



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

**DAVIDSON BARBOSA ASSIS**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO FENILPROPANÓIDE 2-ALILFENOL**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

**DAVIDSON BARBOSA ASSIS**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO FENILPROPANÓIDE 2-ALILFENOL**

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

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

**DAVIDSON BARBOSA ASSIS**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO FENILPROPANÓIDE 2-ALILFENOL**

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

**Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima  
Examinadora interna – UFPB**

---

**Prof. Dr. Walter Mendes de Oliveira Júnior  
Examinador externo – UFPB**

Aos meus pais, **Francisco** e **Severina**, pelos seus  
exemplos em vida e por sempre me mostrar aquilo  
que realmente importava: o conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e me ajudado a perseverar em todos os momentos difíceis.

Ao meus pais e aos meus irmãos Alysson, Raissa e Andreza, por sempre me incentivar a buscar os meus sonhos, bem como guiar durante as horas de dúvidas e dificuldades, e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

Ao Prof. Dr Reinaldo Nóbrega de Almeida, por sua bondade, disponibilidade e por ter em mim depositado seu tempo e, principalmente, sua confiança ao me tornar seu orientando e abrir as portas da pós-graduação quando eu nada tinha e mesmo assim me apresentei no intuito de almejar o grau de mestre. Ao senhor, exemplo ímpar de professor, pesquisador e ser iluminado: o meu mais sincero obrigado.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos a mim transferidos, pelo aprendizado contínuo e por me mostrar novos conhecimentos em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marianna Vieira Sobral por seus conselhos e pela sua disponibilidade.

À minha namorada Jéssica, pela sua paciência, companheirismo e atenção dedicados a mim durante esse projeto.

Ao doutor Diogo Vilar, por sua boa vontade e por me ajudar de forma bem significativa em todos os processos acadêmicos.

Ao meu amigo Renan Marinho Braga, que no decorrer dessa jornada, foi o primeiro a me incentivar, orientar, criticar, ensinar, enfim; por ser a luz a guiar meus caminhos, o ombro amigo a acalmar e me dar forças a continuar mesmo quando o pensamento e a vontade fraquejavam. Sem você grande amigo, esse sonho não seria possível. À você meu mais sincero, obrigado!

Aos estudantes de iniciação científica Humberto Neto e Terezinha Weyne, por sua presteza em me ajudar e de sua disponibilidade para realizar os experimentos e serem parceiros de bancada.

A todos os amigos da turma do mestrado, por sua participação direta e indireta no meu aprendizado e por serem companheiros nessa jornada.

À secretaria da pós-graduação na figura de Caroline Manguiera, por sua ajuda, orientação e “paciência” em todos os momentos nos quais precisei de sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Walter Mendes de Oliveira Júnior, colega e amigo de profissão, por me falar e me apresentar este programa de mestrado, por ter mencionado da existência do Prof. Dr Reinaldo. E por ter me encorajado a percorrer esse árduo caminho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima e Prof. Dr. André Telis de Vilela Araújo, pela pronta disponibilidade em fazer parte de minha banca examinadora.

Aos funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George, em especial a Crispim, por todos os serviços prestados.

A todos que de alguma forma participaram da realização deste trabalho, meu MUITO OBRIGADO!

*“Aliviar a dor é obra divina”*

*(Hipócrates)*

## RESUMO

ASSIS, D.B. **Efeito antinociceptivo do fenilpropanóide 2-alilfenol**. 2016. 81p. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB / CCS / IPeFarM, João Pessoa – PB.

O 2-alilfenol é um fenilpropanóide amplamente comercializado na China sob o nome de Yinguo. Apresenta similaridade estrutural ao ginkgol composto isolado do fruto ginkgo. Possui atividade fungicida já relatada na literatura, porém sua ação em processos dolorosos nunca foi estudada. O presente estudo investigou o efeito do 2-alilfenol, pela via intraperitoneal, em modelos experimentais de dor em camundongos. Inicialmente, foi realizada a pesquisa da dose letal 50 (DL50) do fenilpropanóide, no intuito de estabelecer doses seguras para os testes subsequentes. Em seguida, foram realizadas metodologias para avaliar a atividade antinociceptiva. O 2-alilfenol (25, 50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) reduziu o número de contorções, quando comparado ao grupo controle. No teste da formalina, utilizando as doses 75 e 100 mg/kg, o 2-alilfenol reduziu o tempo de lambida da pata na fase neurogênica (0-5 min) e na fase inflamatória (15-30 min). No teste da placa quente, que é sensível e específico para drogas que atuam por mecanismos supra-espinhais, o 2-alilfenol não alterou a latência na retirada da pata. Enquanto que no teste da nocicepção induzida por glutamato, a dose de 100mg/kg do 2-alilfenol reduziu o tempo de lambida da pata. A partir destes resultados podemos propor que a ação antinociceptiva do 2-alilfenol pode estar modulando a via da dor a tanto periféricamente quanto centralmente em níveis espinhais. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo do 2-alilfenol foram usadas ferramentas farmacológicas no teste da formalina. A antinocicepção produzida pelo 2-alilfenol foi significativamente bloqueada em animais pré-tratados com cafeína (10 mg/kg, s.c.), apenas na segunda fase do teste, indicando o envolvimento do sistema adenosinérgico. O efeito antinociceptivo do 2-alilfenol, contudo, não foi revertido pela naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opioides, 5 mg/kg, s.c.) e pela glibenclamida (bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> ATP, 10 mg/kg, i.p.), sugerindo que o 2-alilfenol não atua por esses mecanismos.

**Palavras-chave:** fenilpropanóide, 2-alilfenol, dor, antinocicepção

## ABSTRACT

ASSIS, D.B. **Antinociceptive effect of the phenylpropanoid 2-allylphenol.** 2016. 81p. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB / CCS / IPeFarM, João Pessoa.

2-allylphenol is a phenylpropanoid widely marketed in China under the name Yinguo. It presents structural similarity to ginkgol the isolated compound from ginkgo fruit and has fungicidal activity already reported in the literature, however its effect in painful process has not been studied yet. This work aims to investigate the antinociceptive activity of 2-allylphenol in experimental models of pain in mice. Firstly, it was carried out the determination of the lethal dose 50 (LD50), in order to establish safe doses for subsequent tests. Then methodologies were performed to evaluate the antinociceptive activity. 2-allylphenol (25, 50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) reduced the number of writhes, when compared to the control group. In the formalin test, in the doses 75 e 100 mg/kg, 2-allylphenol reduced the licking paw time on neurogenic (0-5 min) and inflammatory phase (15-30 min). In the hot plate test, which is sensible and specific to drugs that act by supraspinal mechanisms, 2-allylphenol did not change the latency in the paw withdrawal. While the test of nociception induced by glutamate, the 100mg/kg 2-allylphenol dose reduced the licking paw time. Based on these results we propose that the antinociceptive action of 2-allylphenol may be modulating pain via both peripherally as centrally in spinal levels. In an attempt to elucidate the mechanism of action involved in the antinociceptive effect of 2-allylphenol were used pharmacological tools in the formalin test. The antinociception produced by the 2-allylphenol was significantly blocked in animals pretreated with caffeine (10 mg/kg, s.c.), only in the second phase of the test, indicating the involvement of adenosinergic system. The antinociceptive effect of the 2-allylphenol, however, was not reversed by naloxone (non-selective antagonist of opioid receptors, 5 mg/kg, s.c.) and glibenclamide (K<sup>+</sup> ATP channel blocker, 10 mg/kg, i.p.), suggesting that 2-allylphenol does not act by these mechanisms.

**Keywords:** phenylpropanoid, 2-allylphenol, pain, antinociception

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas químicas do eugenol (1), metileugenol (2), biseugenol (3), o-eugenol (4).....	17
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da siringina.....	17
<b>Figura 3</b> – Estrutura química do anetol.....	18
<b>Figura 4</b> – Via nociceptiva ascendente.....	24
<b>Figura 5</b> – Estrutura química do 2-alilfenol.....	29
<b>Figura 6</b> – Camundongo ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss macho.....	33
<b>Figura 7</b> – Aparelho do campo aberto.....	34
<b>Figura 8</b> – Aparelho da placa quente.....	34
<b>Figura 9</b> – Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do fenilpropanóide 2-alilfenol. ....	35
<b>Figura 10</b> – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	43
<b>Figura 11</b> – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste da formalina.....	44
<b>Figura 12</b> – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina.....	44
<b>Figura 13</b> – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (100mg/kg, i.p.) e morfina (10mg/kg, i.p.) sob a latência para salto no teste da placa quente.....	45
<b>Figura 14</b> – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata no teste do glutamato....	46
<b>Figura 15</b> – Efeito da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.....	47

<b>Figura 16</b> – Efeito da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.....	48
<b>Figura 17</b> – Efeito da cafeína (10 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.....	49
<b>Figura 18</b> – Efeito da cafeína (10 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.....	49
<b>Figura 19</b> – Efeito da glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.....	50
<b>Figura 20</b> – Efeito da glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses do 2-alilfenol.....	42
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
κ	Kappa
°C	Graus Celcius
μL	Microlitros
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AP</b>	Área parabraquial
<b>ASIC's</b>	Canais iônicos sensíveis a ácido
<b>ATP</b>	Adenosina tri-fosfato
<b>BRV</b>	Bulbo rostroventral

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>CONT</b>	Controle
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Mediana
<b>E.U.A.</b>	Estados Unidos da América
<b>et al.</b>	E colaboradores
<b>g</b>	Grama
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor para o ácido gama-aminobutírico tipo A
<b>GRD</b>	Glânglio da raiz dorsal
<b>h</b>	Hora(s)
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IPeFarM</b>	Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potássio
<b>K<sup>+</sup> ATP</b>	Canal de potássio ativado por ATP
<b>mg</b>	Miligrama(s)
<b>min</b>	minutos
<b>m/s</b>	Metros por segundo
<b>mg/kg</b>	Miligramas por quilograma
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MK-801</b>	Antagonista não competitivo do receptor NMDA
<b>MOR</b>	Morfina
<b>n</b>	Número de animais
<b>NGF</b>	Fator de crescimento do nervo
<b>NLX</b>	Naloxona
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NS</b>	Células nociceptivas
<b>OBS</b>	Observação
<b>PAG</b>	Substância periaquedutal cinzenta
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandinas do tipo E <sub>2</sub>
<b>p.o.</b>	Via oral
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SP</b>	Substância P
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TrKA</b>	Receptor de tirosina quinase A
<b>TRPA1</b>	Receptor de Potencial Transitório relacionado à proteína Anquirina 1
<b>Tween 80</b>	Polioxetileno Sorbitano Monoleato
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>VR-1</b>	Receptor vanilóide do tipo 1

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

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>20</b>
2.1. Dor .....	20
2.2. Fisiopatologia .....	21
2.3. Sistema opióide e antinocicepção .....	25
2.4. Sistema adenosinérgico e antinocicepção .....	26
2.5. Canais para K <sup>+</sup> e antinocicepção .....	27
2.6. <i>Ginkgo biloba</i> .....	27
2.7. Fenilpropanóides.....	28
2.7.1. 2-Alilfenol .....	28
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
<b>4. MATERIAIS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Animais .....	33
4.2. Condições Experimentais .....	33
4.3. Substâncias Utilizadas .....	33
4.4. Aparelhagem.....	34
<b>5. MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
5.1. Teste Preliminar .....	35
5.1.1. Determinação da dose letal 50% (DL <sub>50</sub> ).....	35
5.2. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	36
5.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	36
5.2.2. Teste da formalina .....	37
5.2.3. Teste da placa quente .....	38
5.2.4. Teste da nocicepção induzida pelo glutamato .....	38
5.3. Investigação do mecanismo de ação antinociceptivo do 2-alilfenol .....	39

5.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide.....	39
5.3.2. Estudo do envolvimento dos sistemas adenosinérgico.....	39
5.3.3. Participação dos canais de K <sup>+</sup> ATP.....	39
5.4. Análise estatística .....	40
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
6.1. Teste Preliminar .....	42
6.1.1. Determinação da dose letal 50% (DL50) .....	42
6.2. Avaliação do Efeito Antinociceptivo .....	42
6.2.1. Efeito do 2-alilfenol no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	42
6.2.2. Efeito do 2-alilfenol no teste da formalina .....	43
6.2.3. Efeito do 2-alilfenol no teste da placa quente .....	45
6.2.4. Efeito do 2-alilfenol no teste do glutamato .....	45
6.3. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação na atividade antinociceptiva do nerolidol.....	46
6.3.1. Participação do sistema opióide .....	46
6.3.2. Participação do sistema adenosinérgico.....	48
6.3.3. Participação dos canais de K <sup>+</sup> ATP .....	49
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>10. ANEXO.....</b>	<b>81</b>
Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	81



# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A dor normalmente acompanha a maioria das doenças que acometem os seres humanos, alertando o organismo para a presença de estímulos danosos (WOOLF; SALTER, 2000). É a causa mais frequente de procura aos serviços de saúde, sua prevalência na população pode chegar a 40%. No Brasil, 1/3 das consultas médicas são motivadas por queixa de dores, sendo encontrada em 70% dos pacientes (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Quando não adequadamente tratada, a dor pode se tornar um incômodo na vida dos pacientes e também das pessoas que convivem com eles. Sendo uma das principais causas de depressão e de isolamento social (MARTA *et al.*, 2010). Assim, identificar a causa e aliviar esse sintoma é, com certeza, parte importante do tratamento de qualquer doença.

O tratamento da dor tem sido motivo de preocupação e de vários estudos tanto para pesquisadores quanto para indústria farmacêutica, pois apesar da variedade de substâncias e do avanço no desenvolvimento das terapias de controle da dor, ainda há uma necessidade urgente de analgésicos potentes e com menos efeitos adversos, principalmente para os casos de dor crônica, onde a melhor alternativa farmacológica ainda é a morfina, apesar dos efeitos indesejáveis.

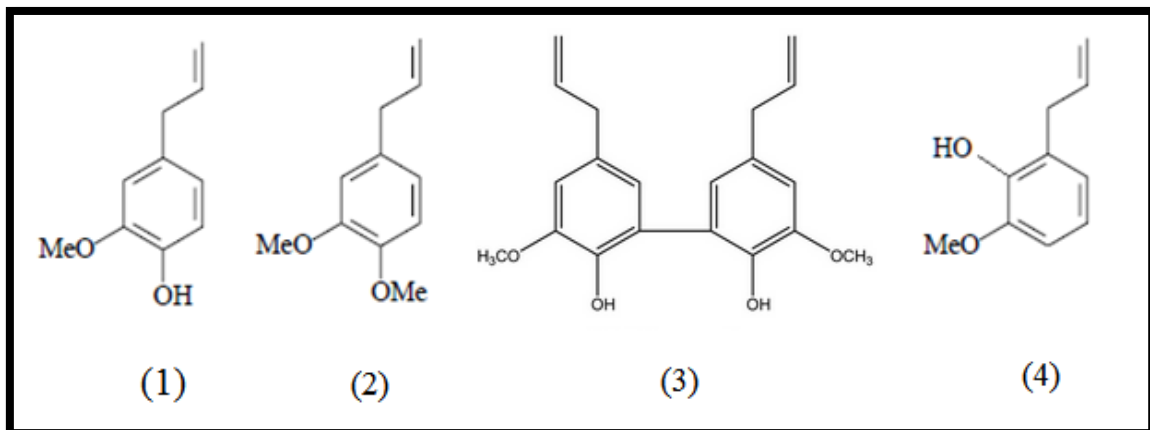
No início do século XIX, o isolamento da morfina a partir do ópio trouxe notoriedade aos produtos naturais como uma importante fonte de novas substâncias com ação biológica (KINGHORN, 2001; SAMUELSSON, 2004; FONSÊCA, 2012). Entre os produtos naturais utilizados na prática terapêutica, os óleos essenciais se destacam pelos efeitos farmacológicos oriundos de uma diversidade químico-estrutural dos seus constituintes.

Vários estudos relatam as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais como antimicrobiano, hepatoprotetor, anticonvulsivante, antitumoral e ansiolítica (ALMEIDA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; OROFINO KREUGER *et al.*, 2012) além de analgésica e anti-inflamatória (DA SILVA *et al.*, 2008; DE SOUSA; ALMEIDA, 2005; DE SOUSA, 2011). Essas atividades estão relacionadas aos seus constituintes, entre os quais se destacam os terpenóides e os

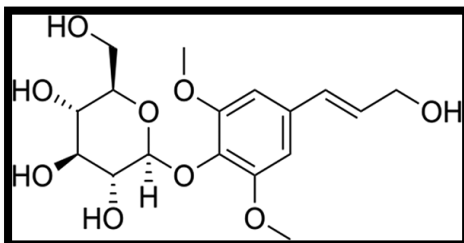
fenilpropanóides que são compostos lipofílicos e de baixo peso molecular (STEINEGGER; HANSEL, 1992).

Recentemente, muitos estudos têm elucidado a atividade antinociceptiva de vários fenilpropanóides, como por exemplo, o eugenol (KURIAN et al., 2006), siringina (US et al., 2015) e o anetol (RITTER et al., 2013).

O eugenol é um fenilpropanóide extensamente utilizado como analgésico tópico na clínica odontológica. Estudos sugerem que seu efeito analgésico ocorre pela inibição do receptor de capsaicina e canais de  $Ca^{2+}$  ativados por alta voltagem (OHKUBO; SHIBATA, 1997; LEE et al., 2005). Análogos estruturais do eugenol (Figura 1) como metileugenol, biseugenol (PEANAL et al., 2004) e o-eugenol (FONSÊCA et al., 2016), também apresentam atividade antinociceptiva já descrita na literatura.



**Figura 1** – Estruturas químicas do eugenol (1), metileugenol (2), biseugenol (3) e o-eugenol (4).

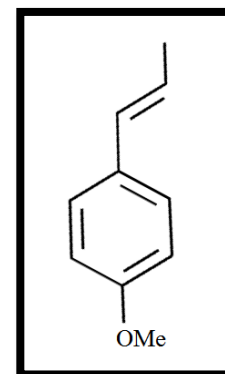


**Figura 2** – Estrutura química da siringina

A siringina é um fenilpropanóide glicosídico (Figura 2) inicialmente isolada das cascas de *Syringa vulgaris* por Meillet em 1841. É extensamente distribuída em muitos tipos de plantas. Pode ser chamada também de Eleuterosideo B, quando isolada das raízes de *Eleutherococcus senticosus* (US et al., 2015). Seu efeito antinociceptivo foi sugerido após apresentar resultados

satisfatórios no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e no teste da placa quente (CHOI et al., 2004).

O anetol é um fenilpropanóide obtido principalmente a partir do óleo essencial de *Illicium verum*, *Pimpinella anisum*, e *Foeniculum vulgare* e compreende mais de 90% da composição do óleo essencial dessas plantas (YANG et al., 2010). Esse composto ainda pode estar presente em menores concentrações nos óleos essenciais de erva-cidreira (6.1%), coentro (0.5%), e manjerição (0.08%) (CHAINY et al., 2000).



**Figura 3** – Estrutura química do anetol

Seu efeito antinociceptivo periférico foi sugerido pela efetividade no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, na segunda fase do teste da formalina e no teste do glutamato, provavelmente atuando na redução de mediadores inflamatórios (RITTER et al., 2013).

O 2-alilfenol também é um fenilpropanóide que apresenta estrutura similar ao ginkgol isolado do fruto ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (ZHAOLI et al., 1995; MENG et al., 2007). De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, antes da execução experimental deste trabalho, poucos estudos foram publicados com esta substância e nenhum destes investigaram seu potencial analgésico. Portanto, diante da constante busca por novos fármacos de origem vegetal com eficácia terapêutica e menos efeitos colaterais, houve interesse no estudo antinociceptivo do 2-alilfenol em modelos experimentais de dor. A partir desta pesquisa, o aumento do conhecimento sobre efeitos farmacológicos do 2-alilfenol poderá despertar o interesse dos pesquisadores para investigações adicionais com este fenilpropanóide e contribuir para o desenvolvimento de um novo medicamento.



## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*), a dor é uma “experiência emocional e sensorial desagradável associada com um dano tecidual real ou potencial” ou seja essa sensação dolorosa é, na verdade, um importante sistema de alerta que nos protege de perigos reais ou iminentes de lesões, acionando respostas de proteção ao organismo. Em condições normais, a dor serve para proteção e adaptação do nosso corpo (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A dor é considerada uma experiência complexa, pois não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo, mas existe também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, responsável pelas diferentes respostas comportamentais à dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; SCHOLZ; WOOLF, 2002). Em animais de laboratório, estes fatores geralmente não são levados em consideração, sendo pouco influentes ou inexistentes nos experimentos. Por isso que a utilização do termo “dor” é exclusiva para seres humanos, uma vez que apenas estes conseguem mensurar de forma relativamente precisa apenas os aspectos neurosensoriais da dor. Portanto, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos, nocicepção e antinocicepção para animais (TJØLSEN; HOLE, 1997; RUSSO; BROSE, 1998; DA SILVA, 2013).

Portanto, vale salientar a diferença entre os termos: dor e nocicepção. A dor possui uma natureza subjetiva caracterizada por sintomas físicos e psicológicos, a nocicepção pode ocorrer independente da dor, já que é um processo fisiológico que não apresenta um componente subjetivo (LOESER; TREEDE, 2008). O termo nocicepção é a detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados às fibras A $\delta$  e C, as quais transmitem sinais ao sistema nervoso central, influenciados pela inflamação e por estímulos ambientais físicos ou químicos (LOESER; MELZACK, 1999).

A dor pode ser classificada de acordo com a origem, ou de acordo com a duração. Quanto à duração, a dor pode ser considerada aguda, sendo de curta

duração e limitada a área afetada, desaparecendo com a eliminação desse estímulo nocivo (RIEDEL; NEECK, 2001), ou crônica, quando persiste por um tempo maior, e está associada com processos patológicos crônicos ou decorrentes de lesões do SNC ou periférico (LOESER; MELZACK, 1999).

Com relação à origem, a dor pode ser classificada como nociceptiva, ocorrendo por ativação direta e/ou excessiva de nociceptores (receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos) ou neuropática, que ocorre como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afete o sistema somatossensorial, seja em nível periférico ou central. Há ainda a dor de origem inflamatória, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios, levando a situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente a um estímulo nocivo, ou alodínia, caracterizada pela sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos não nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; DOS SANTOS, 2013).

## **2.2. Fisiopatologia**

Os aspectos que envolvem a neurofisiologia da dor podem ser divididos didaticamente em quatro processos distintos: transdução, transmissão, modulação e percepção (KELLY et al, 2001).

(1) Transdução: essa etapa se refere à transformação de um estímulo nocivo mecânico, térmico ou químico em impulsos elétricos pelos nociceptores. As terminações livres são encontradas na pele, mucosas, fáscias, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais (MILLAN, 1999, LOESER; TREEDE, 2008). Elas são excitadas apenas por estímulos intensos, sugerindo que tenham propriedades biofísicas e moleculares que as permitam detectar seletivamente estímulos nocivos. Os nociceptores possuem canais iônicos como TRP (receptores de potencial transiente), canais de sódio como os sensíveis à tetrodotoxina e receptores acoplados à proteína G, que transduzem a energia do estímulo em potenciais de ação para o axônio que conduz os estímulos até a medula espinal (WOOLF; MA, 2007).

(2) Transmissão: refere-se à propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico até o sistema nervoso central. A transmissão tem início nos axônios dos neurônios nociceptivos. Assim, um estímulo essencialmente nocivo é capaz de estimular um nociceptor que transduz o sinal gerando potencial de ação que percorre pela fibra nociceptiva. Essas fibras são classificadas de acordo com suas características anatômicas, velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009).

As fibras de pequeno diâmetro são as que originam a maioria dos nociceptores. Neste grupo, encontram-se as fibras do tipo C e do tipo A $\delta$ , que são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo sob condições fisiológicas. As fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas, conduzem o impulso elétrico em uma velocidade entre 12 e 30 m/s e são responsáveis pela chamada “primeira dor” (DA SILVA, 2013).

As fibras C conduzem o estímulo a uma velocidade em torno de 0,5 a 2 m/s (mais lento que as fibras do tipo A $\delta$ ) porque não possuem bainha de mielina e são responsáveis pela chamada “segunda dor”, uma dor mais difusa e prolongada. Elas são em sua maioria conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001). A maior parte das fibras C também responde a estímulos químicos nocivos como ácido ou capsaicina (CATERINA et al, 1997). Existem ainda fibras nociceptivas silenciosas (“silent” ou “sleeping”), que compreendem uma proporção das fibras aferentes, que normalmente não são responsivos a estímulos. No entanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizadas e responsivas (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009).

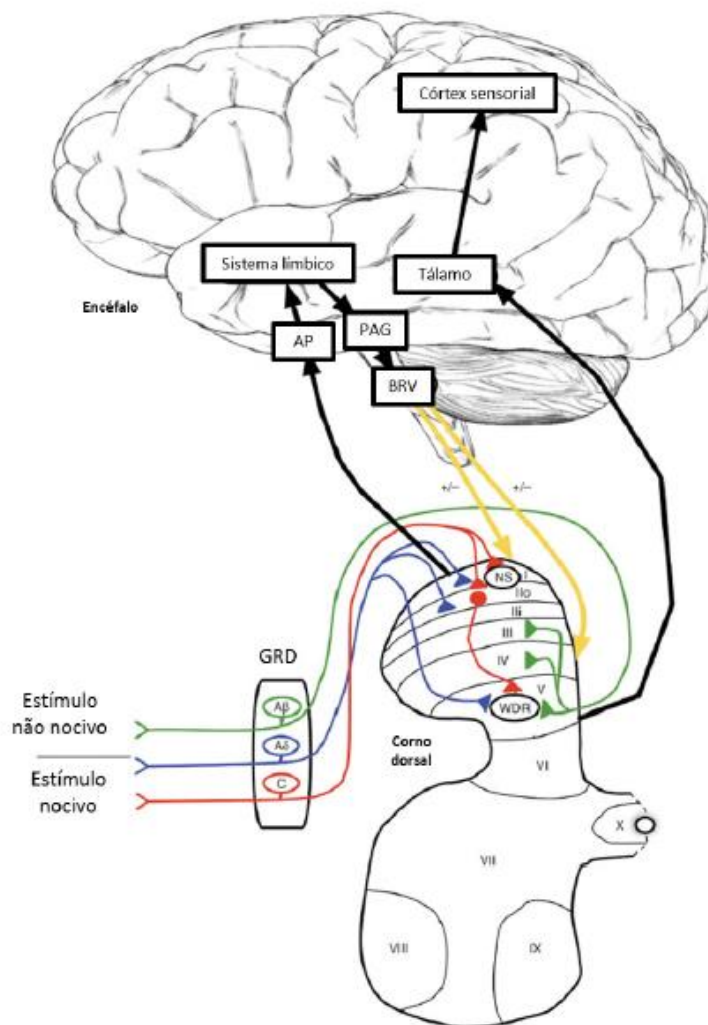
As fibras nociceptivas do tipo C podem ser classificadas em dois grandes grupos: (1) o primeiro é o grupo chamado de peptidérgica, que expressam os neurotransmissores peptídicos substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e também os receptores de tirosina quinase A (TrKA), que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF); (2) O segundo grupo é o de fibras C não-peptidérgicas, que expressam o receptor

P2X3, um subtipo de canal iônico sensível ao ATP (BESSON, 1999; HUNT; MANTYH, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009).

As fibras sensoriais podem responder a diferentes estímulos e estão presentes na cabeça e no corpo, tendo seus corpos celulares no gânglio trigeminal ou no gânglio da raiz dorsal (GRD), respectivamente. Os impulsos nervosos chegam através dos neurônios aferentes primários à substância cinzenta da medula espinal, especificamente no corno dorsal. As fibras nociceptivas penetram perpendicularmente em camadas mais superficiais do corno dorsal (lâmina I e II) ou se estendem até camadas mais profundas (lâmina V, VI, VII e X) (CALVINO; GRILO, 2006).

A informação nociceptiva é transmitida do corno dorsal para estruturas supraespinhais através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes e fazem sinapse com os neurônios aferentes primários. Os neurônios de segunda ordem e também interneurônios localizados no corno dorsal da medula espinal são ativados pela liberação de neurotransmissores (como glutamato e SP) dos aferentes primários, e este processo também é mediado por canais de cálcio e sódio (BESSON, 1999, JULIUS; BASBAUM, 2001, MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Dentre as vias ascendentes (espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotálamica e espinohipotálamica), a via espinotalâmica é a mais proeminente na propagação do estímulo nociceptivo. Os neurônios de segunda ordem desta via emitem suas projeções diretamente ao tálamo ventroposterolateral. As áreas do tálamo são responsáveis pela sensação de toque e nocicepção, onde a informação é inicialmente processada (JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVINO; GRILO, 2006; D'MELLO; DICKENSON, 2008). Além disso, estruturas do sistema límbico estão envolvidas na resposta emocional e afetiva à dor, como diferentes áreas da amígdala e do hipocampo (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVINO; GRILO, 2006; PERL, 2011). Posteriormente, o estímulo é transmitido do tálamo até o córtex sensorial primário por neurônios de terceira ordem (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009) (Figura 4).

**Figura 4 – Via nociceptiva ascendente**

Fonte: Adaptado de D'Mello e Dickenson, 2008.

(3) Modulação: nesta etapa ocorrem modificações da propagação do estímulo nociceptivo através de mecanismos endógenos, em especial pela liberação de neurotransmissores. É mediada por interação entre neurônios medulares e impulsos das vias descendentes originadas no tronco encefálico e encéfalo. Esta interação ocorre através da participação de vários sistemas de neurotransmissores endógenos, como opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, colinérgico, adrenérgico, adenosinérgico, gabaérgico e glutamatérgico (MILLAN, 2002).

O organismo possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, pois após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais podem ser

transmitidos para vários locais do córtex sensorial somático, substância periaquedutal cinzenta (PAG), hipotálamo, amígdala e cerebelo. Um circuito modulador endógeno descendente (via de controle descendente inibitório da dor) envolvendo a PAG, o locus coeruleus e o bulbo rostroventral, é responsável pela liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinal (com a participação principalmente de serotonina e noradrenalina) que conseguem promover inibição da informação nociceptiva. Assim, cada lesão induz um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema nervoso (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; JONES; DUNLOP, 2007).

(4) Percepção: é a etapa final do processo de sinalização nociceptiva realizada no encéfalo, e se refere à experiência física e emocional provocada pelo estímulo nociceptivo. As áreas do córtex somatosensorial primário e secundário e córtex associativo, como o córtex parietal, estão envolvidos na gênese da percepção da dor como qualidade, localização, intensidade e duração. Os neurônios do tálamo projetam axônios para outras áreas do córtex envolvidas na resposta emocional à dor como o córtex frontal, insular, e cíngulo anterior, além de projeções para áreas motoras. Eles definem a percepção das características somáticas do estímulo e são responsáveis pelos aspectos cognitivos e afetivos da sensação de dor (CALVINO; GRILO, 2006; TRACEY; MANTYH, 2007).

### **2.3. Sistema opióide e antinocicepção**

O sistema opióide representa um importante alvo para avaliação de mecanismo de ação de novas drogas com propriedades antinociceptivas pelo fato de estar intimamente relacionado ao controle da dor tanto a nível periférico como a nível central. Uma elevada concentração de receptores opióides está localizada no corno dorsal da medula espinal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, PAG, núcleos da rafe, na região ventral superior do bulbo e da ponte e *locus coeruleus*. Observa-se, também, a presença de receptores nas amígdalas e córtex cerebrais, no hipocampo, no núcleo caudado e globo pálido, nos plexos nervosos e glândulas exócrinas do estômago e intestino, sugerindo a participação dos opióides na regulação do comportamento

motor, afetivo, neurovegetativo e neuroendócrino (MERRER et al, 2009; KRAYCHETE, 2010; BENEDITO, 2013).

Os principais receptores do sistema opióide são  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ . Foi sugerida a existência de diversos subtipos destes receptores, entre eles,  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  e  $\kappa_3$ . Em nível molecular, todos são membros da família de receptores acoplados à proteína G, e, portanto, a ativação dos receptores opióides leva ao fechamento de canais para cálcio voltagem-dependentes nas terminações nervosas pré-sinápticas e a abertura de canais de potássio ( $K^+$ ), produzindo hiperpolarização da membrana celular de neurônios pós-sinápticos, reduzindo a liberação de neurotransmissores, a exemplo da substância P, pelos terminais centrais do neurônio aferente primário. Estes agonistas atuam ainda ativando as vias inibitórias descendentes (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000).

#### **2.4. Sistema adenosinérgico e antinocicepção**

Existem vários estudos pré-clínicos e clínicos que demonstram o importante papel exercido pelas purinas (adenosina e adenosina trifosfato) na transmissão dolorosa tanto periférica como central (SEGERDHAL; SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1999). Esse interesse deve-se ao fato de que: a) análogos da adenosina produzem efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção, principalmente em dores neuropáticas, onde sua gênese ainda não é bem compreendida; b) a liberação de adenosina em nível espinhal contribui para a eficácia das drogas opióides; c) a cafeína, um antagonista dos receptores de adenosina A1, A2A e A2B, foi utilizada como ferramenta farmacológica para verificar o possível envolvimento dos receptores de adenosina. (SAWYNOK, 1998; FREDHOLM, 1999; BENEDITO, 2013).

Nesse sentido, compostos que afetam o sistema adenosinérgico podem representar uma nova e importante ferramenta farmacológica para o controle da dor, principalmente das dores neuropáticas, onde o arsenal terapêutico disponível na clínica é amplo, porém com baixa efetividade.

## 2.5. Canais para K<sup>+</sup> e antinocicepção

A literatura demonstra o envolvimento de drogas que agem em determinados canais de K<sup>+</sup> induzindo antinocicepção pela abertura destes canais e o conseqüente aumento da condutância do K<sup>+</sup> para o exterior da célula levando à hiperpolarização celular, assim não ocorrendo a propagação do estímulo nociceptivo (RANG et al., 2007), dessa forma, esses canais representam importantes alvos para o desenvolvimento de novos agentes no tratamento da dor.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que agonistas de receptores  $\mu$  e  $\delta$  opióides abrem canais de K<sup>+</sup> retificadores de entrada em neurônios pela ativação de proteínas Gi/o. O primeiro estudo que sugeriu o envolvimento da abertura de canais de K<sup>+</sup> na antinocicepção induzida por agonistas  $\mu$ -opióide mostrou que a glibenclamida, um bloqueador de canais para K<sup>+</sup>, inibiu o efeito da morfina no teste da placa quente e retirada da cauda em roedores (OCANA; DEL POZO; BAEYENS, 1990; OCANA et al., 2004; BENEDITO, 2013).

## 2.6. *Ginkgo biloba*

O extrato de *Ginkgo biloba* é um dos produtos naturais mais comercializados pelo mundo (SINGH et al., 2008). As folhas de *Ginkgo biloba* são usadas na medicina chinesa para tratamento da asma (MAHMOUD et al., 2000), antimicrobiano (YANG et al., 2002) e antioxidante (DIAMOND et al., 2013). O uso diário do extrato pode ser uma alternativa para o tratamento da osteoporose, principalmente naquelas induzidas por uso prolongado de corticóides (LUCINDA et al., 2010). Além disso, o extrato melhorou a capacidade mental de pacientes com Alzheimer devido às suas propriedades neuroprotetoras (BASTIANETTO et al., 2000; ZIMMERMANN et al., 2002; DIAMOND et al., 2013). Estudo com ratas idosas mostrou que a suplementação com o extrato de *Ginkgo biloba* melhorou a função cognitiva devido a diminuição do estresse oxidativo e aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BELVIRANLI & OKUDAN, 2015).

Da *Ginkgo biloba* foi isolado inúmeros metabólitos secundários como lipídios, alilfenóis, flavonóides e carboidratos, no entanto as atividades farmacológicas são atribuídas aos terpenos trilactonas e flavonoides glicosídeos (PETER et al., 1966; GELLERMAN et al., 1968; MORIMOTO et al., 1968). Os ácidos ginkgolicos são alquilfenóis pertencentes ao grupo dos ácidos anacardicos. Os ginkgols possuem efeito antiproliferativo em vários tipos de células cancerígenas, especialmente em células de carcinoma hepatocelular (YANG et al., 2014).

## 2.7. Fenilpropanóides

Os constituintes dos óleos essenciais são substâncias voláteis de baixo peso molecular que possuem grande aplicabilidade na indústria de perfumaria, em cosméticos, e em produtos alimentícios. Quimicamente os óleos essenciais são compostos principalmente de terpenóides e fenilpropanóides, além de policetídeos e poucos alcalóides (DE SOUSA, 2011).

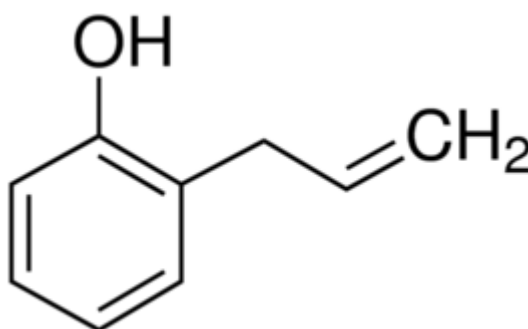
Os fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico (CRAVEIRO et al., 1981; DEWICK, 2001) e frequentemente estão presentes nos óleos essenciais em pequenas quantidades (DE SOUSA, 2011). Esses compostos são indicadores das respostas ao estresse da planta sobre a variação da luz ou tratamento mineral, além de importantes mediadores na resistência das plantas contra pragas (LA CAMERA et al., 2004). Eles ainda promovem recursos para uma reprodução satisfatória (DUDAREVA et al., 2004; VOGT, 2010).

### 2.7.1. 2-Alilfenol

O 2-alilfenol é um fenilpropanóide amplamente comercializado na China sob o nome de Yinguo. Quimicamente este composto apresenta estrutura (Figura 5) similar ao ginkgol isolado do fruto ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) (ZHAOLI et al., 1995; MENG et al., 2007). Apresenta atividade fungicida já relatada na literatura contra as espécies *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fulvia fulva*, *Sporisorium reilianum*, *Physalospora piricola*, *Valsa mali*, *Magnaporthe oryzae*,

*Pythium aphanidermatum*, uma vez que afeta a respiração e diminui os níveis de ATP por um mecanismo ainda não descoberto (MENG et al., 2007; QU et al., 2008; XIA et al., 2010).

Em *B. cinérea*, 2-alilfenol inibe o patógeno fúngico pela indução de respiração cianeto resistente, causando diminuição de ATP, e inibindo a respiração (GONG et al., 2009).



**Figura 5** – Estrutura química do 2-alilfenol

O interesse pelo estudo do potencial antinociceptivo do 2-alilfenol surgiu pela observação da semelhança estrutural desse fenilpropanóide com outras moléculas da mesma classe e que apresentam efeito antinociceptivo já relatado na literatura, como é o caso do eugenol (KURIAN et al., 2006) e do anetol (RITTER et al., 2013).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a atividade antinociceptiva do fenilpropanóide 2-alilfenol em modelos experimentais murinos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Estimar a DL50 do 2-alilfenol pela via intraperitoneal (i.p.);
- Investigar a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol a partir de modelos de nocicepção química e térmica;
- Avaliar o envolvimento dos sistemas opióide, adenosinérgico e dos canais de potássio sensíveis a ATP no mecanismo de ação do 2-alilfenol, caso o mesmo apresente efeito antinociceptivo.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss (Figura 6), machos, com três meses de vida, pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério - Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Os animais eram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com livre acesso a ração do tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno, passando por ciclo claro/escuro de 12 horas.

**Figura 6** – Camundongo (*Mus musculus*) Swiss macho



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

### 4.2. Condições Experimentais

Os testes foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia do IPeFarM/UFPB, no período compreendido entre as 13:00 e as 17:00 h. No dia anterior ao experimento, os animais foram separados em grupos de no máximo 4 animais por gaiola. Além disso, os animais foram pesados e transferidos para o local de realização dos testes, a fim de permitir sua ambientalização e minimizar o estresse provocado pela exposição a um novo ambiente. 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 foram previamente aprovados pelo CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB -, sob a certidão de nº 161/2015.

### 4.3. Substâncias Utilizadas

- 2-alilfenol (SIGMA - EUA);
- Ácido acético glacial (Synth - EUA);
- Água destilada (IPeFarM/UFPB – Brasil);
- Cafeína (Merck – EUA);
- Cloridrato de morfina (Merck – EUA.);
- Cloridrato de naloxona (Cristália – Brasil)
- Etanol (IPeFarM/UFPB – Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- Glibenclamida (Sigma – EUA.);
- Glutamato (Sigma – EUA);
- MK-801 (Sigma – EUA);
- Tween 80 (Vetec – Brasil);

Minutos antes do início dos experimentos, as substâncias utilizadas foram dissolvidas em salina e quando necessário, era adicionado Tween 80, para facilitar a solubilização. As doses foram calculadas de forma a possibilitar a administração intraperitoneal de 0,1 mL/10 g de peso do camundongo, com exceção da formalina e glutamato que foram injetados por via intraplantar na quantidade de 20 $\mu$ L.

#### 4.4. Aparelhagem

- Aparelho de observação para o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, formalina, glutamato e mecanismos de ação (Figura 7);
- Aparelho de placa quente (Insight – Brasil) (Figura 8);



**Figura 7** – Aparelho de observação

Fonte: BENEDITO, 2013

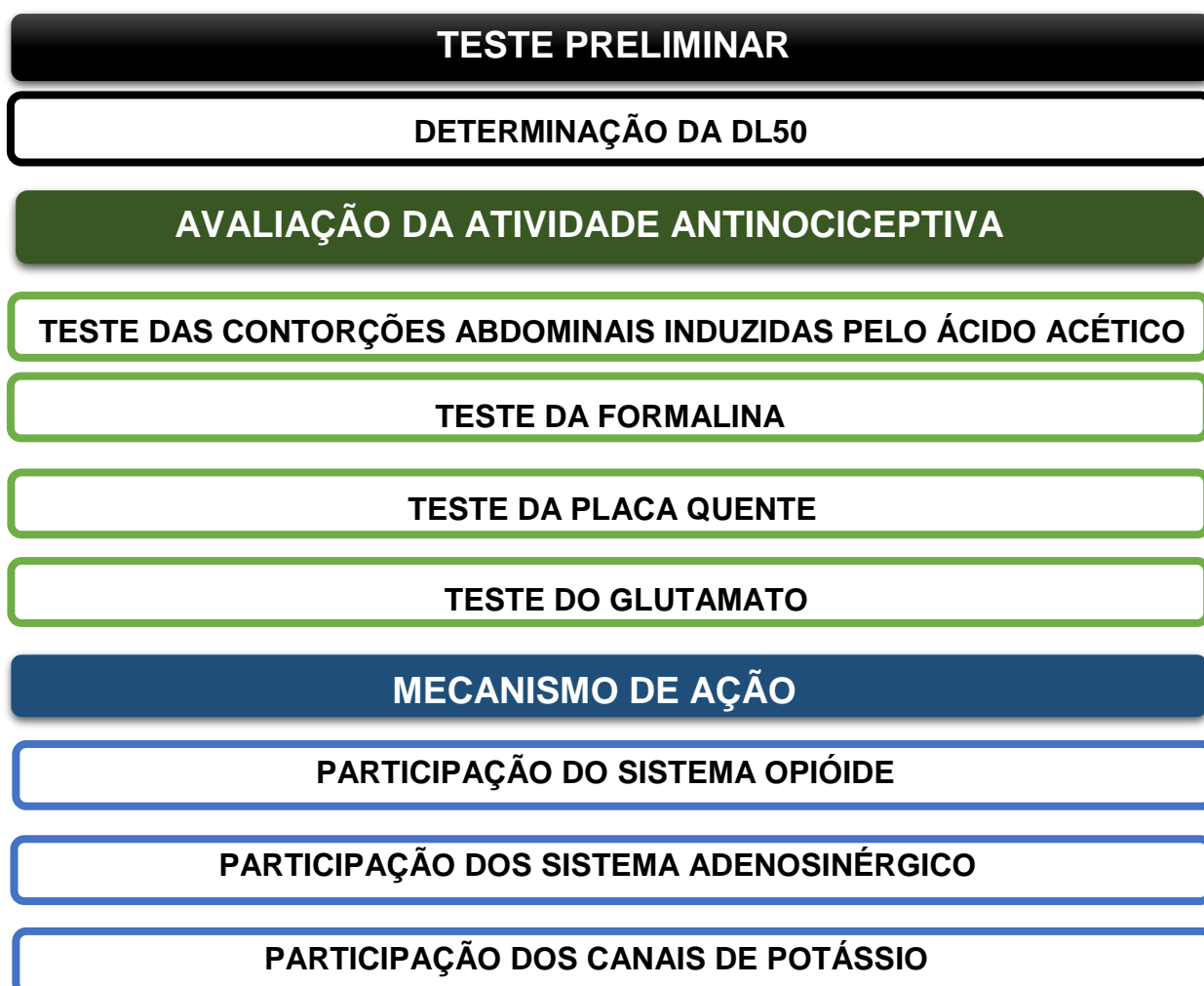


**Figura 8** – Aparelho da placa quente

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

## 5. MÉTODOS

As metodologias executadas no estudo da atividade antinociceptiva do 2-alilfenol em camundongos estão representadas na figura 9.



**Figura 9** – Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do fenilpropanóide 2-alilfenol.

### 5.1. Teste Preliminar

#### 5.1.1. Determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>)

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%) será realizada em camundongos machos (n=6) e fêmeas (n=6), utilizando grupos de doze animais, tratados com 2-alilfenol em diferentes doses, e o grupo controle receberá o veículo utilizado nas preparações (água e Tween 80), por via intraperitoneal. As possíveis mortes ocorridas em consequência dos tratamentos iniciais serão registradas por 14 dias.

## **5.2. Avaliação da atividade antinociceptiva**

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

A administração intraperitoneal de ácido acético 1% provoca uma irritação no peritônio, desencadeando em um efeito nociceptivo representado por uma contração na musculatura abdominal seguida de uma extensão dos membros posteriores (GARCIA, et al., 2011). Essa contorção acontece em virtude da ativação de canais de cátions não-seletivos em neurônios nociceptivos periféricos, como também, na liberação de vários mediadores inflamatórios (MING-TATT, et al., 2012).

O procedimento será realizado de acordo com o método descrito por Koster et al. (1959). Os animais são separados em 6 grupos contendo oito camundongos machos, os quais receberão os seguintes tratamentos: veículo, 2-alilfenol (25, 50, 75 e 100 mg/Kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.). Transcorridos 30 minutos, haverá a administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 1%, em seguida, os camundongos serão colocados, individualmente, em caixas de polietileno, para que seja registrado o número de contorções abdominais em 10 minutos de observação. A atividade antinociceptiva será determinada pela inibição significativa do número de contorções abdominais dos animais tratados com as drogas-testes, quando comparado ao grupo controle.

Este método é bastante comum na triagem de substâncias com potencial efeito antinociceptivo, no entanto não apresenta especificidade, pois diversos tipos de drogas são efetivos nesse modelo, tais como anticonvulsivantes, anticolinérgicas e anti-histamínicas (HUANG, et al., 2010). Nesse contexto, mais

testes antinociceptivos serão necessários para melhor caracterização da atividade.

### **5.2.2. Teste da formalina**

Como forma de discriminar se a possível ação do 2-alilfenol decorre de um efeito antinociceptivo central ou periférico, foi utilizado o teste da formalina.

Inicialmente descrito por Hunskaar, Fasmar e Hole (1985), essa metodologia consiste na administração subcutânea de 20 $\mu$ L de uma solução de formalina na pata direita do animal. Após a injeção do estímulo doloroso, os camundongos serão colocados em um aparato triangular composto por duas paredes espelhadas e uma de vidro transparente, permitindo a visualização do animal, para que seja cronometrado o tempo de lambida da pata em duas fases (SHIBATA, et al., 1989). A primeira fase (0-5 min) ocorre, imediatamente, após a administração da formalina, provocando uma resposta nociceptiva decorrente da estimulação química direta dos nociceptores e liberação de aminoácidos excitatórios (TJOLSEN, et al., 1992). Em seguida, há um período chamado de interfase (5-15 min) que é caracterizado pelos mecanismos de supressão endógenos da dor (HENRY, et al., 1999). A segunda fase (15-30 min) é conhecida por um processo inflamatório, levando a liberação de mediadores como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandina (PARADA, et al., 2001).

Para a realização do experimento, os camundongos foram divididos em grupos (n=8) que foram tratados com veículo, 2-alilfenol (50, 75 e 100 mg/Kg) e morfina (10 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos dos tratamentos, foi injetada a solução de formalina 2,5% na região subplantar da pata direita do animal, provocando um comportamento nociceptivo que foi registrado nas duas fases citadas acima. Uma redução dessa resposta dolorosa nos animais tratado com a substância teste, quando comparado ao grupo controle negativo, indica atividade antinociceptiva.

### 5.2.3. Teste da placa quente

Este teste, descrito por Eddy e Leimback (1953), representa uma modificação do modelo original de Woolfe e MacDonald (1944). Consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, do momento em que o animal é colocado em uma placa quente a  $55 \pm 1,0$  °C até apresentar o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas. Este tempo, foi cronometrado e considerado como um indicativo de nocicepção, já que são respostas integradas supraespinhalmente (YAMAMOTO; NOZAKI TAGUCHI; CHIBA, 2002). Inicialmente, os animais foram submetidos a uma pré-seleção, sem administração de qualquer substância, sendo considerado apto aquele que obtivesse um tempo de resposta à nocicepção inferior a dez segundos, quando colocado sobre a placa quente.

Os camundongos selecionados foram separados em cinco grupos de 8 animais que receberam os tratamentos: veículo, 2-alilfenol (50, 75 e 100 mg/kg i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). Antes das administrações, realizou-se uma leitura basal (0 minuto) e posteriormente, os animais foram avaliados decorridos 30 e 60 minutos das administrações iniciais. O tempo máximo de permanência na placa foi de 30s, para evitar danos teciduais (PARK; CHA; JEON, 2011).

### 5.2.4. Teste da nocicepção induzida pelo glutamato

O glutamato é o principal aminoácido excitatório liberado pelo sistema nervoso central e periférico em respostas nociceptivas (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) serão pré-tratados por via i.p. com veículo, três doses do 2-alilfenol e com o MK-801 (0,15 mg/kg) um antagonista não competitivo de receptor NMDA (MAREK et al., 1991). Após uma hora das

administrações, os animais receberão uma injeção intraplantar de 20 µL de uma solução de glutamato (30 µmol/pata) na pata posterior direita e serão colocados em caixas de observação. O parâmetro observado será o tempo de lambida da pata por um período de 15 minutos.

### **5.3. Investigação do mecanismo de ação antinociceptivo do 2-alilfenol**

#### **5.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide**

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do 2-alilfenol, grupos distintos de animais foram tratados com veículo, 2-alilfenol (100 mg/kg i.p.), morfina (6 mg/kg i.p.) ou naloxona (5 mg/kg, s.c.), um antagonista opióide não seletivo (JIN et al., 2010). Dois grupos receberam pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) 15 min antes da administração do 2-alilfenol (100 mg/kg i.p.) ou de morfina (6 mg/kg i.p.). A morfina foi usada como controle positivo. Após um período de 30 min foi avaliado o efeito deste tratamento no teste da formalina.

#### **5.3.2. Estudo do envolvimento dos sistemas adenosinérgico**

A possível participação do sistema adenosinérgico no mecanismo de ação do 2-alilfenol foi estudada utilizando a cafeína um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina (SAWYNOK, J., 2015). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=8) onde um recebeu cafeína (10 mg/kg, s.c.) 15 minutos antes da administração do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.). Os outros grupos receberam apenas veículo, cafeína ou 2-alilfenol. Após 30 minutos os camundongos foram submetidos ao teste da formalina.

#### **5.3.3. Participação dos canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>**

Para investigar se o 2-alilfenol exerce seu efeito antinociceptivo ativando canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia que bloqueia especificamente estes canais (OCANA, et al., 2004; LOPES et al., 2012). Grupos de 8 camundongos foram tratados com: veículo, 2-alilfenol (100 mg/kg i.p.) ou glibenclamida (5 mg/kg, i.p.). Em outro grupo foi injetado, inicialmente, glibenclamida e, após 15 minutos, 2-alilfenol (100 mg/kg). E após 30 minutos, foi

administrada formalina na pata posterior direita e contabilizado o tempo de lambida desta pata, como descrito anteriormente.

#### 5.4. Análise estatística

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

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

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).

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



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Teste Preliminar

#### 6.1.1. Determinação da dose letal 50% (DL50)

Para determinar a toxicidade aguda do 2-alilfenol, os animais receberam a substância em estudo e foram observados por um período de 14 dias após o tratamento, contabilizando o número de mortes em cada dose, conforme apresentados na tabela 1. Durante os 14 dias de observação, não houve mortalidade nos animais tratados com 2-alilfenol nas doses de 25, 50, 75, 100 e 500 mg/kg, no entanto as doses de 600, 675, 750 mg/kg apresentaram mortalidade, respectivamente, de: 50%, 83,3% e 100%. A partir dos resultados, calculou-se a DL50 e o valor obtido foi de 603 mg/kg, com um intervalo de confiança entre 587,1 e 619,8 mg/kg de peso corporal para camundongos machos e fêmeas com coeficiente de determinação  $R^2 = 0.9970$ .

**Tabela 1** – Percentual de mortes em camundongos tratados com diferentes doses do 2-alilfenol.

Doses do 2-alilfenol (mg/Kg)	% de mortes em 14 dias
25	0
50	0
75	0
100	0
500	0
600	50
675	83,3
750	100

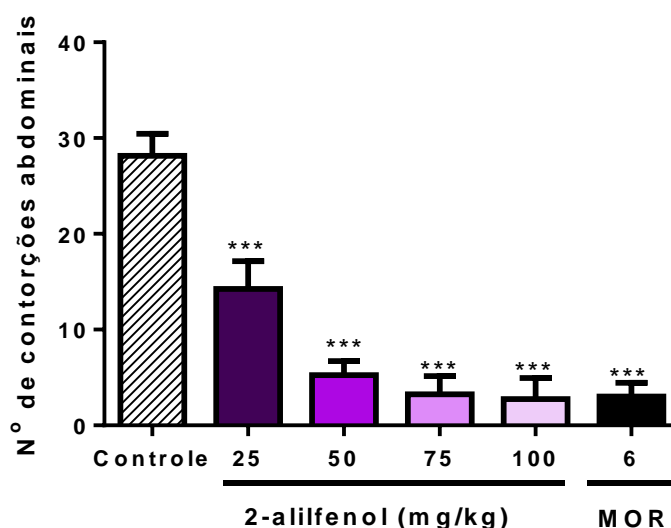
(n = 12 animais por grupo, sendo 6 machos e 6 fêmeas)

### 6.2. Avaliação do Efeito Antinociceptivo

#### 6.2.1. Efeito do 2-alilfenol no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O resultado da figura 10 mostra que a administração do 2-alilfenol (25 50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) reduziu de maneira dose dependente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético com as porcentagens de inibição de 49.4% ( $14.6 \pm 2.9$ ), 80.1% ( $5.2 \pm 1.5$ ), 88.3% ( $3.3 \pm 1.9$ ) e 90.0% ( $2.8 \pm 2.2$ ) quando comparado ao grupo controle ( $28.1 \pm 2.3$ ). A morfina inibiu a resposta de contorção em 89.3% ( $3.0 \pm 1.4$ ).

**Figura 10** – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (25, 50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

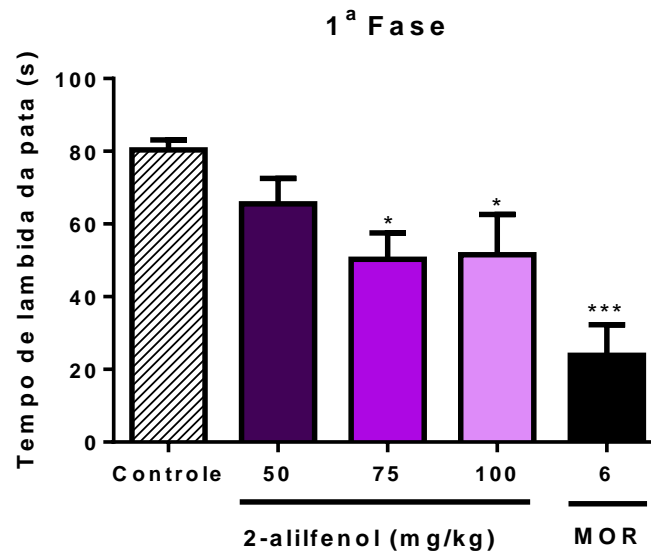


Cada coluna representa média  $\pm$  E.P.M. (n=8) (ANOVA “one way” – seguido pelo Teste de Tukey) \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 6.2.2. Efeito do 2-alilfenol no teste da formalina

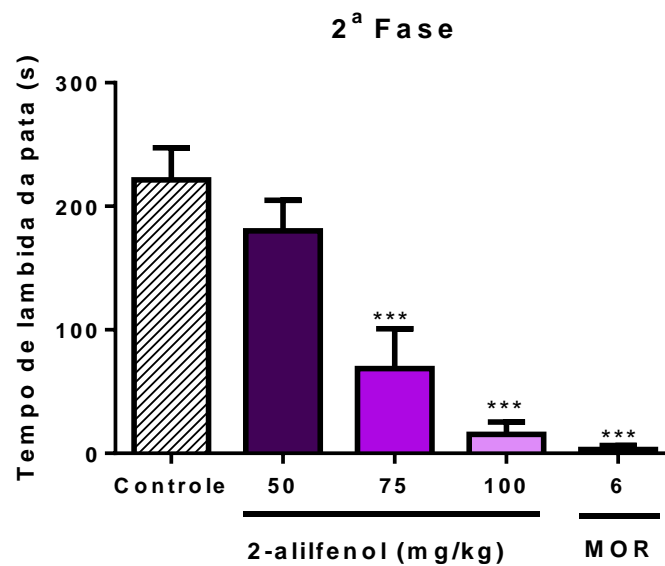
O 2-alilfenol reduziu o tempo de lambida no teste da formalina em ambas as fases. Na primeira fase, a dose de 75 (37.4%,  $50.3 \pm 7.3$ ) e 100 (35.8%,  $51.6 \pm 11.0$ ) mg/kg foi efetivo em comparação ao grupo controle ( $80.4 \pm 2.7$ ) (Figura 11). O efeito antinociceptivo do 2-alilfenol foi mais marcante na segunda fase nas mesmas doses: 75 (69.0%,  $68.7 \pm 32.2$ ) e 100 (93.0%,  $15.4 \pm 10.0$ ). Como esperado, a morfina, droga padrão, foi efetivo nas duas fases com 70.2% ( $23.9 \pm 8.4$ ) e 98.6% ( $3.1 \pm 3.1$ ) respectivamente (Figura 12).

**Figura 11** – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste da formalina.



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

**Figura 12** – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e morfina (6mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina.

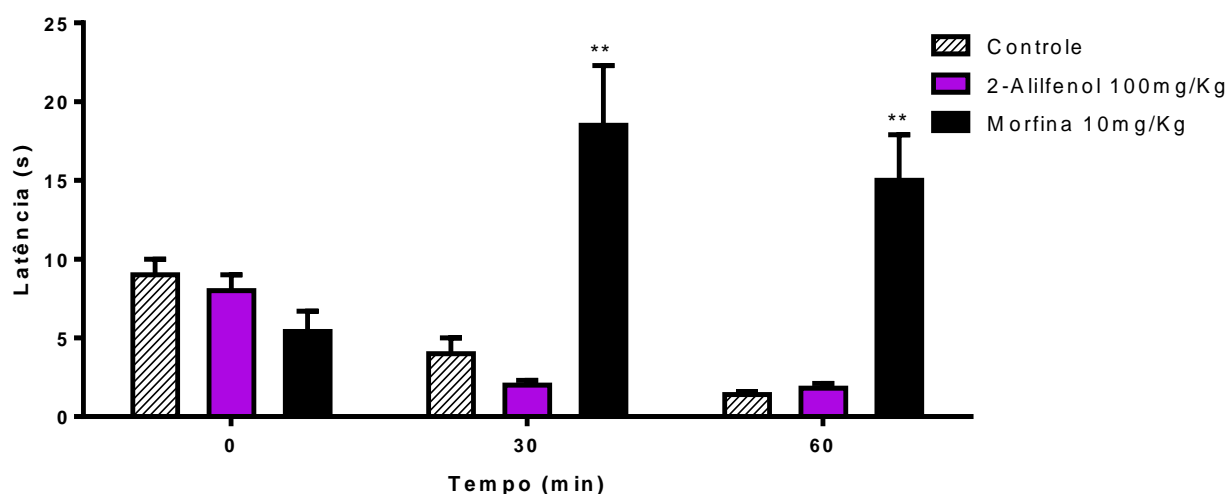


Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Tukey) \*\*\*p<0,001 vs controle.

### 6.2.3. Efeito do 2-alilfenol no teste da placa quente

Segundo a figura 13, o 2-alilfenol não foi capaz de aumentar o tempo de latência para a reação ao estímulo doloroso provocado pela placa quente em nenhum dos tempos testados. O pré-tratamento com morfina (10 mg/kg, i.p.) aumentou o tempo de permanência do animal no aparelho aos 30 ( $18,5 \pm 3,8$ ) e 60 ( $15,0 \pm 2,9$ ) minutos dos tratamentos, quando comparado ao grupo controle ( $4,0 \pm 1,0$ ,  $1,4 \pm 0,2$ ).

**Figura 13** – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (100mg/kg, i.p.) e morfina (10mg/kg, i.p.) sob a latência para salto no teste da placa quente.

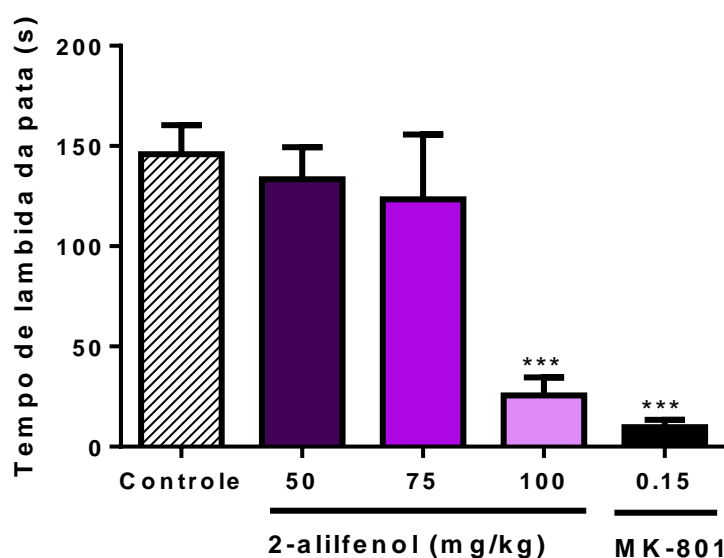


Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m (n=8) (Teste de Mann-Whitney) \*\* $p < 0,01$  vs grupo controle.

### 6.2.4. Efeito do 2-alilfenol no teste do glutamato

A figura 14 mostra que o 2-alilfenol na dose de 100 (82.5%,  $25.5 \pm 9.1$ ) mg/kg reduziu o tempo de lambida induzida pela administração do glutamato quando comparado ao controle ( $145.9 \pm 14.5$ ). MK-801 foi usado como controle positivo e causou inibição da resposta nociceptiva (93.3%,  $9.8 \pm 3.6$ ).

**Figura 14** – Efeito do tratamento com 2-alilfenol (50, 75 e 100mg/kg, i.p.) e MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.) sob o tempo de lambida da pata no teste do glutamato.



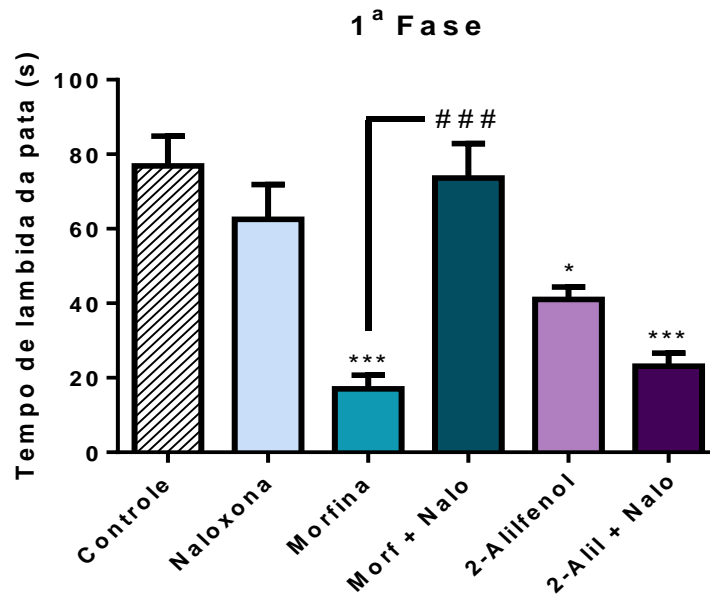
Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Tukey) \*\*\*p<0,001 vs controle.

### 6.3. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação na atividade antinociceptiva do 2-alilfenol

#### 6.3.1. Participação do sistema opióide

Como se pode observar na figura 15, tanto o 2-alilfenol na dose de 100 mg/kg ( $41,0 \pm 3,3$ ) quanto a morfina ( $17,0 \pm 3,6$ ) reduziram significativamente o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste da formalina, quando comparados ao grupo controle ( $76,8 \pm 7,9$ ), em 46,6% e 77,8%, respectivamente. O grupo tratado apenas com naloxona ( $62,5 \pm 9,3$ ) não alterou o tempo de reação provocado pelo estímulo doloroso. O tratamento prévio da naloxona, administrado quinze minutos antes do 2-alilfenol ou morfina, não modificou a antinocicepção provocada pelo 2-alilfenol ( $23,1 \pm 3,4$ ), contudo o efeito produzido pela morfina ( $73,6 \pm 9,1$ ) foi significativamente revertido.

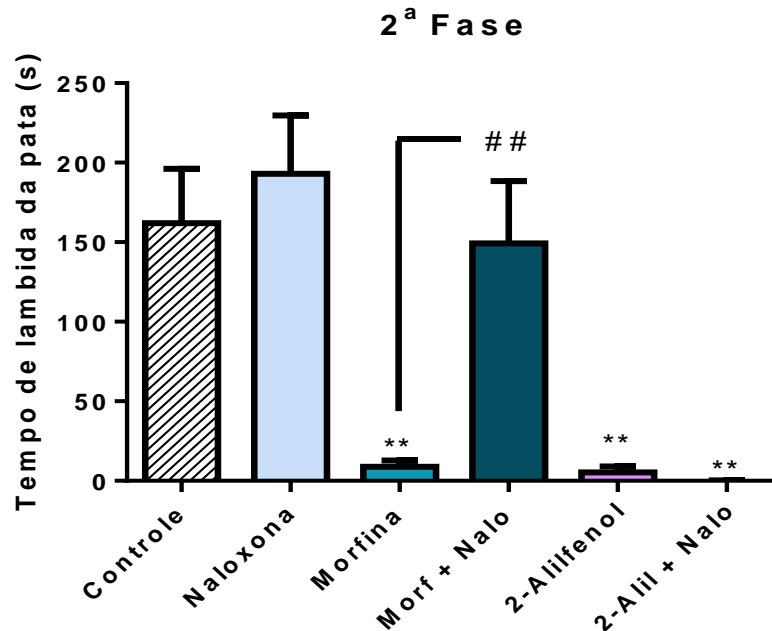
**Figura 15** – Efeito da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.



Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Tukey) \*\*\*p<0,001 vs controle, ### p<0,001 vs morfina.

Na segunda fase do teste da formalina representada pela figura 16, nos camundongos tratados com 2-alilfenol ( $5,3 \pm 3,7$ ) e morfina ( $8,8 \pm 4,0$ ) ocorreu inibição do comportamento nociceptivo em 96,7% e 94,5%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ( $162,0 \pm 34,2$ ). A administração prévia de naloxona não reverteu o efeito antinociceptivo do 2-alilfenol ( $0,1 \pm 0,1$ ), porém bloqueou a ação da morfina ( $149,2 \pm 39,7$ ).

**Figura 16** – Efeito da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.

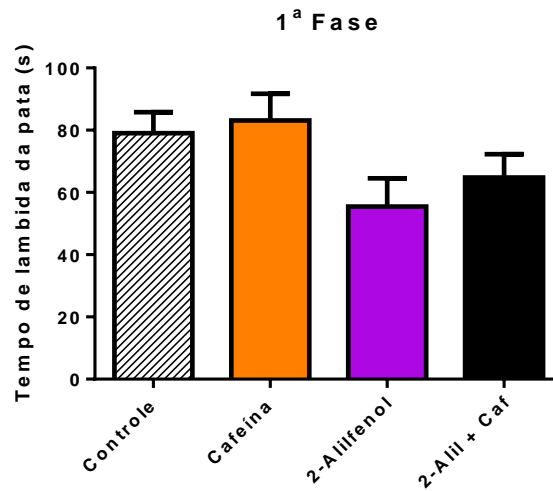


Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Tukey) \*\* $p < 0,01$  vs controle, ## $p < 0,01$  vs morfina.

### 6.3.2. Participação do sistema adenosinérgico

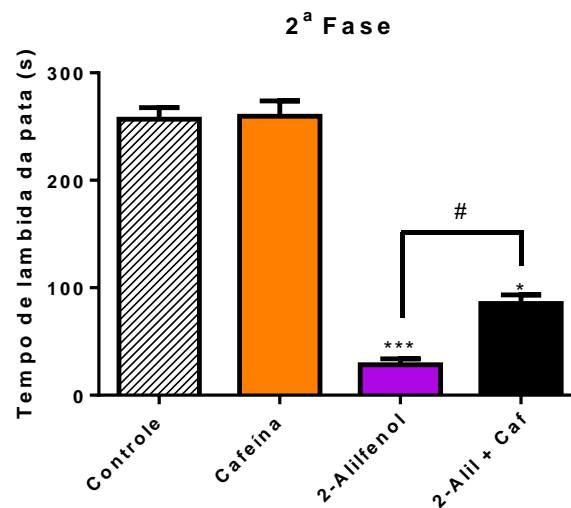
De acordo com as figuras 17 e 18, os camundongos tratados com 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) apresentaram uma diminuição na resposta à dor de 89% ( $28,2 \pm 5,7$ ) na segunda fase, quando comparados ao grupo controle ( $256,9 \pm 10,8$ ). No grupo de animais que recebeu apenas a cafeína (10 mg/kg, s.c.), não foi observada qualquer alteração no tempo de lambida da pata em nenhuma das fases ( $83,1 \pm 8,5$  e  $259,6 \pm 14,3$ ), em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com cafeína nos animais que, posteriormente, receberam o 2-alilfenol levou à uma inibição de 66,7% ( $85,3 \pm 7,9$ ) quando comparado ao grupo controle na segunda fase, indicando uma possível reversão do efeito, uma vez que esta inibição foi menor do que o grupo tratado apenas com o 2-alilfenol.

**Figura 17** - Efeito da cafeína (10 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.



Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Tukey).

**Figura 18** - Efeito da cafeína (10 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.

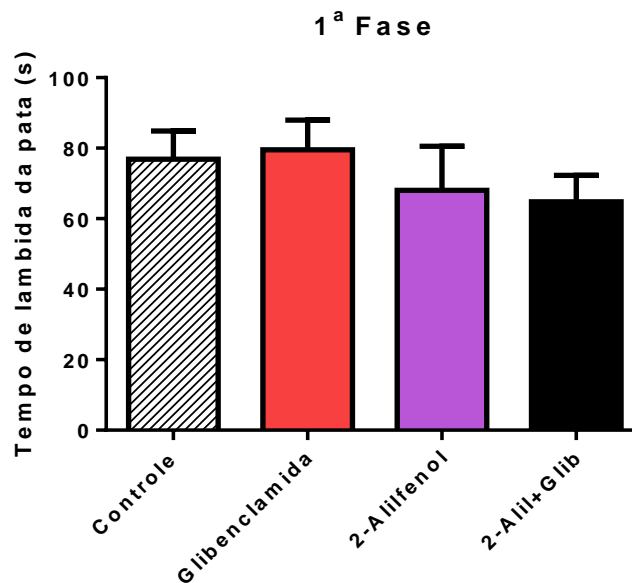


Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Tukey) \*\*\*p<0,001 vs controle, #p<0,05 vs 2-alilfenol.

### 6.3.3. Participação dos canais de K<sup>+</sup> ATP

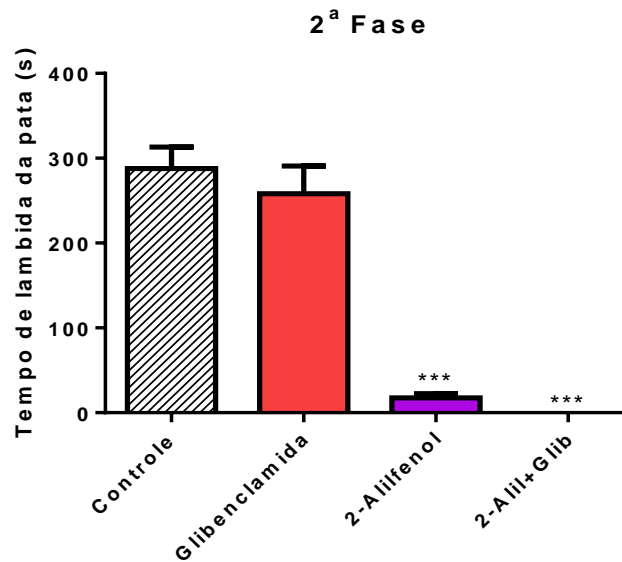
Como apresentado nas figuras 19 e 20, os camundongos tratados com 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) apresentaram uma diminuição na resposta à dor de 93,8% ( $17,6 \pm 5,0$ ) na segunda fase, quando comparados ao grupo controle ( $287,8 \pm 25,2$ ). No grupo de animais que recebeu apenas a glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), não foi observada qualquer alteração no tempo de lambida da pata em nenhuma das fases ( $79,5 \pm 8,4$  e  $258,0 \pm 32,9$ ), em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com glibenclamida nos animais que, posteriormente, receberam o 2-alilfenol apresentou uma inibição de 100% ( $0,0 \pm 0,0$ ) do tempo de lambida na segunda fase, indicando que não houve reversão do efeito.

**Figura 19** – Efeito da glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.



Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Tukey).

**Figura 20** – Efeito da glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do 2-alilfenol (100 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.



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



**DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

Estudos que utilizaram fenilpropanóides, tal como o 2-alilfenol, demonstraram atividade antinociceptiva quando submetidos a diferentes protocolos com roedores, como por exemplo o eugenol (KURIAN et al., 2006), metileugenol (YANO, et al., 2006), vanilina (PARK et al., 2009), anetol (RITTER et al., 2013), siringina (US et al., 2015), e orto-eugenol (FONSÊCA et al., 2016). Diante disto, foi despertado o interesse em traçar o perfil da toxicidade aguda e da atividade antinociceptiva do 2-alilfenol, investigando o possível mecanismo de ação pelo qual este fenilpropanóide estaria exercendo seu efeito.

É comum que a primeira etapa de uma pesquisa seja a determinação do grau de toxicidade de uma nova droga, justificando a escolha das doses utilizadas para os experimentos comportamentais subsequentes (GARRIDO *et al.*, 2011). Neste caso, foi realizado o ensaio de toxicidade aguda com o 2-alilfenol, no qual o objetivo foi caracterizar a relação dose/resposta que conduz o cálculo da DL50, ou seja, a dose que tem efeito letal em 50% dos animais de uma população (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949). A DL50 do 2-alilfenol por via i.p. foi de 603 mg/kg com limite de confiança de 587,1 – 619,8 mg/kg. Estudos sobre toxicidade aguda reforçam as diferenças existentes entre substâncias de uma mesma classe química, mas que por simples modificações estruturais, podem apresentar atividade ou toxicidade completamente distintas.

Afim de se investigar o efeito analgésico do 2-alilfenol, partiu-se para a realização de testes específicos na linha de antinocicepção. O primeiro deles foi o teste das contorções induzidas pelo ácido acético, esta metodologia que é uma importante ferramenta para triagem de substâncias analgésicas (COLLIER et al., 1968). A administração do ácido acético na cavidade peritoneal causa nocicepção caracterizada pela extensão das patas acompanhada pela contorção do abdômen (KOSTER et al., 1959). Esse comportamento nociceptivo é resultado dos prótons oriundos da dissociação do ácido acético e podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias conhecidos como canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC) (JULIUS; BASBAUM, 2001), ou indiretamente, por promover a estimulação e liberação de

mediadores inflamatórios, tais como produtos da biossíntese da prostaglandina, aminas simpatomiméticas, bradicinina, substância P e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) (COLLIER et al., 1968; IKEDA *et al.*, 2001), estimulando neurônios aferentes primários a aumentar a liberação de glutamato no fluido cerebrospinal (FENG; CUI; WILLIS, 2003).

O tratamento com o 2-alilfenol reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sugerindo que a substância teste pode estar reduzindo a produção de mediadores inflamatórios por meio da inibição da síntese de prostaglandinas ou liberação do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013).

O 2-alilfenol apresentou uma inibição de 90.0% na dose de 100mg/Kg enquanto que outros fenilpropanóides como anetol na dose de 250mg/Kg (RITTER, et al., 2014), evodione e leptanol na dose de 100mg/Kg (JOHNSON, et al., 2010) apresentaram inibição das contorções de 55.0, 56.7 e 53.6% respectivamente. Resultado similar ao do 2-alilfenol foi obtido com o eugenol (DANIEL et al., 2009) na dose 100mg/Kg que apresentou um potencial de inibição das contorções de 88.3%.

Apesar de apresentar boa sensibilidade, este teste possui baixa especificidade, pois, em alguns casos, a resposta de contorção abdominal pode ser suprimida por agentes anti-inflamatórios, narcóticos, relaxantes musculares, antidepressivos tricíclicos e outros tipos de drogas que se mostraram eficazes em inibir as contorções abdominais, o que poderia levar a erros na interpretação dos resultados (LE BARS et al., 2001). Procedeu-se então com métodos mais específicos para melhor caracterização deste efeito. Por isso, foram realizados testes mais específicos como o teste da formalina, da placa quente e da nocicepção induzida por glutamato, com o objetivo de caracterizar de forma mais precisa se a atividade antinociceptiva exibida por este fenilpropanóide foi central e/ou periférica.

Como modelo de dor neurogênica e inflamatória foi realizado o teste da formalina para avaliar com mais precisão as propriedades antinociceptivas do 2-alilfenol. No teste de formalina, a ativação química imediata de terminações nervosas, particularmente das fibras do tipo C, causa a liberação de substância

P, glutamato e bradicinina (Raboisson e Dallel, 2004). Esta primeira fase é denominada neurogênica, enquanto a segunda fase corresponde à dor inflamatória causada pela liberação de histamina, prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), taquiquininas, quininas e outros peptídeos (Capuano et al. 2009). As drogas analgésicas centrais inibem ambas as fases do teste da formalina, principalmente a segunda fase do teste (Karim et al., 1993). Já as drogas que agem periféricamente como os anti-inflamatórios não esteroidais inibem somente a fase tardia (Hunnskaar S, Hole, 1987; Guimarães et al., 2013). O tratamento agudo com o 2-alilfenol reduziu o comportamento nociceptivo nas duas fases do teste da formalina, contudo a 2ª fase foi mais efetiva, indicando um mecanismo anti-inflamatório mais potente.

Este resultado difere da maioria dos fenilpropanóides já estudados, como o eugenol (KURIAN et al., 2006), metileugenol (YANO, et al., 2006), 1-nitro-2-feniletano (DE LIMA et al., 2009) e o anetol (RITTER, et al., 2014); que foram capazes de inibir apenas a segunda fase do teste da formalina, demonstrando possuir atividade antinociceptiva apenas do tipo anti-inflamatória. O único fenilpropanóide que se comportou de forma semelhante ao 2-alilfenol, inibindo as duas fases do teste da formalina, foi a ligustilida na dose de 10mg/Kg, administrada pela via intragástrica (DU, Junrong et al., 2007).

Uma vez que a redução do tempo de lambida da pata do animal tanto na primeira quanto na segunda fase é característica de drogas de ação central, foi realizado o teste da placa quente a fim de esclarecer o envolvimento central na antinocicepção causada pelo 2-alilfenol. O teste da placa quente, é uma metodologia sensível e específica usada para mostrar o envolvimento de mecanismos antinociceptivos supra-espinais (SULAIMAN et al., 2009).

Neste teste, a temperatura é utilizada como estímulo nociceptivo, onde a placa é aquecida à temperatura constante ( $55 \pm 1$  °C) na qual é capaz de ativar os receptores vanilóides (VR-1 e VRL-1) presentes nos nociceptores, fazendo com que o estímulo seja conduzido à região medular, mais especificamente, corno dorsal, e posteriormente aos centros corticais por intermédio das fibras C e A $\delta$  (DICKENSON & BESSON, 1997). O parâmetro nociceptivo avaliado foi o tempo para o animal apresentar o movimento de pular sobre as duas patas

posteriores, este comportamento representa uma uma resposta nociceptora integrada supraespinhalmente (ARAÚJO et al., 2009).

Apesar do 2-alilfenol apresentar um potente efeito analgésico no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e na primeira e segunda fase do teste da formalina, ele não foi capaz de aumentar a latência para a percepção do estímulo térmico no teste da placa quente. Da mesma forma, o eugenol (50, 75 e 100mg/Kg, p.o.) (DANIEL et al., 2009) e anetol (RITTER et al., 2013) falharam em prolongar a latência para percepção do estímulo térmico no teste da placa quente, diferente do o-eugenol (75 e 100mg/Kg, i.p.) que conseguiu prolongar este parâmetro nos tempos de 60 e 120 minutos após o tratamento (FONSÊCA et al., 2016).

Este resultado sugere que se o 2-alilfenol apresenta um componente central envolvido no seu efeito analgésico, esse, porém, não é mediado em níveis supra-espinhais. Então com a finalidade de esclarecer esse possível efeito central do 2-alilfenol, foi realizado o teste do glutamato.

O principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central é o glutamato que está envolvido em vários processos fisiológicos como memória, aprendizado e excitotoxicidade (Wilhelm et al., 2009). A resposta nociceptiva mediado pelo glutamato envolve receptores (AMPA, kainato e NMDA) localizados em estruturas periféricas, espinhais e supra-espinhais (Beirith et al., 2002). Os resultados mostraram que o 2-alilfenol (100mg/Kg) foi efetivo no teste do glutamato, logo é possível sugerir que ele pode estar modulando a dor centralmente em níveis espinhais (DAL BÓ et al., 2013). Além disso sabe-se que quando há um dano tecidual ou inflamação, ocorre um aumento da liberação de glutamato pelas fibras aferentes primárias que ativam seus receptores no tecido periférico (MILLER et al., 2011). Logo pode-se sugerir que a interferência no sistema glutamatérgico também pode ser proveniente de um efeito anti-inflamatório do 2-alilfenol.

Fonsêca e colaboradores (2016), evidenciaram o envolvimento dos receptores glutamatérgicos na resposta antinociceptiva induzida pelo fenilpropanóide o-eugenol, que atuou de forma semelhante ao seu análogo estrutural metileugenol (YANO et al., 2006).

Diante destes resultados, é possível sugerir que o 2-alilfenol está desempenhando seu efeito antinociceptivo por mecanismos periféricos e centrais, portanto decidiu-se aprofundar o estudo com o 2-alilfenol e se passou a investigar seu possível mecanismo de ação utilizando o teste da formalina, como protocolo de escolha, e ferramentas farmacológicas. A investigação dos mecanismos de ação de psicofármacos, geralmente, é baseada na interação farmacológica que ocorre entre receptores e ligantes durante a transmissão neuronal. Este estudo baseia-se na utilização de antagonistas farmacológicos conhecidos, os quais, uma vez administrados previamente, bloqueiam os efeitos decorrentes da ativação do receptor específico, impedindo que a substância em estudo possa se ligar a este receptor e promover sua ação. Caso a via de sinalização bloqueada não seja um mecanismo usado pela substância-teste, o efeito não será alterado.

O primeiro sistema investigado foi o sistema opióide. Os receptores opióides estão expressos nos nervos envolvidos na transmissão da dor (trajetória ascendente sensorial) e modulação (trajetória inibitória descendente) em sítios localizados em nível espinhal e supraespinhal (BRUEHL et al., 2009).

Esses receptores são classificados como acoplados à proteína Gi/o e, quando ativados, inibem a adenilato ciclase. Além disso, promovem a abertura de canais para potássio e inibem a abertura dos canais para cálcio controlados por voltagem, levando à redução da excitabilidade neuronal e da liberação de neurotransmissores (BRUST, T.F., 2015). Eles podem, ainda, acoplar-se a vários outros sistemas de segundos mensageiros, envolvidos na via da fosfolipase C, sendo responsáveis pelos efeitos indesejados relacionados ao uso dos opióides (tolerância, sensibilização e abstinência) (SEHGAL; SMITH; MANCHIKANTI, 2011).

A naloxona é um antagonista opiáceo não seletivo utilizado clinicamente para reverter a depressão cardiorrespiratória associada à overdose de narcóticos. Devido à sua capacidade de antagonizar o efeito de drogas opióides, como a morfina, a naloxona é amplamente utilizada como ferramenta farmacológica na pesquisa de mecanismos envolvendo receptores opióides (JIN et al., 2010; PEREIRA, 2013).

Com o intuito verificar a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do 2-alilfenol, os animais foram previamente tratados com a naloxona. Os resultados evidenciaram que não houve qualquer reversão do efeito antinociceptivo do 2-alilfenol, indicando que este efeito não é proveniente da ativação dos receptores opióides.

O efeito antinociceptivo de fenilpropanóides envolvendo o sistema opióide já foi descrito na literatura. PARK et al. (2011) com o eugenol (10mg/kg, p.o.), DE LIMA et al. (2009) com o 1-nitro-2-feniletano (50mg/Kg, i.p.), ambos afirmaram que a via opióide estava envolvida no mecanismo antinociceptivo desses dois fenilpropanóides.

Em seguida, foi investigada a participação do sistema adenosinérgico no mecanismo de ação do 2-alilfenol. Estudos de dor demonstraram que algumas drogas com atividade analgésica tem sua ação relacionada à ativação de receptores de adenosina.

A adenosina é um neurotransmissor/modulador endógeno que atua sobre receptores A1, A2A, A2B e A3 que estão acoplados a proteína G (WU et al., 2005). Os receptores de adenosina do tipo A1( $G_{i/o}$ ) quando ativados promovem antinocicepção, por inibição da atividade neuronal na medula espinhal e do gânglio da raiz dorsal (WU et al., 2005). Em geral, os receptores do subtipo A2A estão envolvidos na facilitação do disparo neuronal, assim, pré sinapticamente os receptores A2A conseguem controlar a liberação de glutamato e a sua principal função é atenuar a profunda inibição da transmissão sináptica mediada pelos receptores A1 (Ciruela et al, 2006), o papel fisiológico dos receptores A2B e A3 ainda não foi bem esclarecido (MENDES, 2012). Por sua vez, a cafeína é um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, e atua bloqueando receptores do tipo A1 e A2 (SAWYNOK; REID; FREDHOLM, 2010).

A interação da cafeína com o 2-alilfenol mostrou uma reversão do efeito antinociceptivo, em ambas as fase do teste da formalina. A partir desses resultados, pode ser sugerido que os receptores A1 e/ou A2, podem estar envolvidos no mecanismo da ação antinociceptiva exercida pelo 2-alilfenol, confirmando o envolvimento central no efeito do 2-alilfenol, observado tanto na primeira fase do teste da formalina quanto no teste do glutamato.

Por fim, foi avaliado a participação dos canais K<sup>+</sup> ATP dependentes que também mostram ter um envolvimento nos processos de dor. A ativação desses canais leva a uma hiperpolarização celular, diminuindo os níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelulares e reduzindo a liberação de neurotransmissores, desse modo levando à antinocicepção (OCANA et al., 2004; LOPES et al., 2012). Dependendo da localização, esses canais podem agir direta ou indiretamente nos sinais de transmissão da dor.

Atualmente, vários anestésicos usados clinicamente agem por interagir também com canais de potássio. Alguns produtos naturais também possuem essa mesma ação (McCURDY; SCULLY, 2005; LOPES et al., 2012).

Para verificar a participação dos canais para K<sup>+</sup>ATP no mecanismo de ação do 2-alilfenol, a glibenclamida, um conhecido bloqueador desses canais, foi utilizada. Os resultados obtidos mostraram que a antinocicepção produzida pelo 2-alilfenol não foi revertida pela glibenclamida, sugerindo a não participação desses canais no mecanismo de ação.

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, são sugestivos de que o 2-alilfenol apresenta uma baixa toxicidade e um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema glutamatérgico e adenosinérgico, sem a participação direta do sistema opióide e dos canais para K<sup>+</sup> ATP.



## 8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com as metodologias utilizadas em camundongos, foi possível concluir que o 2-ailfenol:

- Apresentou uma DL50 de 603 mg/kg por via intraperitoneal, com indicativo de ter um bom limite de segurança para a sua utilização;
- Promove antinocicepção nos modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e no teste da formalina), mas não no modelo de nocicepção térmica (teste da placa quente);
- Exerce sua atividade antinociceptiva com a participação do sistema adenosinérgico e glutamatérgico, porém não envolve o sistema opióide nem os canais de K<sup>+</sup>ATP.



# REFERÊNCIAS

## 9. REFERÊNCIAS

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, p.2726-2742, 2011.

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

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

BARBOSA, Felipe Lukacievicz. Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, das frações e do comopostos 8-Metoxilapachenol isolado dos tubérculos obtidos de *Sinningia allagophylla*. 2013.

BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. **Science of pain**. Oxford, U.K: Elsevier, 2009.

BASTIANETTO, Stéphane et al. The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by  $\beta$ -amyloid. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 1882-1890, 2000.

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

BELVIRANLI, Muaz; OKUDAN, Nilsel. The effects of Ginkgo biloba extract on cognitive functions in aged female rats: The role of oxidative stress and brain-

---

derived neurotrophic factor. **Behavioural brain research**, v. 278, p. 453-461, 2015.

BENEDITO, R. B. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2013. 108f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia) – CCS/UFPB, João Pessoa, PB.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

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

BRUEHL, S.; BURNS, J.W.; CHUNG, O.Y.; CHONT, M. Pain-related effects of trait anger expression: neural substrates and the role of endogenous opioid mechanisms. **Neuroscience & Bioheavioral Reviews**, v.33, p.475-491, 2009.

BRUST, Tarsis F.; CONLEY, Jason M.; WATTS, Val J. Gα i/o-coupled receptor-mediated sensitization of adenylyl cyclase: 40 years later. **European journal of pharmacology**, v. 763, p. 223-232, 2015.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10-16, 2006.

CAPUANO, Alessandro et al. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. **European journal of pharmacology**, v. 605, n. 1, p. 57-62, 2009.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 23; p. 816-824, 1997.

---

CHAINY, Gagan BN et al. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 2943-2950, 2000.

CHOI, Jongwon et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin. **Planta medica**, v. 70, n. 11, p. 1027-1032, 2004.

CIRUELA, Francisco et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1–A2A receptor heteromers. **The Journal of neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2080-2087, 2006.

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.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, Epub 2008 Apr 15

DA SILVA, M. D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto “spleen” 6 (sp6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 2013. 214f. Tese (Doutorado em Neurociências) – UFSC, Florianópolis, SC.

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

---

DAL BÓ, Wladimir et al. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) pathways. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 517-525, 2013.

DANIEL, Aparecido N. et al. 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 LIMA, Anderson B. et al. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of Aniba canelilla essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6, p. 555-559, 2009.

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

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

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DIAMOND, Bruce J. et al. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 81, n. 5, p. 668-678, 2000.

DIAMOND, Bruce J.; BAILEY, Mary R. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 73-83, 2013.

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

---

DOS SANTOS, U.D. **Avaliação do potencial antinociceptivo e antiinflamatório do ácido rosmarínico**, 2013. 110f. Tese (Doutorado em Neurociências) – UFSC, Florianópolis, SC.

DU, Junrong et al. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 211-214, 2007.

DUDAREVA, Natalia; PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. Biochemistry of plant volatiles. **Plant physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.

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

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

FREDHOLM, B.B.; BATTIG, K, HOLMEN, J, NEHLIG, A, ZVARTAU, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, p. 83-133, 1999.

FONSÊCA, D.V. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do sesquiterpeno nerolidol em camundongos**. 2012. 101p. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) - UFPB/CCS/ João Pessoa – PB.

FONSÊCA, Diogo V. et al. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 402-408, 2016.

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

GELLERMAN, Joanne L.; SCHLENK, Hermann. Methods for isolation and determination of anacardic acids. **Analytical chemistry**, v. 40, n. 4, p. 739-743, 1968.

GONG, Shuangjun et al. Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) in vitro. **Pest management science**, v. 65, n. 12, p. 1337-1343, 2009.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 260p.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, M. G.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due active inhibition. **Pain**, v. 82, p. 57-63, 1999.

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 phytosquiterpene lactone, against fulminant hepatitis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2012. doi: ISSN 0955-2863, 10.1016/j.jnutbio.

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-3beta-ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.12, p.7445-7452, 2010.

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

HUNT, S. P; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosc**, v. 2, p. 83-91, 2001.

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

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

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

JOHNSON, Anil J. et al. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 267-271, 2010.

JONES, P. G; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197-206, 2007.

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

---

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

KELLY, D. J.; AHMAD, M.; BRULL, S. J. Preemptive analgesia: physiological and pharmacological modalities. **Can J. Anaesth**, v.48, p. 1000-1010, 2001.

KINGHORN, A.D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.135–148, 2001.

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

KRAYCHETE, D. Opioides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 46 p. 467-480.

KURIAN, R. et al. Effect of eugenol on animal models of nociception. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 341, 2006.

LA CAMERA, Sylvain et al. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 267-284, 2004.

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

LEE, M. H. et al. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. **Journal of dental research**, v. 84, n. 9, p. 848-851, 2005.

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

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

---

1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOPES, L. S.; MARQUES, R. B.; FERNANDES, H. B.; PEREIRA, S. S.; AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) Epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, p. 1-6, 2012.

LUCINDA, Leda MF et al. Efeito do extrato de Ginkgo biloba L., Ginkgoaceae, na osteoporose induzida em ratas Wistar. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 20, p. 429-434, 2010.

MAHMOUD, Fadia et al. In Vitro Effects of Ginkgolide B on Lymphocyte Activation in Atopic Asthma. Comparison With Cyclosporin A. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 241-245, 2000.

MANSOURI, Mohammad Taghi; NAGHIZADEH, Bahareh; GHORBANZADEH, Behnam. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 120, p. 43-49, 2014.

MAREK, Przemyslaw et al. Delayed application of MK-801 attenuates development of morphine tolerance in rats. **Brain research**, v. 558, n. 1, p. 163-165, 1991.

MARTA, Ilda Estefani Ribeiro et al. Efetividade do toque terapêutico sobre a dor, depressão e sono em pacientes com dor crônica: ensaio clínico. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 44, n. 4, p. 1100-1106, 2010.

---

McCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substance derived from natural products (natruceuticals). **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MENDES, Marina Raquel Henriques. Expressão diferencial dos recetores A1 e A2A da adenosina no hipocampo de doentes com epilepsia mesial temporal (MTLE). 2012.

MENG, Zhaoli et al. Effect of 2-allylphenol against *Botrytis cinerea* Pers., and its residue in tomato fruit. **Crop Protection**, v. 26, n. 11, p. 1711-1715, 2007.

MERRER, J.; BECKER, J. A. J.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1379-1412, 2009.

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

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

MILLER, Kenneth E. et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 283-309, 2011.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathologic and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, p. 23-26, 2009.

MING-TATT, et al. Antinociceptive Activity of a Synthetic Curcuminoid Analogue, 2, 6-bis-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) cyclohexanone, on Nociception-induced Models in Mice. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 3, p. 275-282, 2012.

---

MORIMOTO, H.; KAWAMATSU, Y.; SUGIHARA, H. [Stereo-structure of toxin from the fruit of *Ginkgo biloba* L.]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 16, n. 11, p. 2282-2286, 1968.

NETO, O. A.; COSTA, C. M. de C.; SIQUEIRA, J. T. T. de. *Dor princípios e prática*. Porto Alegre: ArtMed, 2009.

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

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

OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **Journal of Dental Research**, v. 76, n. 4, p. 848-851, 1997.

OROFINO KREUGER, M.R.; GROOTJANS, S.; BIAVATTI, M.W.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. **Anticancer Drugs**, 2012. doi: 10.1097/CAD.0b013e328356cad9.

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

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, p.937-944, 2001.

PARK, H.J.; CHA, D.S.; JEON, H. Antinociceptive and hypnotic properties of *Celastrus orbiculatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1240-1244, 2011.

PARK, Soo-Hyun et al. Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered vanillin in the mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 11, p. 1643-1649, 2009.

PARK, Soo-Hyun et al. The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 3, p. 501-507, 2011.

PEANAL, Alesandra T. et al. Eugenol, bis-eugenol and synthesized related-dimer compounds produce antinociception in the acetic acid-induced-writhing responses. **Phytochemistry**, v. 6, 2004.

PEREIRA, Charlane Kelly Souto. **Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky in mice**. 2013. 122 p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) UFPB/CCS, João Pessoa – PB. Orientadores: Reinaldo Nóbrega de Almeida e Temilce Simões de Assis.

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

PETER, H.; FISEL, J.; WEISSER, W. [On the pharmacology of the active ingredients of *Ginkgo biloba*]. **Arzneimittel-Forschung**, v. 16, n. 6, p. 719-725, 1966.7

QU, Tian-Li; MENG, Zhao-Li; LI, Jian-Qiang<sup>11</sup>. Determination of degradation dynamics of fungicide o-allylphenol in *Rhizoctonia cerealis* by high performance liquid chromatography. **Chinese Journal Analytical Chemistry**, v. 36, p. 637-641, 2008.

---

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo et al. Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes. **ISRN toxicology**, v. 2013, 2013.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, p.219-226, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia** 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 605-848 p.

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

RITTER, Alessandra MV et al. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 187-197, 2013.

RITTER, Alessandra Mileni Versuti et al. Effects of anethole in nociception experimental models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

RUSSO, C. M.; BROSE, W.G. Chronic pain. *Annu Rev Med*, v.49, p. 123-133, 1998.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy**, 5a Ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 347, p. 1-11, 1998.

SAWYNOK, J. Purines and pain management. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 1, p. 27-38, 1999.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor targets for pain. **Neuroscience**, 2015.

SAWYNOK, Jana; REID, Allison R.; FREDHOLM, Bertil B. Caffeine reverses antinociception by oxcarbazepine by inhibition of adenosine A 1 receptors: insights using knockout mice. **Neuroscience letters**, v. 473, n. 3, p. 178-181, 2010.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v.5, p.1062-1066, 2002.

SEGERDHAL, M.; SOLLEVI, A. Adenosine and pain relief: A clinical overview. **Drug Development Research**, v. 45, p. 151-158, 1998.

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

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

SINGH, Bikram et al. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, v. 79, n. 6, p. 401-418, 2008.

STEINEGGER, E.; HÄNSEL, R. **Pharmakognosie**, 5a Ed. Berlin: Springer Verlag, 1992.

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

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

TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, W.G.J.; SANTOS, F.P.S.; ANDRADE, D.C.A.; BEZERRA, S.L.; FIGUEIRO, J.B. Clinical epidemiology of musculoskeletal pain. **Revista de Medicina Universidade de São Paulo**, v.80, p.1-21, 2001.

---

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). *The Pharmacology of pain*. Springer, v. 130/l, p. 1-20, 1997.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-859, 2002.

US, Mahadeva Rao et al. Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 20-25, 2015.

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

VOGT, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010.

XIA, Yuanyuan et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the new fungicide 2-allylphenol in strawberry fruits. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1178-1184, 2010.

WILHELM, E.A.;JESSE, C.R.;BORTOLATTO, C.F.;NOGUEIRA, C.W.;SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, p. 419-425, 2009.

WOOLF, C. J; MA, O. Nociceptors – noscious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-364, 2007.

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

---

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

WU, W. P.; HAO, J. X.; HALLDNER, L.; LÖVDAHL, C.; DELANDER, G. E.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; FREDHOLM, B. B.; XU, X. J. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**, v. 113, p. 395-404, 2005.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administered Teredorexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal Pharmacology**, v.137, p.170-176, 2002.

YANG, Chun; XU, Yan-Rong; YAO, Wei-Xi. Extraction of pharmaceutical components from Ginkgo biloba leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 846-849, 2002.

YANG, Jyh-Ferng et al. Chemical composition and antibacterial activities of Illicium verum against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1254-1262, 2010.

YANG, Mengmeng et al. A systematic review on natural medicines for the prevention and treatment of Alzheimer's disease with meta-analyses of intervention effect of ginkgo. **The American journal of Chinese medicine**, v. 42, n. 03, p. 505-521, 2014.

YANO, Shingo et al. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European journal of pharmacology**, v. 553, n. 1, p. 99-103, 2006.

YASHPAL, Kiran et al. 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.

ZHAOLI, Meng; XIANZHONG, Wu; QINGXIAO, Gao. The inhibitory effect of extract from Ginkgo on four kinds of plant pathogens. **Acta Phytopathologica Sinica (China)**, 1995.

ZIMMERMANN, Martina et al. Ginkgo biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 48, n. 6, p. 613-623, 2002.



## 10. ANEXO

### 10.1. Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO PSICOFARMACOLÓGICA DO 2-ALILFENOL EM ROEDORES", protocolo nº 161/2015 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2014 a 2016
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus / Swiss</i>
Número de animais	280 animais
Idade/peso	3 meses/ 25-35g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Professor Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Coordenador CEUA-UFPB