROCCA, V. L.; FONSÊCA, D. V.; NOBREGA, F.F.F. ; ALMEIDA, R. N. . Antinociceptive effect of monoterpene geraniol not involves opioid system. **46 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2014, Fortaleza.
 15. FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P.R.R. ; LEITE, F.C. ; PIUVEZAM, M. R. ; SOUSA, D.P. ; ALMEIDA, R. N. . Atividade anti-inflamatória do nerolidol. **53 Congresso Brasileiro de Química**, 2013, Rio de Janeiro.
 16. MAIA, A. K. H. L. ; SALGADO, P.R.R. ; FONSÊCA, D. V. ; MOTA, C. A. X. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; SOUZA, S. A. ; ATHAYDE-FILHO, P.F. ; ALMEIDA, R. N. ; MORAIS, L. C. S. L. . AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTICONVULSIVANTES DO 3-FENIL-5-(4-METILFENIL)-IMIDAZOLIDIN-2,4-DIONA (HPA-05) EM CAMUNDONGOS. In: **53º Congresso Brasileiro de Química**, 2013, Rio de Janeiro.
 17. PEREIRA, C. K. S. ; NOBREGA, F.F.F. ; FONSÊCA, D. V. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; OLIVEIRA, A. M. F. ; PENHA, A. R. S. ; MATIAS, W. N. ; SOUZA, M.F.V. ; ALMEIDA, R. N. . Anti-inflammatory activity and glutamatergic system participation on antinociceptive activity of ethyl acetate phase of *Herisantia crispa* (L.) Brizicky. **5º Congresso Brasileiro de Biotecnologia**, 2013, Florianópolis.
 18. SILVA, T. S. ; GOMES, J. M. ; FONSÊCA, D. V. ; ALMEIDA, R. N. ; AGRA, M. F. ; SILVA, M. S. ; TAVARES, J. F. . Avaliação da atividade antinociceptiva de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae). **V Congresso iberoamericano de ciencias farmacêuticas**, 2013, Goiânia.
 19. SANTOS, A.K.F.S.; FONSÊCA, D. V. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; PENHA, A. R. S. ; SALGADO, P.R.R. ; PEREIRA, C. K. S. ; CARVALHO, F.L ; SOUZA, D.P ; ALMEIDA, R. N. Avaliação da toxicidade aguda do monoterpeno (-)-mirtenol. **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2013, Porto Alegre.
 20. MONTE, L. O. ; PINHEIRO, L. S.; FONSÊCA, D. V. ; SALGADO, P.R.R. ; SIMOES, S. ; ALMEIDA, R. N. Efeitos centrais e antinociceptivo de um novo derivado salicílico, o salicilato de borneol. **V Simpósio em Psicobiologia**, 2013, Natal.
 21. CARVALHO, F.L ; FONSÊCA, D. V. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; PENHA, A. R. S. ; SOUZA, S.A ; ATHAYDE-FILHO, P.F ; MORAIS, L. C. S. L ; ALMEIDA, R. N. Envolvimento dos receptores opioides na atividade antinociceptiva da hidantoína IM-7. **V Simpósio em Psicobiologia**, 2013, Natal.

-
22. OLIVEIRA, K. H. D. ; FONSÊCA, D. V. ; GUEDINE, C. R. C. ; CARVALHO, F.L ; SALGADO, P.R.R. ; MORAIS,L.C.S.L. . Avaliação do efeito anti-nociceptivo de cajarana (*Apondias* sp.) EM ROEDORES. **3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica**, 2013, Recife.
23. OLIVEIRA, K. H. D. ; FONSÊCA, D. V. ; GUEDINE, C. R. C. ; SILVA, J. A. ; MORAIS,L.C.S.L. . Atividade anti-nociceptiva de cajarana (*spondias* sp.) em camundongos. **V Simpósio em Psicobiologia**, 2013, Natal.
24. GUEDINE, C. R. C. ; BRAGA, R. M. ; OLIVEIRA, K. H. D. ; FONSÊCA, D. V. ; MORAIS, L. C. S. L . Efeito ansiolítico do leite e soro do leite de cabra em camundongos. **V Simpósio em Psicobiologia**, 2013, Natal.
25. LEITE, F.C.; RIBEIRO FILHO, J. ; COSTA, H. F. ; SALGADO, P.R.R. ; ALVES, A. F. ; CALHEIROS, A. S. ; FONSÊCA, D. V. ; BOZZA, P. T. ; PIUVEZAM, M. R. Anti-inflammatory and analgesic effect of curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *chondrodendron platyphyllum* (menispermaceae). **11th World Congress on Inflammation**, 2013, Natal.