



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

RUBENS BATISTA BENEDITO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO E
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA CEREBRAL DO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**

**JOÃO PESSOA
2013**

RUBENS BATISTA BENEDITO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO E
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA CEREBRAL DO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**

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

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA

2013

B463e Benedito, Rubens Batista.

Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (S)-(-)-álcool perílico em camundongos / Rubens Batista Benedito.-- João Pessoa, 2013. 108f. : il.

Orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Farmacologia. 2. Álcool perílico. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Opióide. 5. Antioxidante. 6. Avaliação histopatológica.

UFPB/BC

CDU: 615(043)

RUBENS BATISTA BENEDITO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO E
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA CEREBRAL DO (S)-(-)-ÁLCOOL
PERÍLICO EM CAMUNDONGOS**


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

APROVADO em 27/09/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fulvio Rieli Mendes
Examinador externo - UFABC



Prof.ª. Dr.ª. Margareth de Fátima F. M. Diniz
Examinadora interna – UFPB




Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador externo – UFPB



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

Prof.ª. Dr.ª. Rita de Cássia S. e Sá
Co-orientadora – UFPB



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador – UFPB

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao prof. Dr. **Rivelilson Mendes de Freitas**, pela prestatividade e colaboração técnica.

A Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Profa. Dr^a. **Maria de Fátima Agra**, pela competência na condução deste programa.

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

A todos os amigos da minha turma do mestrado e doutorado, pelo companheirismo e incentivo.

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

Ao meu amigo **Eduardo César Leopoldino de Oliveira** companheiro de luta na busca por dias melhores.

A todos os meus **familiares e amigos** de São José de Piranhas, minha terra natal, que sempre me incentivaram e proporcionaram muitas alegrias.

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

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Psicofarmacologia, **Wendel, Paula, Renan, Luciano, Raquel, Vanessa, Aline e Sara** pela colaboração na parte experimental e pela amizade construída.

Aos demais colegas do Laboratório de Psicofarmacologia, **Ana Karina, Camila Carolina, Flávia Negromonte, Franklin Ferreira, Leandra Eugênia, Marilene Lopes, Rita de Cássia**, pela constante ajuda.

A todos os **funcionários** da pós-graduação, pelos serviços prestados.

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

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

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

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.

RESUMO

O álcool perílico (*p*-mentha-1,8-diene-7-ol) é um membro da família dos monoterpenos encontrado em plantas dos gêneros *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, entre outros. É sabido que o álcool perílico (AP) possui atividade antinociceptiva, porém seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido. No presente trabalho foi investigado o possível mecanismo de ação do AP utilizando antagonistas farmacológicos e testes *in vitro*, e avaliada a neurotoxicidade histológica à nível do hipocampo e corpo estriado. O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi o protocolo de escolha para testar o monoterpeno na dose de 100 mg/kg frente aos antagonistas. Os resultados mostram uma reversão do efeito antinociceptivo do AP (AP 3,4 ± 1,7 contorções) após o pré-tratamento com a naloxona (NLX+AP 10,4 ± 2,3 contorções) indicando a participação do sistema opioide no seu mecanismo de ação. Diferentemente da naloxona, os antagonistas, muscarínico (atropina), adenosinérgico (cafeína), dopaminérgico (sulpirida), a L-arginina - L-NNA e a Glibenclamida, não foram capazes de reduzir o efeito do AP frente às contorções abdominais. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do AP, foram empregadas três metodologias, uma para avaliar o efeito do AP sobre a peroxidação lipídica, no teste de TBARS, e as outras duas para investigar sua ação como substância sequestradora de radicais livres OH e NO. Em todos os testes, o AP demonstrou atividade antioxidante, reduzindo em até 70% a produção de radicais livres. Quanto à avaliação histopatológica, o AP não provocou alterações teciduais significativas nas duas áreas cerebrais estudadas. Portanto, os resultados demonstram que o álcool perílico apresenta um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opioide e por mecanismos antioxidantes, sem a participação direta dos sistemas muscarínico, adenosinérgico, dopaminérgico, dos canais para K⁺_{ATP} e da via L-arginina óxido nítrico. O monoterpeno também não apresentou neurotoxicidade significativa.

Palavras-chave: Álcool perílico, atividade antinociceptiva, opioide, antioxidante, avaliação histopatológica.

BENEDITO, R. B. **Study of the mechanism of action antinociceptive and histopathological evaluation of the brain (s)-(-)-perillyl alcohol in mice.** 2013. 108f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia) – CCS/UFPB, João Pessoa, PB.

ABSTRACT

The perillyl alcohol (p-mentha-1,8-diene-7-ol) is a member of the family of monoterpenes found in plants of the genus *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, among others. It is known that perillyl alcohol (AP) has antinociceptive activity, but its mechanism of action remains unknown. In the present study was investigated the possible mechanism of action of PA using pharmacological antagonists and *in vitro*, and evaluated the histological level neurotoxicity in the hippocampus and striatum. The test of writhing induced by acetic acid was the protocol of choice for testing the monoterpene at a dose of 100 mg/kg against antagonists. The results show a reversal of the antinociceptive effect of PA (PA $3,4 \pm 1,7$ writhing) after pretreatment with naloxone (NLX+PA $10,4 \pm 2,3$ writhing) indicating the participation of the opioid system in its mechanism of action. Unlike naloxone, antagonists, muscarinic (atropine), adenosinergic (caffeine), dopamine (sulpiride), L-arginine - L-NNA and glibenclamide, were not able to reduce the effect of the PA front abdominal writhing. In the evaluation of *in vitro* antioxidant activity of the PA, three methodologies were employed, one to evaluate the effect of PA on lipid peroxidation in TBARS test and the other two to investigate its action as substance radical scavenging OH and NO. In all tests, the PA showed antioxidant activity, reducing by 70% the production of free radicals. As for histopathological evaluation, the PA did not cause significant tissue changes in both brain areas studied. Therefore, the results obtained in this study demonstrate that perillyl alcohol has an antinociceptive effect mediated by the opioid system and antioxidant mechanisms, without the direct participation of muscarinic systems, adenosinergic, dopaminergic, K^+_{ATP} channels and via L-arginine nitric oxide. The monoterpene also did not show significant neurotoxicity.

Keywords: Perillyl alcohol, antinociceptive activity, opioid, antioxidant, histopathological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas do álcool perílico, mentol e (-)-carvona.....	19
Figura 2 - Nociceptor e sua conexão com a medula e encéfalo.....	24
Figura 3 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	25
Figura 4 - Diagrama esquemático do sistema de controle da comporta.....	28
Figura 5 - Mecanismo da peroxidação lipídica.....	38
Figura 6 - Camundongos machos albinos da linhagem suíça.....	47
Figura 7 - Fluxograma do protocolo utilizado no estudo para determinação do mecanismo de ação do AP.....	50
Figura 8 - Alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos pré-tratados com AP.....	67
Figura 9 - Alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos pré-tratados com AP.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva do AP.....58
- Gráfico 2** - Efeito da glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva do AP.....59
- Gráfico 3** - Efeito da atropina sobre a atividade antinociceptiva do AP.....60
- Gráfico 4** - Efeito da cafeína e sulpirida sobre a atividade antinociceptiva do AP.....61
- Gráfico 5** - Efeito do L-NNA e L-arginina sobre a atividade antinociceptiva do AP.....62
- Gráfico 6** - Efeito do álcool perílico nos níveis de TBARS.....63
- Gráfico 7** - Efeito do álcool perílico sobre o sequestro do radical hidroxila64
- Gráfico 8** - Efeito do álcool perílico sobre o sequestro do óxido nítrico.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações histopatológicas do hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados com AP.....	66
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
κ	Kappa
μ	mu
μL	Microlitro
AAPH	2,2'-azobis[2metilpropionamidina]diidrocloride
AAS	Acido Acetil Salicílico
Ach	Acetilcolina
AINES	Anti-inflamatórios não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AP	(S)-(-)-álcool perílico
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATR	Atropina
BTG	Biotério Prof. Dr. Thomas George
BRVMR	Bulbo Raquidiano Ventromedial Rostral
Ca^{2+}	Íon Cálcio
CAF	Cafeína
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEPA	Comitê de Ética para Uso de Animais
COX	Ciclooxygenase
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
NO	Óxido Nítrico
NO_2	Dióxido de Nitrogênio
Dr	Doutor
Dr ^a	Doutora
EUA	Estados Unidos da América
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
et al	E colaboradores
Fe^{2+}	Íon Ferro
H^+	Íon Hidrogênio
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
GLIB	Glibenclamida
GMP_c	Guanilato Ciclase
h	Horas
HClO	Ácido Hipocloroso
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HE	Hematoxilina - eosina
$\text{HO}_2\bullet$	Hidroperoxila
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio

IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
IL-1 β	Interleucina 1 β
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Íon Potássio
Kg	Quilogramas
L-ARG	L-Arginina
LC	Locus Coeruleus
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
L-NNA	N-Omega-Nitro-L-Arginina
LOOH	Peróxidos Lipídicos
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MDA	Malonaldeído
Mg	Miligramas
n	Número de animais
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaOH	Hidróxido de Sódio
NLX	Naloxona
Na _v	Canais para Sódio Regulados por Voltagem
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NRPG	Núcleo Reticular Paragigantocelular
O ₂	Molécula de Oxigênio
O ₂ [•]	Ânion Superóxido
O ₃	Ozônio
¹ O ₂	Oxigênio Singleto
•OH	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pH	Potencial Hidrogeniônico
Prof.	Professor
r.p.m.	Rotações por minuto
RO•/LO•	Alcoxila
ROO•/LOO•	Peroxila
s.c.	Subcutânea
SCPV	Substância Cinzenta Periaquedutal
SG	Substância Gelatinosa
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPo	Sistema Nervoso Periférico
SNP	Nitroprussiato de Sódio
SP	Substância P
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPI	Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 DOR: CONCEITO E TIPOS	22
2.2 DOR E NOCICEPÇÃO	23
2.3 TEORIA DA COMPORTA E CONTROLE CENTRAL DA DOR.....	27
2.4 SISTEMA OPIOIDE E ANTINOCICEPÇÃO	29
2.5 SISTEMA MUSCARÍNICO E ANTINOCICEPÇÃO.....	31
2.6 SISTEMA ADENOSINÉRGICO E ANTINOCICEPÇÃO	31
2.7 SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ANTINOCICEPÇÃO	32
2.8 VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO E ANTINOCICEPÇÃO	32
2.9 CANAIS PARA K ⁺ E ANTINOCICEPÇÃO	30
2.10 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR: FÁRMACOS ANALGÉSICOS	33
2.11 ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.11.1 ERO / ERN	35
2.11.2 Antioxidantes.....	38
2.11.3 Dor, Inflamação e Estresse Oxidativo.....	39
2.12 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS	41
2.12.1 Álcool perílico	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 GERAL	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAL	46
4.1 LOCAL DE PESQUISA	46

4.2 ANIMAIS.....	46
4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	47
4.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	48
4.5 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ÁLCOOL PERÍLICO	49
5. MÉTODOS	49
5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	49
5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	49
5.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO DO ÁLCOOL PERÍLICO.....	50
5.2.1 Estudo do envolvimento do sistema opioide.....	51
5.2.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}	51
5.2.3 Estudo do envolvimento do sistema muscarínico	51
5.2.4 Estudo do envolvimento dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico	52
5.2.5 Estudo do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	52
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁLCOOL PERÍLICO ...	53
5.3.1 Avaliação do álcool perílico na peroxidação lipídica – TBARS.....	53
5.3.2 Avaliação do álcool perílico quanto ao sequestro de radicais livres	53
5.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	55
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6. RESULTADOS	58
6.1 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁLCOOL PERÍLICO	58
6.1.1 Estudo do envolvimento do sistema opioide.....	58
6.1.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}	59
6.1.3 Estudo do envolvimento do sistema muscarínico	60

6.1.4 Estudo do envolvimento do sistema adenosinérgico e dopaminérgico	60
6.1.5 Estudo do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	61
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁLCOOL PERÍLICO ...	62
6.2.1 Avaliação do álcool perílico sobre a peroxidação lipídica – TBARS.....	62
6.2.2 Avaliação do álcool perílico quanto ao sequestro de radicais livres	63
6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	65
7. DISCUSSÃO	70
8. CONCLUSÕES	80
9. PERSPECTIVAS.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A exposição da pele ou outro órgão aos danos ou estímulos nocivos induz uma sensação desagradável chamada dor, que continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade. O homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência da dor e propor procedimentos destinados ao seu controle. A dor é componente fundamental da homeostase e seu propósito inicial é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos ou potencialmente nocivos), permitindo que mecanismos de defesa ou fuga sejam adotados (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

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

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

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) estão implicadas em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação e dor (SALVEMINI; DOYLE; CUZZOCREA, 2006). A produção de EROs/ERNs e a sua alta reatividade química com biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, pode causar algumas alterações danosas, como a destruição das membranas celulares por peroxidação lipídica, bem como a desnaturação do DNA (ácido

desoxirribonucleico), resultando em alterações da síntese de proteínas e duplicação celular (FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007). Dessa forma, substâncias capazes de retardar ou inibir o efeito danoso dessas espécies reativas podem ser promissoras para o tratamento e o alívio desses estados patológicos, de modo que, podem se tornar potentes drogas analgésicas e/ou anti-inflamatórias.

O uso de plantas e seus derivados com finalidades terapêuticas têm ocorrido de forma extensiva e crescente em todo o mundo, conforme dados obtidos junto ao mercado farmacêutico e às altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observados na última década. Nesse contexto, cabe ressaltar que o Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em biomas distintos (SOUZA et al., 2012).

Em 2001, um artigo de revisão já relatava 202 espécies de plantas com atividade analgésica envolvendo 79 famílias. A maioria dos estudos foi conduzida utilizando ratos e camundongos em modelos experimentais de antinocicepção empregando extratos obtidos das plantas (ALMEIDA et al., 2001). Essas informações mostram o potencial das plantas e de seus constituintes como candidatos a medicamentos com efeito analgésico. Entre as espécies vegetais que apresentam perfil antinociceptivo, destacam-se a *Hyptis pectinata* (BISPO et al., 2001); *Erythrina velutina* (DANTAS et al., 2004); *Hyptis fruticosa* (MENEZES et al., 2007); *Acanthus hirsutus* Boiss (HARPUT et al., 2011).

Dentre os produtos de origem natural, destacam-se os óleos essenciais, que são compostos de origem vegetal com diferentes aplicações, especialmente na área terapêutica e cosmética. Sua diversidade de efeitos farmacológicos é provavelmente devido à diversidade químico-estrutural que os constituintes dos óleos essenciais apresentam. Esta informação é confirmada por estudos de terpenos presentes nestes óleos, os quais se mostraram bioativos em diferentes modelos animais (ELISABETSKY et al., 1995; PASSOS et al., 2009). Muitos são os monoterpenos comumente presentes em óleos essenciais, como o linalol, que tem ação anticonvulsivante e hipnótica (ELISABETSKY et al., 1995), (-)-carvona (GONÇALVES et al., 2008), o mirceno (RAO et al., 1990) e o 1,8-cineol que possuem efeito analgésico (SANTOS; RAO, 2000), carvacrol (GUIMARÃES et al.,

2010) e o citronelal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011) que apresentam atividade antinociceptiva e antioxidante.

Uma recente revisão da literatura descreve 43 compostos encontrados em óleos essenciais com atividade antinociceptiva, dos quais 62,8% são representados por monoterpenos (DE SOUSA, 2011).

O monoterpeno mentol (Figura 1) é uma substância amplamente empregada em diversos produtos farmacêuticos. O (-)-mentol é o isômero de maior ocorrência na natureza e possui um odor característico sendo amplamente usado como aromatizante em goma de mascar, pasta de dente e outros produtos de higiene. Também é empregado em formulações tópicas antissépticas, antipruríticas, de frescor e de anestésicos locais. Nas aplicações tópicas, a sensação de formigamento e frescor deve-se a sua atuação em receptores de frio, por meio da inibição de correntes de Ca^{2+} de membranas neuronais (ECCLES, 1994).

Apesar do mentol há muito tempo ser utilizado em formulações analgésicas tópicas, só em 2002 foi publicado um estudo sobre seu efeito analgésico em modelos de dor. Neste trabalho, Galeotti et al. (2002) estudaram sua eficácia como substância analgésica mostrando que seus efeitos são centrais e mediados através de uma ativação seletiva de κ - receptores opioides.

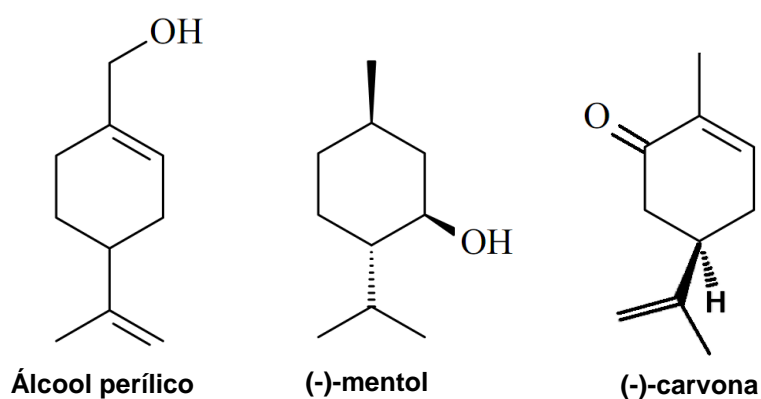


Figura 1 - Estruturas químicas do álcool perílico, mentol e (-)-carvona

Outro monoterpeno de interesse para o estudo da antinocicepção é o álcool perílico (*p*-mentha-1,8-diene-7-ol) que é um membro da família dos monoterpenos, com estrutura semelhante ao mentol (Figura 1), sendo encontrado em plantas dos gêneros *Lavandula*, *Mentha*, *Cymbopogon*, entre outros. Estudos

demonstraram que o álcool perílico (AP) é citotóxico para uma grande variedade de células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*. Essas evidências apontam para a sua utilização no tratamento de câncer em seres humanos, sendo considerado o agente anti-câncer mais potente entre os monoterpenos (MIRANDA; QUEIROZ, 2007; DE OLIVEIRA, 2010).

Em 2009, Benedito et al demonstraram que o AP possui comprovada atividade antinociceptiva em camundongos nos testes do ácido acético, formalina e placa quente (BENEDITO, 2009), porém seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido.

No presente trabalho foi investigado o possível mecanismo de ação do monoterpeno AP avaliando a participação de algumas das mais importantes vias envolvidas na nocicepção e também a atividade antioxidante. Também foram avaliadas possíveis alterações histológicas em nível do hipocampo e do corpo estriado após a administração aguda do álcool perílico.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOR: CONCEITO E TIPOS

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real, potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente”. É uma sensação descrita como sendo uma experiência multidimensional na qual estão envolvidos vários componentes: motivacionais, emocionais, sensório-discriminativo, afetivos e cognitivos (MERSKY, 1986; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; WHO, 2012).

A dor caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, pois alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo ao surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível (WOOLF et al., 1999). Essa dor quando pontual é classificada como aguda (TEIXEIRA et al., 2001). No entanto, quando a dor passa a se repetir ou sustentar-se por período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar sofrimento, sendo classificada como dor crônica a qual é gerada por impulsos de pequena magnitude produzidos por atividade neural anormal (MELZACK et al., 1999; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; WHO, 2012).

A dor crônica pode estar associada com a continuação da doença ou persistir após sua recuperação da lesão. Se a dor crônica for devido à doença orgânica, ela é efetivamente curada ao se tratar a desordem de base. Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, contínua ou recorrente e é dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica (MERSKEY et al., 1994; SMITH et al., 1986; FURST, 1999; WHO, 2012).

A dor nociceptiva consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja térmico, químico ou mecânico. Nesta dor, ocorre ativação contínua das vias centrais da dor e pode ser identificada, por exemplo, em pessoas com câncer (MILLAN, 1999; WHO, 2012).

Já a dor neuropática, segundo a IASP, é definida como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou Periférico

(SNPo). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores (GALLUZZI, 2007). Dor do membro fantasma e doenças como diabetes mellitus e Parkinson são as principais causas da dor neuropática (BOWSER, 1999, WHO, 2012).

A dor psicogênica, por sua vez, está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (FURST, 1999; MERSKEY, 1986; WHO, 2012).

2.2 DOR E NOCICEPÇÃO

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

Vários mecanismos podem ser identificados no processamento neural dos sinais nocivos que levam à experiência de dor. O primeiro, na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso, é a transdução, ou seja, a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transmitidos para o SNC como mostra a Figura 2 (BESSON; PERL, 1969). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso

periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam às percepções centrais (SCHMELZ; PETERSEN, 2001; BASBAUM et al., 2009).

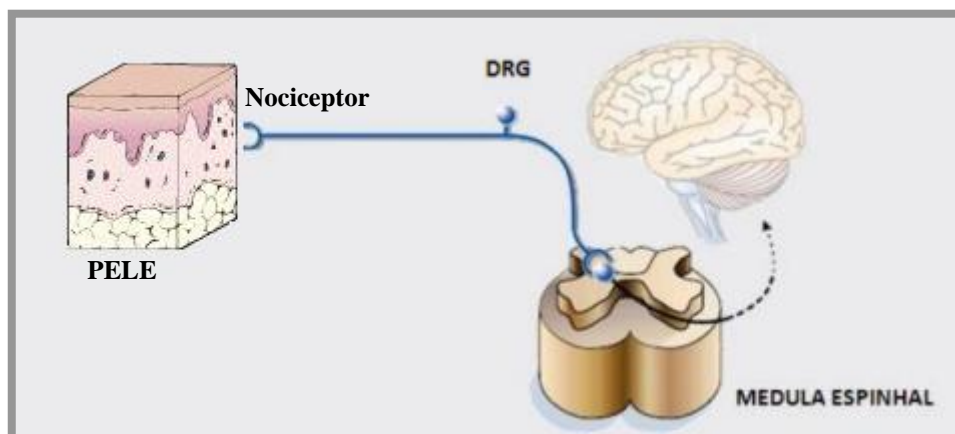


Figura 2 – Nociceptor e sua conexão com a medula e encéfalo. DRG (gânglio da raiz dorsal). Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

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

O segundo estágio no processamento dos sinais nociceptivos é a transmissão. Os nociceptores têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (figura 2), onde são retransmitidas mensagens através da liberação de mediadores como glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (JEFTINIJA et al., 1991; LAWSON et al., 1997; LAWSON et al., 2002; BASBAUM et al., 2009). A informação do estímulo nocivo é transmitida principalmente através de dois diferentes tipos de neurônios nociceptivos aferentes primários, que conduzem o estímulo em diferentes velocidades, caracterizados como fibras do tipo A δ e C (Figura 3).

As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação (Figura 3). As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas superiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas superiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s (MILLAN 1999; WALL; MELZACK 1999; JULIUS; BASBAUM 2001). As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (PLEUVRY; LAURETTI 1996; MILLAN 1999; JULIUS; BASBAUM 2001; BASBAUM et al., 2009).


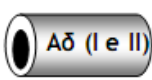

Tipo de fibra	 A α e A β	 A δ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2 - 6 μ m	0.4 - 1.2 μ m
Velocidade de condução	30 - 100m/s	12 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 3 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado de Julius e Basbaum (2001) e Basbaum et al., 2009.

As fibras aferentes nociceptivas terminam predominantemente no corno dorsal da medula espinhal. Este é subdividido em seis camadas (lâminas de Rexed) distintas, de acordo com as características citológicas dos seus neurônios; ou seja, classes de neurônios aferentes primários que conduzem modalidades

diferentes terminam em lâminas distintas do corno dorsal. Neurônios nociceptivos secundários (de projeção) estão localizados no corno dorsal superficial, na lâmina I e na lâmina II (substância gelatinosa). A maioria desses neurônios recebe informação sináptica de fibras A δ e C. Alguns neurônios da camada I respondem exclusivamente a estimulação nociva (neurônios nociceptivos específicos) e projetam-se para centros encefálicos superiores; outros respondem de forma gradual à estimulação mecânica nociva e não-nociva (neurônios de amplo espectro dinâmico). A lâmina II é formada quase exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem apenas a aferências nociceptivas, enquanto outros respondem também a estímulos não-nocivos. As lâminas III e IV estão localizadas ventralmente à substância gelatinosa e seus neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β . A lâmina V contém predominantemente neurônios de amplo espectro dinâmico que se projetam para o tronco encefálico e para regiões do tálamo. Esses neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β e A δ , além das aferências de fibras C diretamente em seus dendritos ou indiretamente através de interneurônios excitatórios que, por sua vez, recebem diretamente aferências de fibras C. Muitos neurônios da lâmina V também recebem aferências nociceptivas de estruturas viscerais. Os neurônios da lâmina VI recebem aferências de fibras de grande diâmetro de músculos e articulações e respondem a estímulos não-nocivos nas articulações. Acredita-se que esses últimos neurônios não contribuem para a transmissão de informação nociceptiva (BASBAUM; JESSEL, 2000, ALMEIDA et al., 2004, BASBAUM et al., 2009).

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

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

medula espinhal e tratos neuronais descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006).

2.3 TEORIA DA COMPORTA E CONTROLE CENTRAL DA DOR

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

As fibras aferentes nociceptivas transmitem o impulso doloroso para o tálamo através de células transmissoras da dor localizadas no corno dorsal na medula espinhal, constituindo a via de transmissão da dor, a qual é controlada pelos neurônios da substância gelatinosa (SG). Neurônios inibitórios descendentes ou influxo aferente não-nociceptivo ativam os neurônios da SG os quais, por sua vez, inibem as células transmissoras da dor dificultando a passagem do impulso doloroso para os centros superiores. Já a estimulação das fibras C, inibe os neurônios inibitórios da SG (Figura 4), permitindo a passagem do impulso doloroso para o tálamo, constituindo-se então o processo de regulação da passagem do impulso doloroso para os centros superiores (YAKSH et al., 1994, MELZACK; KATZ, 2013).

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

Os impulsos dolorosos estão sujeitos a influências modulatórias centrais e que, em situações de estresse físico ou de grande concentração, os

estímulos dolorosos são tolerados. Foi sugerida, então, a existência de um sistema fisiológico de controle central da dor (URBAN et al., 1999; MELZACK; KATZ, 2013).

O processo analgésico ocorre pela estimulação de vários locais como a substância cinzenta periaquedutal (SCPV), locus coeruleus (LC) e o bulbo raquidiano ventromedial rostral (BRVMR), que inclui o núcleo magno da rafe (NMR). Projeções diretas conectam o córtex pré-frontal e insular, o hipotálamo, a amígdala e o tronco cerebral à SCPV. Esta se liga ao NMR no BRVMR o qual, por sua vez, projeta-se para o corno dorsal da medula. O BRVMR é a maior fonte de neurônios do tronco cerebral para o corno dorsal, principalmente para as lâminas I, II e V (FIELDS et al., 1999; URBAN et al., 1999). Deste modo, a estimulação da SCPV provoca excitação dos neurônios do BRVMR que, por sua vez, liberam neurotransmissores, como serotonina e encefalina, os quais vão inibir as respostas nociceptivas dos neurônios do corno dorsal, provocando assim uma diminuição das respostas à dor (BASBAUM; JESSEL, 2000). Existe também a via noradrenérgica proveniente do locus coeruleus, que possui como principal agonista a noradrenalina (FRITSCHY et al., 1987; CLARK et al., 1991). Esta exerce um efeito inibitório sobre a transmissão da dor no corno dorsal (BELCHER et al., 1978; MELZACK; KATZ, 2013).

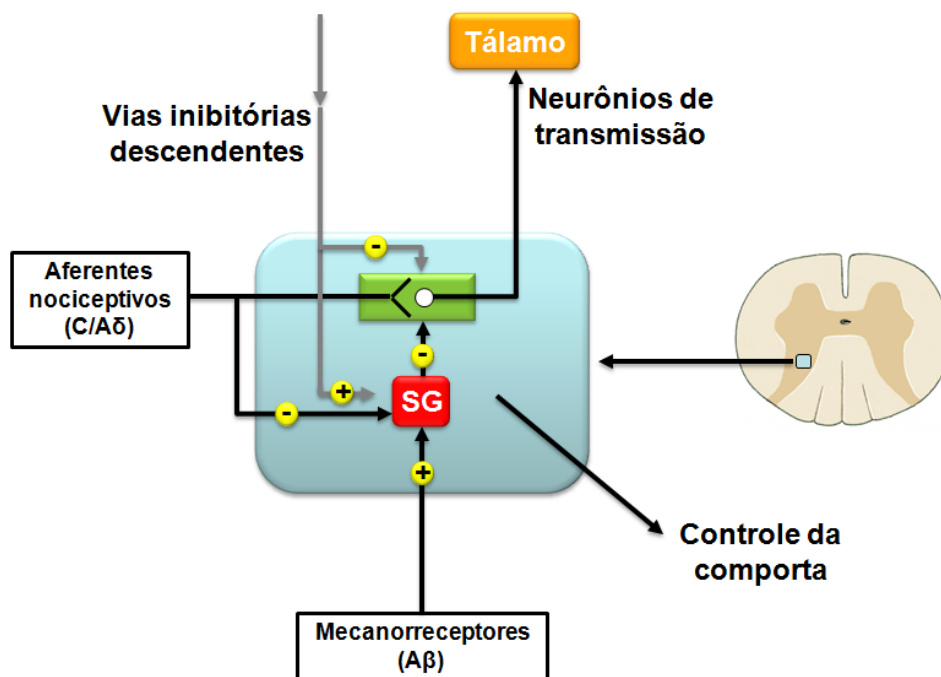


Figura 4 – Diagrama esquemático do sistema de controle da dor. Benedito, 2009. Adaptado de RANG et al., (2007)

2.4 SISTEMA OPIOIDE E ANTINOCICEPÇÃO

O sistema opioide está intimamente relacionado ao controle da dor tanto a nível periférico como a nível central. Uma elevada concentração de receptores opioides está localizada no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal cinzenta, núcleos da rafe, na região ventral superior do bulbo e da ponte e locus ceruleus (MERRER et al, 2009). Algumas dessas substâncias estão relacionadas às vias inibitórias descendentes que modulam a transmissão do estímulo doloroso. Observe, também, a presença de receptores nas amígdalas e córtex cerebrais, no hipocampo, no núcleo caudado e globo pálido, na medula supra-espinhal, nos plexos nervosos e glândulas exócrinas do estômago e intestino, sugerindo a participação dos opioides na regulação do comportamento motor, afetivo, neurovegetativo e neuroendócrino (KRAYCHETE, 2010; MERRER et al, 2009).

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

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

O sistema opioide representa um importante alvo para avaliação de mecanismo de ação de novas drogas com propriedades antinociceptivas.

2.5 CANAIS PARA K⁺ E ANTINOCICEPÇÃO

Os canais iônicos pertencem a uma família de proteínas que formam poros macromoleculares através de membranas lipoprotéicas e que se encarregam de controlar o fluxo de partículas carregadas eletricamente (íons) entre o meio interno e externo das células (HERNANDEZ; FÉLIX, 2001).

Esses canais estão largamente envolvidos em vários mecanismos fisiológicos e patológicos. A compreensão do funcionamento, da estrutura e regulação desses canais leva ao entendimento de muitos processos fisiopatológicos. Dentre esses processos, pode-se citar a sensação dolorosa.

Na maioria das células excitáveis, a corrente de entrada que dá início ao potencial de ação resulta da ativação dos canais para sódio regulados por voltagem (Na_v).

Uma das funções mais marcantes dos canais para K⁺ está na manutenção do potencial de repouso da membrana de todas as células. No entanto, à medida que os estudos acerca desses canais se intensificam, novas funções são atribuídas a eles (HILLE, 2001).

A literatura demonstra o envolvimento de todos os tipos de canais para K⁺ no processo de antinocicepção. A abertura de canais para K⁺ e o consequente aumento da condutância a esse íon para o exterior da célula leva a hiperpolarização celular, assim não ocorrendo a propagação do estímulo nociceptivo (RANG et al., 2007).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que agonistas de receptores μ - e δ - opioides abrem canais para K⁺ retificadores de entrada em neurônios pela ativação de proteínas G_{i/o}. O primeiro estudo que sugeriu o envolvimento da abertura de canais para K⁺ na antinocicepção induzida por agonistas μ -opioide mostrou que a glibenclamida, um bloqueador de canais para K⁺, inibiu o efeito da morfina no teste da placa quente e retirada da cauda em roedores (OCANA; DEL POZO; BAEYENS, 1990; OCANA et al., 1993; 1995; 2004; ROANE; BOYD, 1993).

Drogas que agem em determinados canais para K⁺ induz a antinocicepção por ativarem esses canais, dessa forma, representando importantes alvos para o desenvolvimento de novos agentes no tratamento da dor.

2.6 SISTEMA MUSCARÍNICO E ANTINOCICEPÇÃO

Vários estudos tem demonstrado a participação da via colinérgica nos mecanismos de antinocicepção (HABERBERGER, et al., 2004; HESS, 2009).

A acetilcolina praticamente não tem aplicação terapêutica por causa de sua ação difusa e hidrólise rápida pela acetilcolinesterase sináptica e butirilcolinesterase plasmática. Os níveis endógenos de acetilcolina podem ser mediados por diversas substâncias envolvidas na transmissão do processo doloroso (ABELSON; KOMMALAGE; HOGLUND, 2004). Sua liberação é aumentada nos neurônios do SNC a partir da ativação de receptores opioides pré-sinápticos pela morfina, causando potencialização do efeito antinociceptivo (TAGUCHI et al., 1999).

O aumento dos níveis de acetilcolina intraespinhal durante a analgesia induzida pelos anti-inflamatórios não esteroidais, como a aspirina, também é conhecido (ABELSON; KOMMALAGE; HOGLUND, 2004).

Assim, o sistema colinérgico no SNC é considerado parte de um sistema endógeno de controle da dor, sendo um possível alvo farmacológico para drogas antinociceptivas.

2.7 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 (SAWYNOK, 1998, 1999; SEGERDHAL; SOLLEVI, 1998). 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 opioides; c) a cafeína, um antagonista dos receptores de adenosina A_1 , A_{2A} e A_{2B} , potencializa a atividade analgésica de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) quando administrados concomitantemente, sendo esse efeito ainda não bem compreendido (SAWYNOK, 1998; FREDHOLM, 1999).

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.

2.8 SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ANTINOCICEPÇÃO

Embora a dopamina cerebral seja bem conhecida pelo seu papel na sensação de prazer, na motivação e no controle motor, evidências sugerem que ela pode também ser importante na modulação da dor (WOOD, 2006; WOOD et al., 2007). Estudos usando a estimulação elétrica de estruturas dopaminérgicas ou a administração de compostos que levam ao aumento dos níveis sinápticos de dopamina, indicam que a atividade dopaminérgica pode atenuar o comportamento nociceptivo em animais (MAGNUSSON; FISHER, 2000), ocorrendo, por outro lado, a hiperalgesia em animais que apresentaram redução na liberação de dopamina. Corroborando com estes resultados, foi observado um aumento na liberação de dopamina e histamina após indução de estímulo nocivo em estudos com animais (GAO et al., 2001; MUROTANI et al., 2010). Esses dados convergem para um sugestivo papel adaptativo da dopamina que é liberada em resposta ao estímulo doloroso, atuando na antinocicepção endógena (WOOD et al., 2007).

Estudos com seres humanos tem ratificado os resultados obtidos com animais, tanto com relação a participação dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂ na resposta ao estímulo doloroso e na modulação da dor, quanto na associação do sistema dopaminérgico do gânglio basal com uma condição de dor crônica orofacial (JAASKELAINEN et al., 2001).

2.9 VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO E ANTINOCICEPÇÃO

O NO é responsável pela ativação da guanilato ciclase solúvel e aumento do GMP_c intracelular, podendo então modular uma série de funções fisiológicas. Também está envolvido na nocicepção central e periférica, agindo como

agente pró-nociceptivo, bem como um agente antinociceptivo. Estudos têm evidenciado alguma participação do NO durante a transmissão nociceptiva prolongada, notadamente medular, sugerindo importante papel do NO na dor (DICKENSON, 1995). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual o óxido nítrico exerce esse duplo efeito ainda é incerto (ZAKARIA et al., 2005).

Kawabata et al. (1994), sugerem que o NO induz um efeito pró-nociceptivo em baixas concentrações e antinociceptivo em altas concentrações. Em nível supraespinhal o NO parece ter um efeito duplo dependendo da via que é ativada (KAWABATA et al., 1993).

2.10 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR: FÁRMACOS ANALGÉSICOS

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

Os analgésicos periféricos são representados pelos anti-inflamatórios não-esteroidais, também conhecidos por analgésicos não-opioides. O seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da produção de prostaglandinas por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) no local de lesão, diminuindo assim a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico (WELCH; MARTIN, 2005; STOLFI et al., 2013).

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

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um dos anti-inflamatórios não-esteroidais mais utilizados, visto que diminui a dor em locais predominantemente periféricos, com pouca interação cortical, apresentando conseqüentemente poucos

efeitos sobre o SNC. Fazem ainda parte dessa classe de fármacos a indometacina, o piroxicam, o diclofenaco, a dipirona e o paracetamol (WELCH; MARTIN, 2005).

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

Antidepressivos tricíclicos, particularmente imipramina e amitriptilina. Estes fármacos atuam centralmente, inibindo captura da noradrenalina e são altamente eficazes em aliviar dor neuropática em alguns casos, mas não em todos, sua ação é independente de seus efeitos antidepressivos (MORAES; CAMARGO, 1999).

Antiepilépticos, como a carbamazepina, gabapentina e, ocasionalmente, a fenitoína são algumas vezes eficazes na dor neuropática. A carbamazepina e a fenitoína atuam sobre os canais de sódio controlados por voltagem. O alvo para a gabapentina é a subunidade $\alpha_2\delta$ do canal de cálcio do tipo L. (MORAES; CAMARGO, 1999).

Os opioides, cujos principais representantes são a morfina e a codeína, podem modificar tanto os aspectos sensitivos da dor quanto o emocional. São particularmente úteis no tratamento de dor viscerais difusas, dores associadas ao câncer e na analgesia pré e pós-cirúrgica. Dores neuropáticas, entretanto, costumam ser resistentes aos opioides, ao passo que dores inflamatórias ou dores somáticas de localização bem definida são mais adequadamente tratadas como analgésicos não-esteroidais ou com uma associação de um analgésico não esteroidal e um opioide (McDONALD; LAMBERT, 2009; MIZOGUCHI et al., 2012). Os opioides agem através da ligação a receptores específicos no SNC e periférico, inibindo a nocicepção (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000).

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

Segundo Kissin (2010), de 1960 a 2009, foram introduzidos no mercado cinquenta e nove fármacos identificados como analgésicos, os quais ainda permanecem em uso. A morfina e a aspirina são, há mais de um século, os analgésicos mais utilizados para o tratamento da dor, e continuam a dominar as

publicações em revistas biomédicas. Seus efeitos adversos e a ineficácia em alguns tipos de dor são os principais fatores que impulsionam até hoje a pesquisa e o desenvolvimento de novos analgésicos.

2.11 ESTRESSE OXIDATIVO

2.11.1 ERO / ERN

Os organismos aeróbicos necessitam do oxigênio (O_2) atmosférico para sobreviverem, uma vez que o O_2 é fundamental para a produção de energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP), por meio da cadeia respiratória da mitocôndria (NATHAN; SINGER, 1999; REITER et al., 2001; MELOV, 2002; SANTOS, 2011).

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

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

(A) *Radicais livres* – contém um ou mais elétrons desemparelhados. Ex: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), alcóxila ($RO\cdot/LO\cdot$), peróxila ($ROO\cdot/LOO\cdot$), hidroperóxila ($HO_2\cdot$), óxido nítrico ($\cdot NO$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$).

(B) *Não radicais livres* – não contém elétrons desemparelhados, mas são também altamente reativos. Ex: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), peróxidos lipídicos ($LOOH$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (VALKO et al., 2007).

Uma das principais EROs é o radical hidroxila ($\cdot OH$) que representa a forma neutra do íon hidróxido, sendo, provavelmente, o radical mais agressivo e mais prejudicial *in vivo*. O $\cdot OH$ é altamente reativo e apresenta uma meia-vida muito

curta (menor que 1 ns), dessa forma, sua ação oxidativa ocorre de maneira parácrina, ou seja, próximo ao local onde é formado. A produção de $\bullet\text{OH}$ ocorre por vários mecanismos, entre eles: as radiações ionizantes que causam a decomposição da H_2O em $\bullet\text{OH}$ e H^+ e metais de transição que promovem a quebra de H_2O_2 (PASTOR et al., 2000; REITER et al., 2001; VALKO et al., 2006).

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



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

O $\bullet\text{NO}$ atua como uma molécula oxidativa importante na sinalização celular, estando envolvida numa variedade de processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea e mecanismos de defesa (BERGENDI et al., 1999; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). No entanto, em altas concentrações, causa danos às proteínas e ao DNA. Além disso, sua toxicidade é aumentada quando se combina com o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) para produzir o peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente oxidante que pode causar fragmentação do DNA e peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1994; REITER et al., 2001).

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

infecções e alguns medicamentos, como os barbitúricos (KLAUNIG et al., 1997; VALKO et al., 2006).

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

Os danos causados pelas espécies reativas aos lipídios, especialmente, aos ácidos graxos poliinsaturados, são denominados peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica provoca alterações conformacionais nos fosfolipídios das membranas celulares, que são extremamente sensíveis à oxidação, de modo que a peroxidação lipídica promove sérias alterações nas membranas celulares (FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007; VALKO et al., 2007), causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana, além de perda da seletividade nas trocas iônicas, causando a liberação do conteúdo intracelular, o que leva à morte celular (BEZERRA et al., 2004).

O mecanismo pelo qual as EROs promovem peroxidação lipídica consiste na retirada de um átomo de hidrogênio do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, formando, conseqüentemente, radicais livres, como o radical peroxila e, em seguida, vão sendo formados vários produtos chamados de produtos de oxidação secundários, como aldeídos, hidrocarbonetos e cetonas, como mostra a figura 5. Alguns desses produtos são usados como biomarcadores para investigar a relação de uma substância com os estágios finais da peroxidação lipídica, como é o caso do malonaldeído (MDA) (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

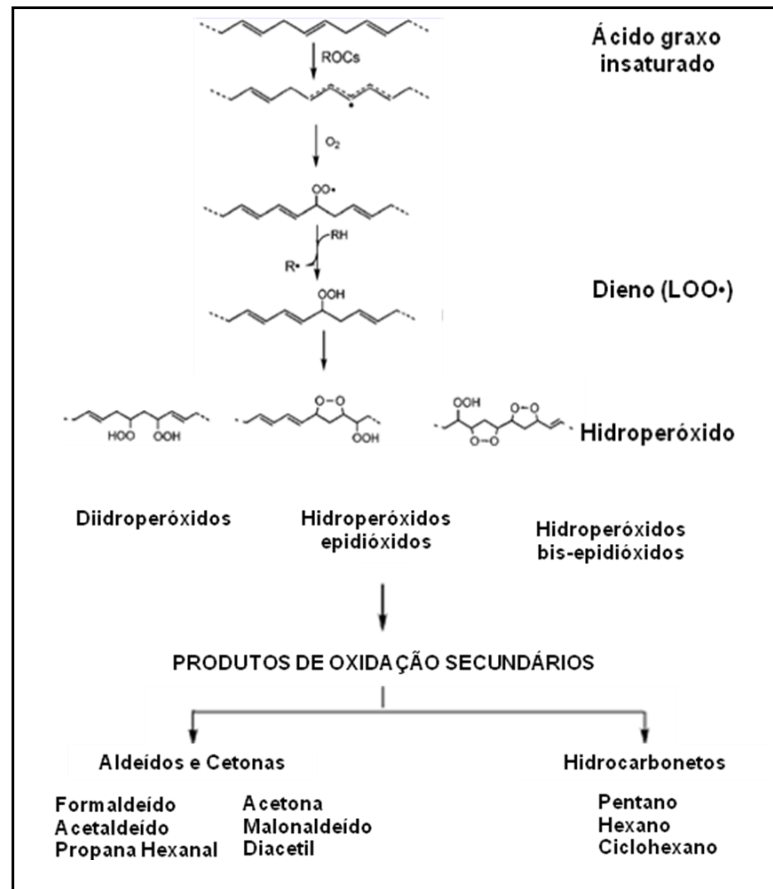


Figura 5 – Mecanismo da peroxidação lipídica FONTE: Adaptado de MOON; SHIBAMOTO, 2009.

O MDA, um dialdeído de 3 carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005), é um dos principais produtos de degradação dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante a peroxidação lipídica (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; OLIVEIRA et al., 2010; OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). Ele é capaz de causar prejuízos a vários processos fisiológicos por reagir com proteínas e DNA (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; LIM, et al., 2003).

2.11.2 Antioxidantes

O organismo dispõe de mecanismos homeostáticos que promovem um controle dos níveis de EROs/ERNs. As substâncias capazes de retardar ou inibir os efeitos prejudiciais da oxidação causada pelas espécies reativas são denominadas antioxidantes (HALLIWELL, 2001; ASOLINI, et al., 2006), que podem ser

enzimáticos (superóxido dismutase – SOD, glutaciona peroxidase e catalase) ou não-enzimáticos (vitaminas C e E, glutaciona, carotenoides, flavonoides e outros) (MATES; GOMEZ; DE CASTRO, 1999; McCALL; FREI, 1999; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; VALKO et al., 2006).

Um bom antioxidante apresenta várias características, entre elas: atacar preferencialmente os radicais livres; interagir com outros antioxidantes, regenerando-os; ser rapidamente absorvidos; ter uma concentração relevante nos fluidos e tecidos biológicos (VALKO et al., 2006). Além disso, um antioxidante pode sequestrar as EROs/ERNs, impedindo a continuidade das etapas na cadeia de reações destas espécies. Uma vez sequestrados, os radicais livres são convertidos a espécies menos reativas (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

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

2.11.3 Dor, Inflamação e Estresse Oxidativo

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

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

EROs/ERNs estão também associadas com o desenvolvimento de estados de dor persistente, incluindo dor neuropática e dor inflamatória (SALVEMINI

et al., 1999; KIM et al., 2004; WANG et al., 2004; GAO et al., 2007). Vários estudos mostraram que antioxidantes, como a vitamina E, são muito eficientes em aliviar a hiperalgesia mecânica em ratos, num modelo de dor neuropática (KIM et al., 2004; YOWTAK et al., 2011). Os antioxidantes também foram bastante efetivos na redução da hiperalgesia e de indicadores da inflamação após a injeção de carragenina (WANG et al., 2004; GAO et al., 2007), capsaicina (LEE et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2009) e formalina (HACIMUFTUOGLU et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2008), por via intraplantar em ratos e camundongos, sugerindo a relação das EROs com o desenvolvimento e manutenção da dor através de vários mecanismos.

Gao et al. (2007) demonstraram que EROs tem relação com a neurotransmissão glutamatérgica, estando envolvidas no aumento da fosforilação do receptor NMDA na medula espinhal em modelos animais de dor, o que resulta na sensibilização central e, conseqüentemente, na dor, de maneira rápida e reversível. Já Yowtak et al. (2011) demonstraram que EROs contribuem para a dor neuropática via neurotransmissão GABAérgica, através da redução da liberação espinhal de GABA. Contudo, o mecanismo fundamental pelo qual a redução de EROs promove alívio da dor ainda não é bem esclarecido (SCHWARTZ et al., 2009).

Já em relação à inflamação, é bem descrito que EROs/ERNs produzidas em excesso estão implicadas na fisiopatologia da inflamação (KATAOKA et al., 1997; MICKALAD et al., 2000; FERNANDES et al., 2003), inclusive, tem sido sugerido que a atividade anti-inflamatória dos AINEs pode ser, em parte, devido a sua capacidade de interferir com as reações mediadas pelos radicais livres (MAFFEI et al., 1993)

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

2.12 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs), também conhecidos como óleos voláteis ou óleos éteres, são extraídos de plantas aromáticas geralmente encontradas em países de clima temperado e tropical (BAKKALI et al., 2008). São produtos de origem natural, com misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com aroma acentuado, podendo ser obtidos de todas as partes das plantas, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes ou cascas (BAKKALI et al., 2008; REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Em temperatura ambiente apresentam-se como substância líquida oleosa e bastante volátil, sendo esta última, a particularidade que o diferencia de óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas obtidos geralmente de sementes (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Com relação à natureza química dos óleos essenciais, esses, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanoides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos, e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de dez e de quinze átomos de carbonos, conhecidas por monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente (SIANI, et al., 2013).

Dentre estes, os monoterpenos ainda podem ser divididos em três subgrupos (SIMÕES; SPITZER, 2004): acíclicos (mirceno, linalol e geraniol); monocíclicos (α -terpineol, terpinoleno, mirtenol); e, bicíclicos (α -pineno, tujona, cânfora e fenchona). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol, linalol, álcool perílico), aldeídos ou cetonas (mentona e carvona), lactonas (nepelactona) e tropolonas (γ -tujaplicina) (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são conhecidos por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, tais como ansiolítica (ALMEIDA et al., 2004; PASSOS et al., 2009), anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999; PASSOS et al., 2009) e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2001, PASSOS et al., 2009).

2.12.1 Álcool perílico

Álcool perílico (p-metha 1,8-diene-7-ol) é um monoterpene monocíclico hidroxilado, formado pela condensação de duas unidades isoprênicas. É encontrado em óleos essenciais de cerejas, lavandas, capim-limão, hortelã, sementes de aipo e gengibre (MCGARVEY; CROTEAU, 1995).

O álcool perílico (AP) pode ser produzido a partir do limoneno, numa rota caracterizada pela substituição do componente metila do limoneno. O primeiro relato dessa via de biotransformação foi realizado por Dhavalikar e Bhattacharyya. Os autores descreveram a biotransformação de R-(+)-limoneno por meio de uma linhagem de *Pseudomonas* isolada de uma amostra de solo (DHAVALIKAR; BHATTACHARYYA, 1966). Outros estudos relatam a biotransformação do limoneno com obtenção dos compostos perílicos por linhagens de leveduras, fungos filamentosos (*Penicillium digitatum* e *Mortierella minutíssima*) e bactérias (JÚNIOR; PASTORE, 2007). A enzima responsável pela transformação do limoneno em álcool perílico é a limoneno 7-monooxigenase.

O AP é considerado como uma substância com potencial atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (YURI et al., 2004; MATOS et al., 2008) e significativa inibição da angiogênese (LOUTRARI et al., 2004). Diversas atividades antitumorais do AP já foram descritas. É capaz de bloquear o ciclo celular e causar apoptose em células leucêmicas (CLARK et al., 2002), de tumor pulmonar e adenocarcinoma (ELEGBEDE et al., 2003; WISEMAN et al., 2007), ativar proteínas apoptóticas (CLARK, 2006), inibir metástase em células de glia (BALASSIANO et al., 2002), inibir migração (WAGNER et al., 2002) e proliferação de células de tumor de mama (YURI et al., 2004), alterar citoesqueleto e expressão de p34 em células de adenocarcinoma (CERDA et al., 1999).

O interesse pelo estudo do potencial antinociceptivo do AP surgiu pela observação da semelhança estrutural desse terpeno com outras moléculas com a mesma atividade, como é o caso do mentol e da carvona, conforme pode ser verificado na figura 1. O AP apresentou atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais e teste da formalina) e térmica (teste da placa quente) em estudo realizado por BENEDITO et al., 2009.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Estudar o mecanismo de ação antinociceptivo e avaliar alterações histopatológicas cerebrais do álcool perílico.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o envolvimento dos sistemas opioide, muscarínico, adenosinérgico, dopaminérgico, L-arginina óxido nítrico e dos canais para K^+_{ATP} no mecanismo de ação do álcool perílico;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do álcool perílico;
- Avaliar possíveis lesões cerebrais ao nível do hipocampo e do corpo estriado de camundongos, em decorrência da administração aguda do álcool perílico;

Material e métodos

4 MATERIAL

4.1 LOCAL DE PESQUISA

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia Elizaldo Carlini e Biotério Prof. Dr. Thomas George (BTG) do Centro de Biotecnologia (CBiotec), onde funciona o curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Outra parte do estudo foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí (UFPI).

4.2 ANIMAIS

No desenvolvimento do presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos albinos da linhagem Suíça, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 a 35 g (Figura 6).

Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.



Figura 6 – Camundongos machos albinos da linhagem Suíça

4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os testes foram realizados com animais previamente alojados em gaiolas de polietileno, contendo quatro animais cada, com pelo menos 60 minutos de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais dos animais bem como, permitir uma adaptação ao novo ambiente. Os camundongos foram privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

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

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animais do LTF / UFPB, sob a certidão N° 0502/11.

4.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- (S)-(-)-álcool perílico, 96% (AP) (Sigma-Aldrich);
- 2-deoxirribose (Sigma – EUA);
- AAPH (2,2'-azobis[2metilpropionamidina]diidrocloreto) (Sigma – EUA);
- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma – EUA);
- Ácido tricloroacético (Sigma – EUA);
- Água destilada (LTF/UFPB);
- Cafeína (Merck – EUA)
- Cloridrato de acetilcolina (Sigma – EUA);
- Cloridrato de morfina (Merck - EUA);
- Etanol (LTF / UFPB - Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- Glibenclamida (Sigma – EUA.);
- Hematoxilina-eosina (Sigma – EUA);
- Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical - EUA);
- L-arginina (Sigma - EUA);
- N-Omega-Nitro-L-Arginina (L-NNA) (Sigma - N5501 - EUA);
- Nitroprussiato de sódio (Sigma – EUA);
- Padrão fosfato (Sigma – EUA);
- Pentobarbital sodico (Sigma - EUA);
- Peróxido de hidrogênio (Sigma – EUA);
- Reagente de Griess (Sigma – EUA);
- Substâncias ácidas reativas ao tiobarbitúrico (TBARS)
- Sulfato de atropina (Sigma - EUA);
- Sulpirida (Sigma - EUA);
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Tween 80 (Vetec - Brasil);

4.5 PREPARAÇÃO DAS DOSES DE ÁLCOOL PERÍLICO

O (s)-(-)-álcool perílico, 96%, foi obtido da empresa Sigma Aldrich Chemical Co. (U.S.A). Imediatamente antes da realização dos testes, AP foi dissolvida em água destilada, com auxílio de uma gota de tween 80, não superior a 0,05%. Foram utilizadas concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do animal.

5 MÉTODOS

5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

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

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

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

5.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO DO ÁLCOOL PERÍLICO

Com o objetivo de determinar o(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s) na atividade antinociceptiva do AP, foi escolhida a dose de 100 mg/kg para a avaliação do efeito do composto frente a vários sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do processo doloroso. Esta dose foi efetiva nos modelos preliminares da analgesia (BENEDITO, 2009), bem como no modelo do ácido acético. A reversão da propriedade antinociceptiva do composto por um antagonista específico de neurotransmissores de várias vias que modulam o processo doloroso foi o critério adotado para a determinação do mecanismo de ação do mesmo. As vias de neuromodulação estudadas no presente trabalho foram: Opióide, muscarínica, adenosinérgica, dopaminérgica, a via L-arginina-Óxido nítrico e os canais K^+_{ATP} .

O fluxograma a seguir mostra o delineamento do estudo.

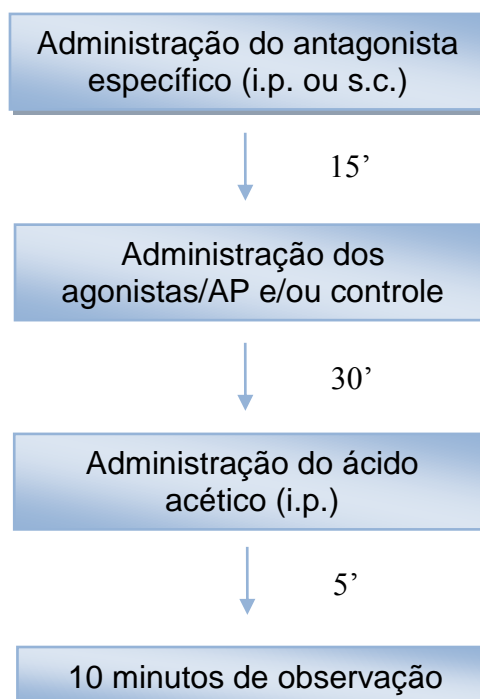


Figura 7 – Fluxograma do protocolo utilizado no estudo para determinação do mecanismo de ação do AP

5.2.1 Estudo do envolvimento do sistema opioide

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do AP, grupos distintos de animais foram tratados com veículo, AP (100 mg/kg i.p.), morfina (6 mg/kg i.p.) ou naloxona (5 mg/kg, s.c.), um antagonista opioide não seletivo. Dois grupos receberam pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) 15 min antes da administração do AP (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 em relação à nocicepção induzida pela injeção i.p. de ácido acético 0,85%.

5.2.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}

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

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

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

5.2.3 Estudo do envolvimento do sistema muscarínico

Para determinar a possível participação do sistema muscarínico no efeito antinociceptivo de AP, grupos de 8 camundongos foram pré-tratados com atropina (ATR - 5 mg/kg, s.c.), um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos 15 minutos antes da administração do AP na dose de 100 mg/kg, i.p.

ou Acetilcolina 5mg/kg i.p. e grupos receberam apenas veículo, atropina e AP. Em seguida, os animais foram submetidos ao teste do ácido acético (PEANA et al., 2003).

5.2.4 Estudo do envolvimento dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico

A possível participação dos sistemas dopaminérgico e adenosinérgico no mecanismo de ação do AP foi estudada utilizando a cafeína (antagonista não seletivo dos receptores de adenosina) e a sulpirida (antagonista de receptor dopaminérgico do tipo D₂). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=8) onde dois deles receberam sulpirida 20 mg/kg s.c. ou cafeína 10 mg/kg s.c. 15 minutos antes da administração do AP na dose de 100 mg/kg, i.p.. Outros grupos receberam apenas veículo, cafeína 10 mg/kg i.p., sulpirida 20 mg/kg i.p. e álcool perílico na dose de 100 mg/kg. Após 30 minutos os camundongos foram submetidos ao teste do ácido acético.

5.2.5 Estudo do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

Para investigar o envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no mecanismo de ação do AP, os animais receberam o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg i.p.) ou o L-NNA (100 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase. Decorridos 15 minutos, estes receberam o álcool perílico na dose de 100 mg/kg. Outro grupo recebeu L-NNA 15 minutos antes da L-arginina e após 30 minutos foram submetidos a avaliação nociceptiva induzida pelo ácido acético (BRIGNOLA, et al. 1994; SANTOS, et al. 2005).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁLCOOL PERÍLICO

5.3.1 Avaliação do álcool perílico na peroxidação lipídica – TBARS

O método utilizado para avaliar o efeito protetor do AP na peroxidação lipídica, um dos principais danos causados pelas EROs/ERNs, foi a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecido como método TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*) (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991).

Este método foi usado para medir a capacidade antioxidante do AP num meio rico em lipídios (GUIMARÃES et al., 2010). O substrato rico em lipídios adotado foi a gema de ovo homogeneizada (1% p/v) em 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Um mL do substrato foi sonicado e então homogeneizado com 0,1 mL de AP, em diferentes concentrações (0,9 - 1,8 - 3,6 - 5,4 - 7,2 µg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis [2metilpropionamidina] diidrochloride) (0,12 M). O controle negativo recebeu apenas o veículo (0,05% tween 80 dissolvido em salina 0,9%). As reações foram realizadas por 30 minutos a 37°C. Após resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturado com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67%) e aquecido a 95°C por 30 minutos. Após resfriamento, a absorbância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de TBARS formada a partir do AAPH apenas (controle induzido). O Trolox 140 µg/mL foi utilizado como droga-padrão.

5.3.2 Avaliação do álcool perílico quanto ao sequestro de radicais livres

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

5.3.2.1 Radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$)

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

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

5.3.2.2 Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

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

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

5.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

No intuito de avaliar alterações histopatológicas em tecidos cerebrais, os animais foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada, tratados por via intraperitoneal obedecendo aos protocolos de tratamento assim descritos: Grupo Controle, tratado com solução salina 0,9% por via intraperitoneal; Grupo Veículo, tratado com o veículo (TWEEN 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) por via intraperitoneal; Grupo álcool perílico, tratados com o AP nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg; i.p., denominados AP 50, AP 75 e AP 100, respectivamente.

Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas individualmente e 72h depois foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg, i.p.) para eutanásia.

Em seguida, seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 μ m foram feitas, coradas em hematoxilina - eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em objetivas de 40 e 100X, mas as fotos foram feitas com a objetiva de 100X. As áreas cerebrais foram observadas em toda extensão sem escolha de campos específicos; as lâminas foram lidas da esquerda para direita e de cima para baixo e classificadas de acordo com as descrições do atlas de Paxinos e Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisado de acordo com o método descrito anteriormente (PAXINOS; WATSON, 1986, BUREAU et al., 1994; FREITAS et al., 2010). A lesão cerebral é definida pela presença de pelo menos 50% de alteração histopatológica em cada área analisada (hipocampo e corpo estriado).

O procedimento descritos foram realizados com a colaboração do professor Rivelilson Mendes de Freitas da Universidade Federal do Piauí.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo post-test de Newman-Keuls para múltiplas comparações no programa GraphPad Prism versão 4.03 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA. O mesmo programa (GraphPad Prism) foi utilizado para confecção dos gráficos apresentados neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁLCOOL PERÍLICO

6.1.1 Estudo do envolvimento do sistema opioide

O gráfico 1 mostra o efeito do AP sobre a via opioide no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O grupo tratado com naloxona ($21,6 \pm 2,2$) não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($23,3 \pm 2,5$). Tanto o AP, na dose de 100 mg/kg ($3,4 \pm 1,7$) como a morfina ($0,3 \pm 0,2$) reduziram significativamente o número de contorções abdominais comparados ao controle. O tratamento com naloxona reverteu parcialmente o efeito do AP (naloxona + AP: $10,4 \pm 2,3$), quando comparamos ao grupo que foi tratado apenas com AP. A morfina, controle positivo, teve seu efeito revertido pela naloxona como esperado (grupo naloxona + morfina: $20,0 \pm 3,4$), comparando ao grupo que recebeu apenas morfina.

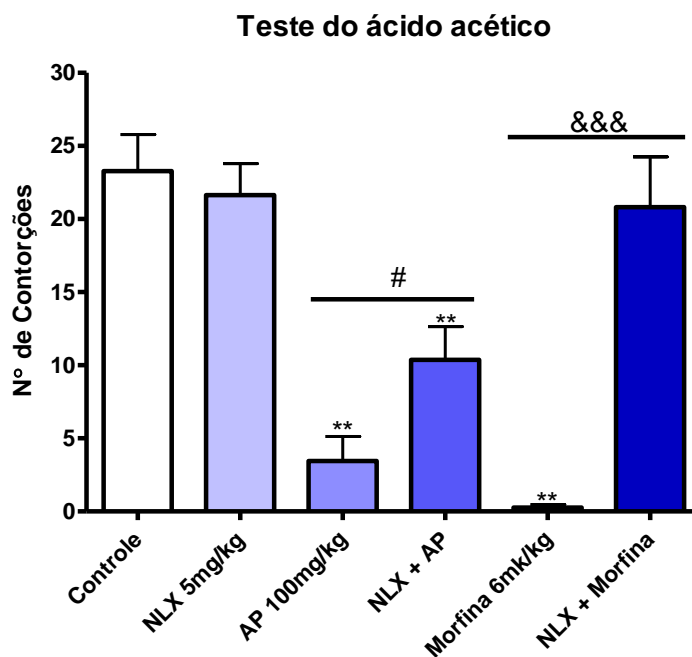


Gráfico 1 – Efeito da naloxona (NLX) sobre a atividade antinociceptiva do álcool perílico (AP) e morfina na nocicepção induzida pela administração de ácido acético em camundongos. Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=8). **p<0,01 vs controle; #p<0,05 vs álcool perílico; &&&p<0,001 vs morfina (ANOVA “one-way” seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.1.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}

No gráfico 2 está avaliado o efeito do AP sobre os canais de K^+_{ATP} . O grupo tratado com glibenclamida ($40,5 \pm 2,3$) apresentou um maior número de contorções abdominais quando comparado ao grupo controle ($17,8 \pm 2,4$). Tanto o AP, na dose de 100 mg/kg ($2,6 \pm 0,9$) como a morfina ($0,6 \pm 0,5$) reduziram significativamente o número de contorções abdominais em relação ao controle. O tratamento com glibenclamida não reverteu o efeito do AP (glibenclamida + álcool perílico: $0,9 \pm 0,6$) quando comparado ao grupo que foi tratado apenas com AP. A morfina, por sua vez, teve seu efeito revertido pela glibenclamida, comparando o grupo tratado com morfina ao grupo tratado com glibenclamida e morfina ($12,0 \pm 4,0$).

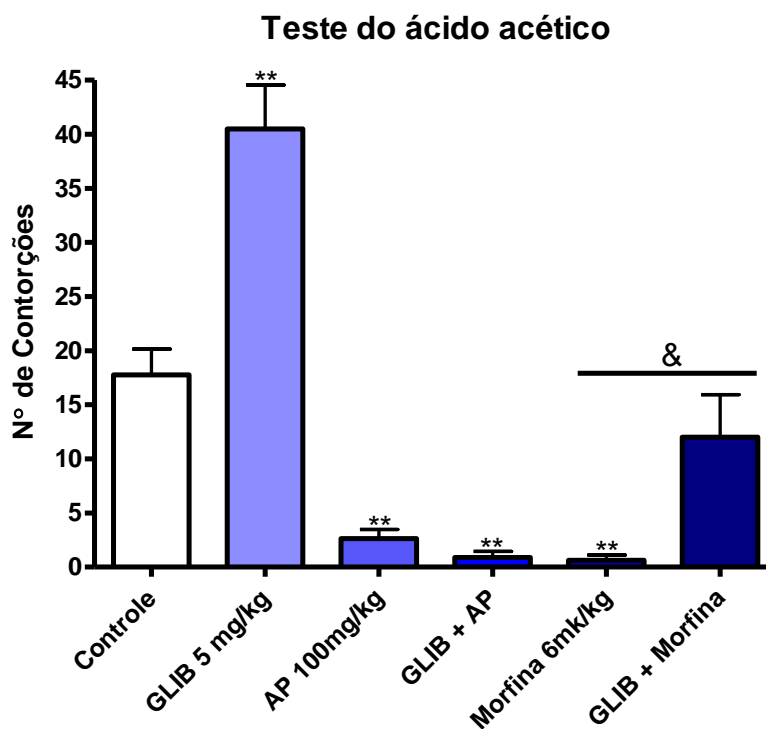


Gráfico 2 – Efeito da glibenclamida (GLIB) sobre a atividade antinociceptiva do álcool perílico (AP) e morfina na nocicepção induzida pela administração de ácido acético em camundongos. Valores expressos em média ± E.P.M. (n=8). **p<0,01 vs controle e &p<0,05 vs morfina (ANOVA “one-way” seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.1.3 Estudo do envolvimento do sistema muscarínico

O gráfico 3 mostra o efeito do AP em relação ao sistema muscarínico. O grupo tratado com atropina 5 mg/kg ($17,6 \pm 4,8$) não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($22,4 \pm 1,5$) quanto ao número de contorções abdominais. Tanto o AP, na dose de 100 mg/kg ($3,6 \pm 1,8$) como a acetilcolina 5 mg/kg ($10,6 \pm 1,9$) reduziram significativamente o número de contorções abdominais comparados ao controle. O tratamento com atropina não foi capaz de reverter o efeito do AP (atropina + AP: $0,4 \pm 0,4$), quando comparamos ao grupo que foi tratado apenas com AP. A acetilcolina, controle positivo, teve seu efeito revertido pela atropina (atropina + acetilcolina: $23,7 \pm 5,3$) comparando ao grupo que recebeu apenas acetilcolina.

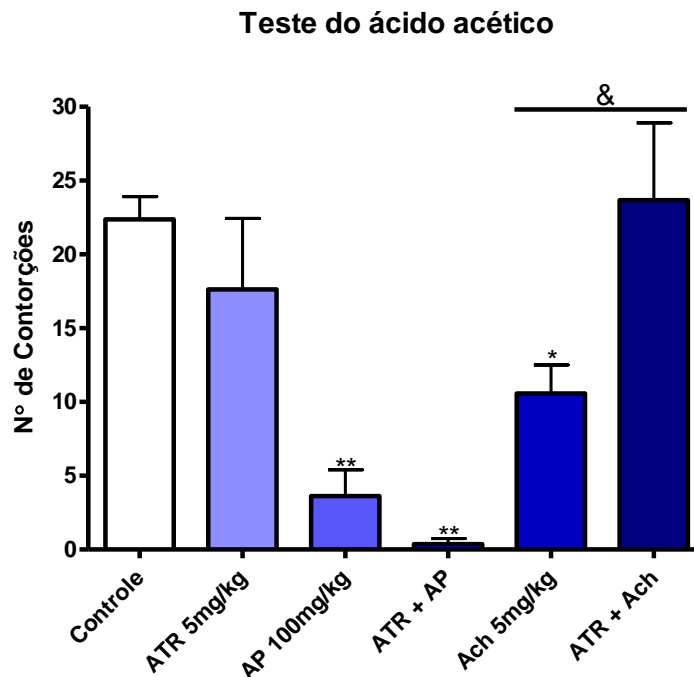


Gráfico 3 – Efeito da atropina (ATR) sobre a atividade antinociceptiva do álcool perílico (AP) e acetilcolina (Ach) na nocicepção induzida pela administração de ácido acético em camundongos. Valores expressos em média ± E.P.M. (n=8). *p<0,05; **p<0,01 vs controle e &p<0,05 vs Ach (ANOVA “one-way” seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.1.4 Estudo do envolvimento do sistema adenosinérgico e dopaminérgico

O gráfico 4 mostra o efeito do AP em relação aos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico. Os grupos tratados com cafeína 10 mg/kg ($17,0 \pm 2,6$) e sulpirida 20

mg/kg ($20,6 \pm 2,6$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($18,3 \pm 3,4$) quanto ao número de contorções abdominais. O AP, na dose de 100 mg/kg ($4,6 \pm 2,2$) reduziu significativamente o número de contorções abdominais comparados ao controle. O pré-tratamento com cafeína ou sulpirida não foi capaz de reverter o efeito do AP (cafeína + álcool perílico: $5,4 \pm 3,0$ e sulpirida + álcool perílico: $7,1 \pm 3,5$), quando comparamos ao grupo que foi tratado apenas com AP.

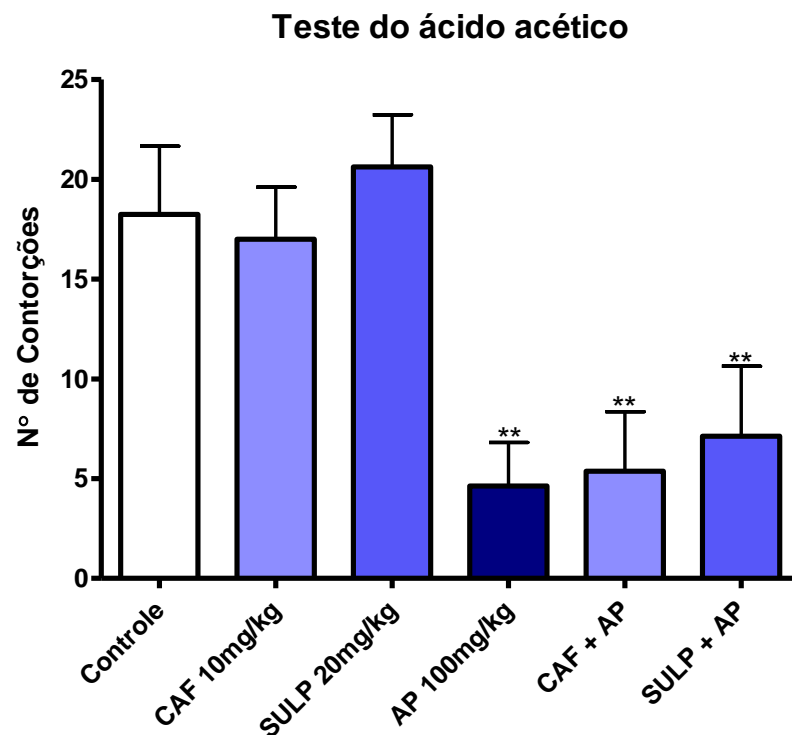


Gráfico 4 – Efeito da cafeína (CAF) e sulpirida (SULP) sobre a atividade antinociceptiva do álcool perílico (AP) na nocicepção induzida pela administração de ácido acético em camundongos. Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=8). **p<0,01 vs controle (ANOVA “one-way” seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.1.5 Estudo do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

O tratamento dos animais com o AP 100 mg/kg ($3,4 \pm 0,9$), L-arginina 600 mg/kg ($1,6 \pm 0,7$) e L-NNA (N-Omega-Nitro-L-Arginina) + L-arginina ($4,3 \pm 1,8$) resultou em uma redução significativa no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparados ao grupo controle ($29,3 \pm 4,0$). O L-NNA ($37,1 \pm 4,0$) sozinho promoveu um aumento no número de contorções se

comparado ao controle. Quando se administrou o AP na presença de L-arginina ($3,9 \pm 2,8$) ou L-NNA ($8,3 \pm 2,6$) não ocorreu modificação significativa quanto ao número de contorções abdominais quando comparados ao grupo que foi tratado apenas com álcool perílico, como pode ser observado no gráfico 5.

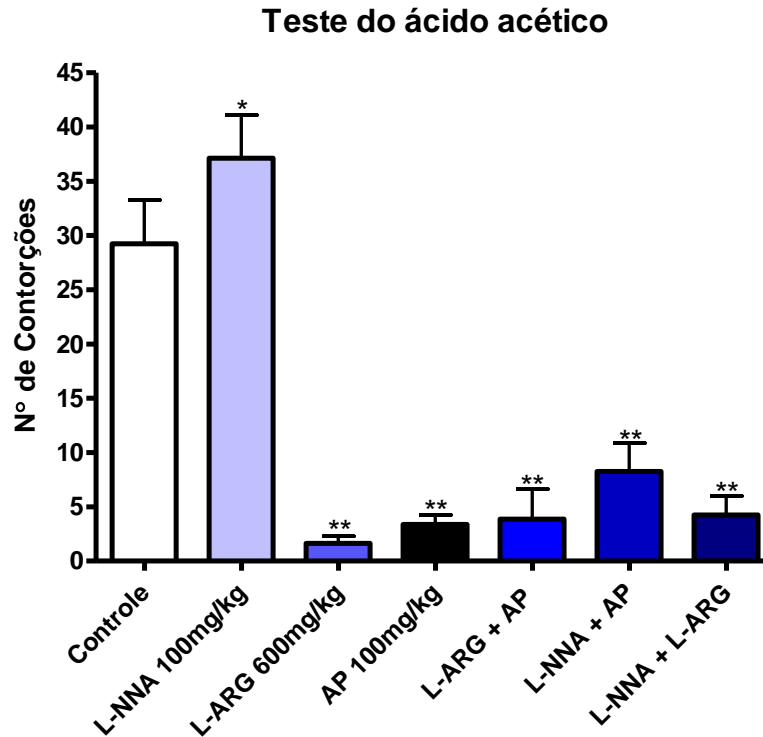


Gráfico 5 – Efeito do L-NNA e L-arginina sobre a atividade antinociceptiva do álcool perílico (AP) na nocicepção induzida pela administração de ácido acético em camundongos. Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle (ANOVA “one-way” seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁLCOOL PERÍLICO

6.2.1 Avaliação do álcool perílico sobre a peroxidação lipídica – TBARS

O efeito do AP sobre a peroxidação lipídica foi analisado pelo método TBARS. Os resultados obtidos mostram que, em todas as concentrações testadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$), o AP causou uma diminuição significativa na produção de TBARS em relação ao grupo AAPH 0,12 M ($99,9 \pm 1,3$). A inibição na produção foi da ordem de 18% ($81,8 \pm 0,8$); 32% ($68,3 \pm 1,2$); 42% ($58,3 \pm 0,8$); 53%

($47,0 \pm 1,0$); 70% ($29,8 \pm 1,0$), respectivamente. O Trolox 140 mM, droga padrão utilizada, também reduziu o parâmetro observado, apresentando 57% ($43,0 \pm 3,0$) de inibição (gráfico 6).

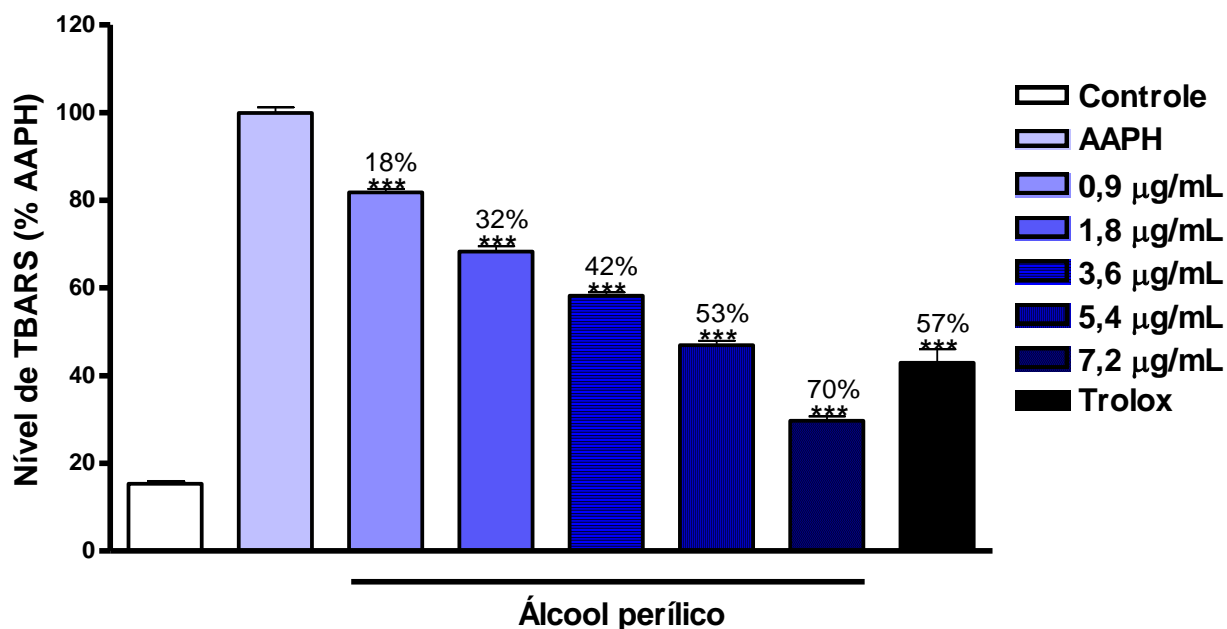


Gráfico 6 - Efeito do álcool perílico (AP) nos níveis de TBARS *in vitro*. Lipídios extraídos da gema do ovo foram submetidos a danos oxidativos por meio da incubação com AAPH e a capacidade de diferentes concentrações de AP para evitar a formação de TBARS foi analisada. O controle negativo significa a peroxidação lipídica basal com o veículo sozinho (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); Grupo AAPH 0,12 M é considerado como o grupo que apresenta 100% de dano oxidativo. Os valores representam média \pm E.P.M., experimentos em duplicata. *** $p < 0,001$ vs AAPH (ANOVA "one-way" seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.2.2 Avaliação do álcool perílico quanto ao sequestro de radicais livres

6.2.2.1 Radical hidroxila (\bullet OH)

O AP foi testado quanto a atividade sequestradora de radicais hidroxila (OH). Os resultados estão mostrados no gráfico 7, no qual observa-se que o AP, nas concentrações testadas, foi capaz de remover o radical OH de maneira significativa, quando comparado ao grupo sistema ($100,2 \pm 1,3$) [0,9 µg/mL: 30% ($69,7 \pm 2,0$); 1,8 µg/mL: 42% ($58,0 \pm 0,4$); 3,6 µg/mL: 46% ($54,0 \pm 0,8$); 5,4 µg/mL: 59% ($41,2 \pm 0,4$);

7,2: $\mu\text{g/mL}$ 66% ($34,0 \pm 0,8$) de inibição, respectivamente]. O trolox 140 $\mu\text{g/mL}$ produziu uma diminuição de 76% ($24,9 \pm 1,0$).

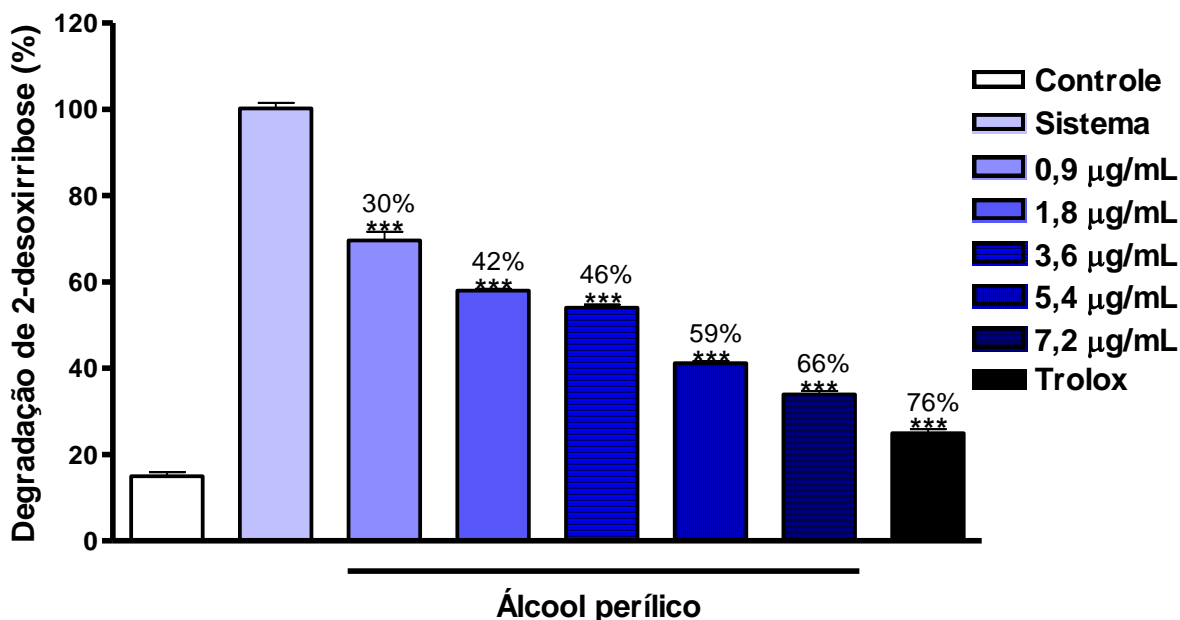


Gráfico 7 - Efeito do álcool perílico (AP) sobre o sequestro do radical hidroxila. Atividade de captação de radicais hidroxila foi quantificada usando a degradação oxidativa *in vitro* da 2-desoxirribose, que produz malondialdeído (MDA) por condensação com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Sistema significa produção do MDA pela degradação da 2-desoxirribose com FeSO_4 e H_2O_2 sozinhos. Os Outros grupos denotam produção de MDA por FeSO_4 e H_2O_2 na presença de diferentes concentrações de AP (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$). Os valores representam média \pm E.P.M. experimentos em duplicata. *** $p < 0,001$ vs AAPH (ANOVA "one-way" seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações).

6.2.2.2 Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

A atividade do AP como substância sequestradora de NO também foi testada. Os resultados apresentados no gráfico 8 mostram que o AP, nas concentrações testadas, foi capaz de remover o NO de maneira significativa, em relação ao grupo SNP ($99,9 \pm 1,3$) [0,9 $\mu\text{g/mL}$: 16,5% de remoção ($83,4 \pm 0,9$); 1,8 $\mu\text{g/mL}$: 25,0% ($74,9 \pm 1,1$); 3,6 $\mu\text{g/mL}$: 33,0% ($67,0 \pm 1,3$); 5,4 $\mu\text{g/mL}$: 40,5% ($59,5 \pm 1,2$); 7,2 $\mu\text{g/mL}$: 55,3% ($44,7 \pm 0,8$) de inibição, respectivamente]. O trolox 140 $\mu\text{g/mL}$ produziu uma diminuição de 59,9% ($40,1 \pm 2,9$).

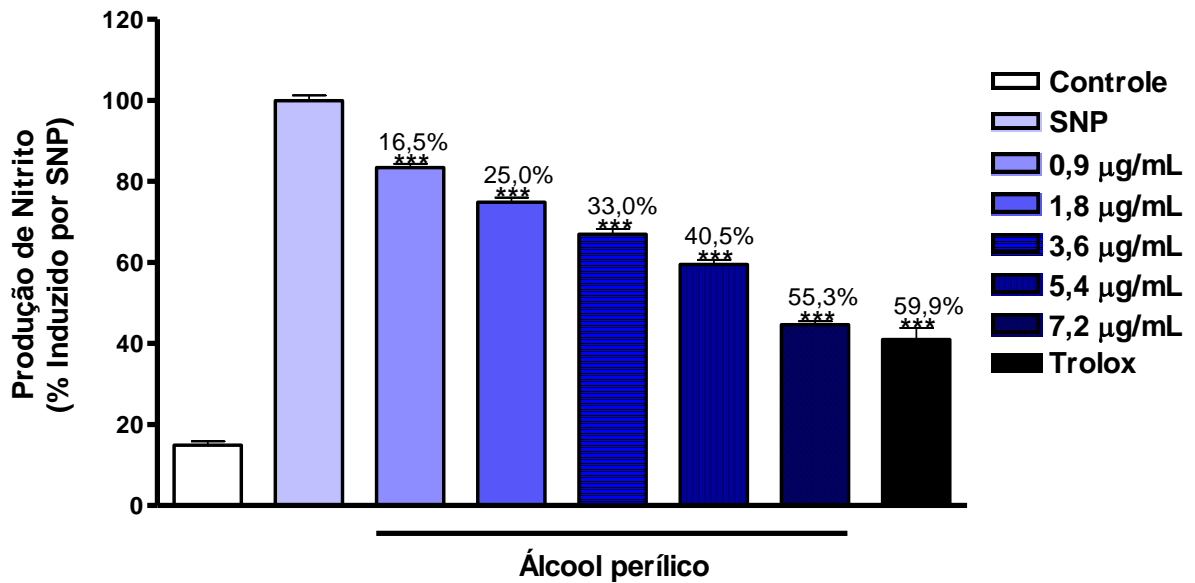


Gráfico 8 - Efeito do álcool perílico (AP) sobre o sequestro do óxido nítrico (NO). O controle significa a produção de NO basal do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) na ausência de uma fonte geradora NO (sem SNP), o grupo SNP significa a produção de nitrito por nitroprussiato de sódio sozinho, considerado 100% da produção de NO. O efeito de diferentes concentrações do AP sobre o SNP foi determinada pelo método de Griess. Os valores representam média \pm E.P.M., experimentos em duplicata. *** $p < 0.001$ vs SNP (ANOVA "one-way" seguido pelo post-test de Newman-Keuls múltiplas comparações)

6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A Tabela 1 demonstra uma pequena percentagem (33%) de animais com lesão cerebral em nível de hipocampo (02 de 06 animais) no grupo tratado com AP 100 mg/kg, em comparação ao grupo controle. A severidade da lesão foi de apenas 16%. Não foi detectado nenhum grau de comprometimento do hipocampo nos animais tratados com AP nas doses de 50 e 75 mg/kg, quando comparados entre si, ao veículo e ao grupo controle.

Foi observada presença de algumas células necrosadas no hipocampo dos animais tratados com a maior dose do AP (figura 8), porém a maioria dos neurônios permaneceu com sua morfologia normal, não apresentando qualquer sinal de dano neuronal como gliose, vacuolização ou deslocamento de núcleo ou nucléolo.

A análise histopatológica do corpo estriado mostra leves danos histopatológicos em apenas 16% dos animais (01 de 06 animais) tratados com AP na dose de 100 mg/kg. O comprometimento estriatal foi de apenas 10% com

moderada perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração (figura 9). As doses de 50 e 75 mg/kg não causaram alterações (tabela 1).

Tabela 1 - Alterações histopatológicas do hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados com AP.

Grupos	(%) Animais com lesões	Comprometimento da área (%)	Número de animais com lesão cerebral	Número de animais
Alterações histopatológicas no hipocampo				
Controle	0	0	0	06
Veículo	0	0	0	06
AP 50	0	0	0	06
AP 75	0	0	0	06
AP 100	33	16	02	06
Alterações histopatológicas no corpo estriado				
Controle	0	0	0	06
Veículo	0	0	0	06
AP 50	0	0	0	06
AP 75	0	0	0	06
AP 100	16	10	01	06

Resultados para % de camundongos com lesão cerebral e % gravidade da lesão são expressos em porcentagem do número de animais. AP 50 – álcool perílico 50 mg/kg, AP 75 – álcool perílico 75 mg/kg e AP 100 – álcool perílico 100 mg/kg.

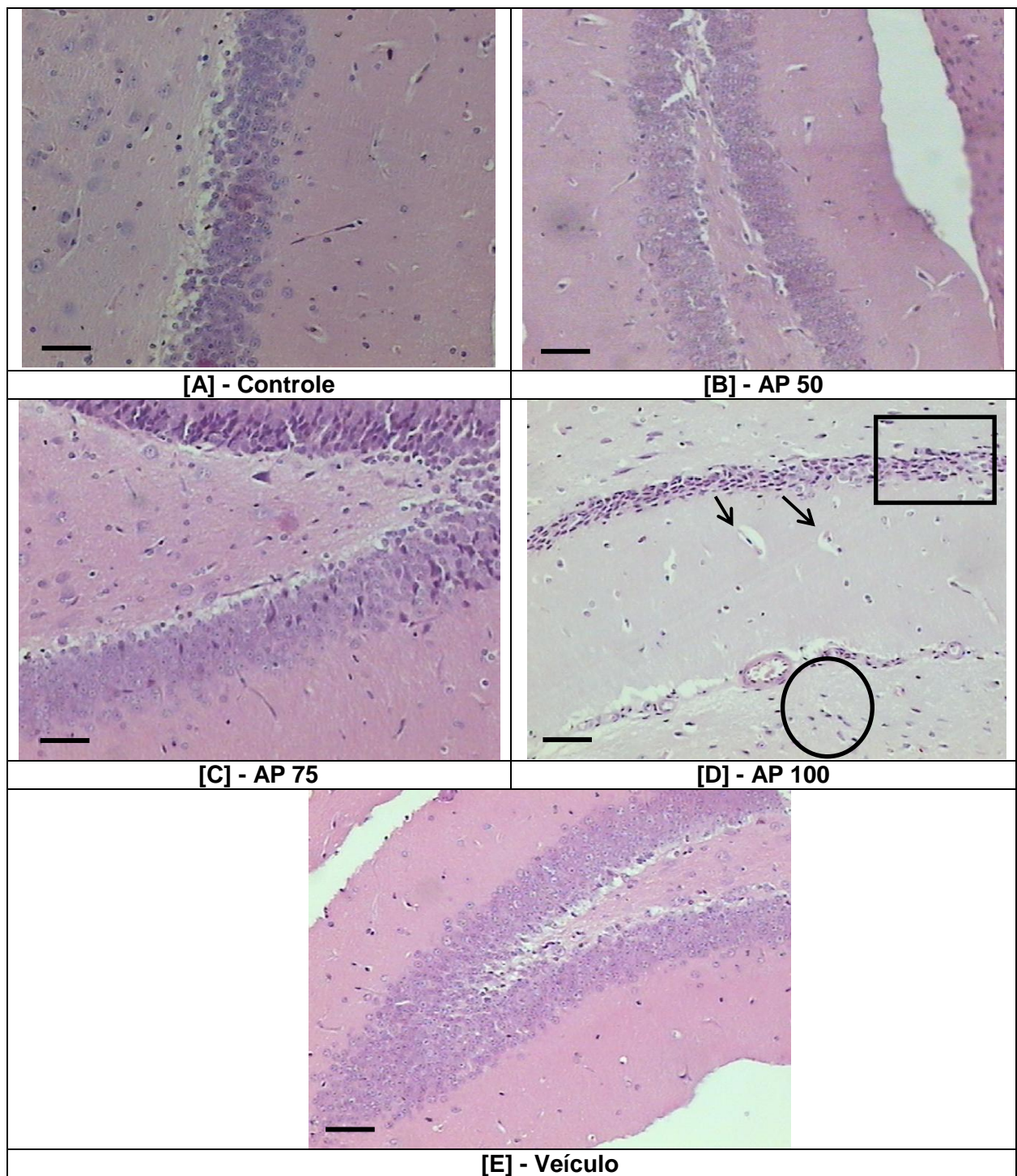


Figura 8: Alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos pré-tratados com AP.

[A] O grupo controle; [B] AP 50 mg/kg/dia; [C] AP 75 mg/kg/dia; [D] AP 100 mg/kg/dia; [E] grupo veículo. Coloração, Hematoxilina & Eosina. Barra da escala, 10 μ m, ampliação de 100X. Lâmina representativa (n=6), mostrando uma típica degeneração vacuolar (seta), dano neuronal moderado (círculo) e gliose (quadrado) no hipocampo de camundongos (Fig. 8D).

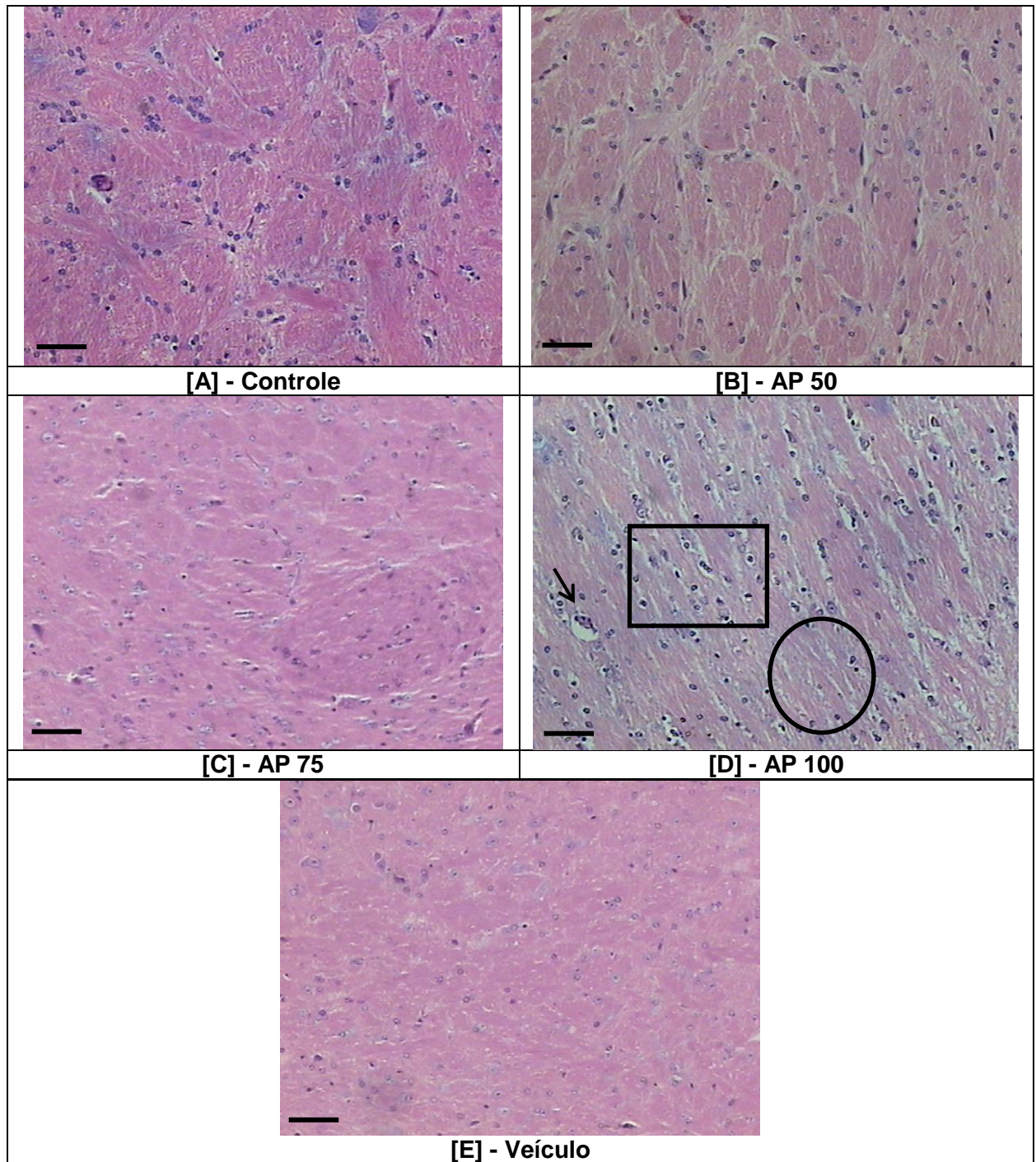


Figura 9: Alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos pré-tratados com AP.

[A] O grupo controle; [B] AP 50 mg/kg/dia; [C] AP 75 mg/kg/dia; [D] AP 100 mg/kg/dia; [E] grupo veículo. Coloração, Hematoxilina & Eosina. Barra da escala, 10 μ m, ampliação de 100X. Lâmina representativa (n=6), mostrando uma típica degeneração vacuolar (seta), dano neuronal moderado (círculo) e gliose (quadrado) no corpo estriado de camundongos (Fig. 9D).

Discussão

7 DISCUSSÃO

A pesquisa com produtos naturais continua identificando uma enorme variedade de substâncias que são usadas para o desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos naturais. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos.

O álcool perílico é um composto de origem natural pertencente a classe dos monoterpenos. Estudos anteriores provaram que esta molécula, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, foi capaz de produzir antinocicepção em três modelos clássicos usados na pesquisa de substâncias antinociceptivas. São eles, o teste da placa quente, o teste da formalina e o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (BENEDITO, 2009).

Diante destes resultados, decidiu-se aprofundar o estudo com o AP e passou-se a investigar seu possível mecanismo de ação utilizando o teste do ácido acético, como protocolo de escolha, e ferramentas farmacológicas. Utilizamos ainda metodologias *in vitro* na intenção de correlacionar o seu mecanismo de ação com uma possível atividade antioxidante. Por último, foi investigado a presença e intensidade de alterações histopatológicas em duas áreas cerebrais após o tratamento com a substância em estudo.

Em um artigo de revisão (ALMEIDA et al., 2001) envolvendo a atividade analgésica de plantas estudadas e publicadas nas revistas *Phytomedicine*, *Fitoterapia*, *Planta Médica*, *Journal of Ethnopharmacology* e *Phytotherapy Research*, mostrou que 66 trabalhos foram publicados, abordando o uso de extratos obtidos de plantas, em roedores. Para avaliar a atividade analgésica, 42,1% dos trabalhos utilizaram as contorções abdominais induzidas por ácido acético, 18,7 % dos trabalhos o teste da formalina e 17,9 % utilizaram o teste da placa quente (CARLINI et. al., 2003).

O modelo químico de nocicepção de contorções abdominais em camundongos baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal,

seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (WHITTLE, 1964).

Portanto, neste estudo, o mecanismo de ação do AP foi avaliado utilizando o modelo das contorções abdominais, que é simples, rápido e confiável (SHINDE, et al., 1999) e é caracterizado por ser uma metodologia de alta sensibilidade, sendo sensível a drogas centrais e periféricas (VAZ et al., 1996; RAMEZANI; HOSSINZADEH; DANESHMAND, 2001; PERIMAL et al., 2010).

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 opioide. Os receptores opioides estão expressos nos nervos envolvidos na transmissão da dor (trajetória ascendente sensorial) e modulação (trajetória inibitória descendente) na periferia, na medula espinhal e no cérebro (MANSOUR et al., 1994). Eles previnem a ativação e sensibilização dessas fibras e inibem a liberação de neurotransmissores, por estarem presentes nas fibras C dos nervos aferentes primários sensitivos (STEIN et al., 1993).

Os opioides foram estudados mais intensamente do que qualquer outro grupo de drogas, na tentativa de se compreender seus poderosos efeitos em termos moleculares, bioquímicos e fisiológicos, permitindo o desenvolvimento de novos agentes dotados de vantagens significativas em relação à morfina. Mesmo com esse estudo, a morfina continua sendo o agente convencional para avaliação de qualquer novo agente (DUGGAN; NORTH, 1984; PASTERNAK, 1993; YAKSH, 1997).

O efeito antinociceptivo de monoterpenos envolvendo o sistema opioide já foi descrito na literatura. Galeotti et al. (2002) com o monoterpeno (-)-mentol, Peana et al. (2003) com o (-)-linalol e Lima et al. (2012) com o α -felandreno.

A fim de avaliarmos a participação da via opioide no mecanismo de ação do álcool perílico, foi utilizado a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides. A droga padrão escolhida foi a morfina. Os resultados sugerem a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do AP, devido à reversão parcial do efeito antinociceptivo em animais pré-tratados com a naloxona.

Os canais K^+_{ATP} dependentes também mostram ter um envolvimento nos processos de dor. A ativação desses canais leva a uma hiperpolarização celular, diminuindo os níveis de Ca^{2+} intracelulares e reduzindo a liberação de neurotransmissores, desse modo levando à antinocicepção (OCANA et al., 2004; LOHMANN; WELCH, 1999; 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^+_{ATP} no mecanismo de ação do álcool perílico, a glibenclamida, um conhecido bloqueador desses canais, foi utilizada. Os resultados obtidos mostraram que a antinocicepção produzida pelo AP não foi revertida pela glibenclamida, sugerindo a não participação desses canais no mecanismo de ação.

Foi demonstrado que a ativação periférica de receptores colinérgicos muscarínicos produz antinocicepção em diferentes modelos experimentais (BARROS, 2010). Além disso, é conhecido o envolvimento da acetilcolina como modulador das respostas nociceptivas. A antinocicepção induzida pela administração sistêmica de morfina pode ser antagonizada pela administração intratecal de antagonistas muscarínicos, reforçando a ideia de sinergismo entre os sistemas opioide e colinérgico (TAGUCHI et al., 1999). Em adição, sabe-se que a atropina mostra-se capaz de reverter a antinocicepção produzida por substâncias de origem natural, entre elas monoterpenos (PEANA, 2004). Desta forma, com propósito de avaliar o envolvimento do sistema muscarínico na antinocicepção do AP, os animais foram tratados com atropina antes da administração do álcool perílico. A atividade antinociceptiva do AP não foi alterada pela atropina, sugerindo que o álcool perílico exerce seu efeito independente do sistema colinérgico.

O sistema adenosinérgico também foi investigado e os dados mostram que o pré-tratamento dos animais com cafeína, antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, não suprimiu o efeito antinociceptivo causado pelo AP, indicando a não participação dessa via no seu mecanismo. A adenosina atuando em receptores A_1 pré-sinápticos, induz a diminuição da produção de AMP_c e a inibição dos canais de cálcio voltagem dependente, gerando uma diminuição na liberação de acetilcolina, SP ou CGRP (SAWYNOK, LIU, 2003; PEANA et al., 2006). Já a sua ativação pós-sináptica induz a abertura de vários subtipos de canais de potássio. Adicionalmente, dados da literatura demonstram que os receptores de adenosina A_{2A} também participam da modulação da dor em níveis espinhais e supra espinhais (PHAM et al., 2003; PEANA et al., 2006).

O sistema dopaminérgico é constituído por receptores D_1 , D_2 , D_3 , D_4 e D_5 , acoplados à proteína G. Possui vários antagonistas, dentre eles a sulpirida, um antagonista de receptores do tipo D_2 e o haloperidol, um antagonista não-seletivo, sendo este considerado um neuroléptico típico. A relação do sistema dopaminérgico com a modulação da nocicepção é demonstrada pela presença de receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D_2 e seu respectivo mRNA codificador em áreas do corno dorsal. A presença destes é mais pronunciada na lâminas I, mas também são encontrados na lâminas de II-VI. Estudos de imunohistoquímica mostram que esses receptores estão localizados em terminais centrais de fibras aferentes primárias, estabelecendo a relação entre o sistema dopaminérgico e o controle da dor (VAN DIJKEN, et al., 1996).

Os resultados mostram que o efeito antinociceptivo causado pelo AP não é dependente da ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D_2 , tendo em vista a não reversão pela sulpirida.

Também foi investigada a participação da via L-arginina óxido nítrico na antinocicepção induzida pelo AP, tendo em vista que essa via exerce um papel importante na modulação da nocicepção. Uma série de estudos morfológicos, fisiológicos e farmacológicos sugerem que o óxido nítrico (NO) participa do processo de nocicepção (HALEY; DICKENSON; SCHACHTER, 1992; CURY et al., 2011).

O mecanismo antinociceptivo do NO envolve a formação de GMP cíclico, ativação de PKG e conseqüentemente abertura de canais para K^+ . O NO medeia o efeito analgésico de várias drogas, incluindo opioides, dipirona e alguns

agentes anti-inflamatórios. Os mecanismos pelos quais estes fármacos estimulam a produção de NO não foram ainda bem caracterizados (CURY et al., 2011).

O NO exerce um duplo papel no processo de nocicepção, podendo atuar como molécula nociceptiva ou antinociceptiva a depender de vários fatores, como dose utilizada, via de administração, pré ou pós-tratamento e modelo experimental utilizado (CURY et al., 2011).

Camundongos foram pré-tratados com o substrato da óxido nítrico sintase, a L-arginina e com o L-NNA, um inibidor da óxido nítrico sintase. Nenhuma das duas substâncias foi capaz de reverter significativamente a antinocicepção produzida pelo AP. Os achados desse estudo sugerem o não envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção causada pelo álcool perfílico.

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

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

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

O método empregado para avaliar a ação do AP sobre a peroxidação lipídica foi a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecido como TBARS.

O princípio deste método baseia-se na utilização de um substrato rico em lipídios (neste caso, foi usada gema de ovo homogeneizada) que sofre a peroxidação lipídica a partir da sua reação com o AAPH, um composto azo gerador

de radicais livres, que sofre decomposição térmica, resultando na formação de nitrogênio molecular e dois radicais carbonos (R), os quais rapidamente reagem com o oxigênio, formando radicais peróxilas ($\text{ROO}\cdot$) (KRASOWSKA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2010). Estes radicais, por sua vez, reagem com os lipídios resultando na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reagem com TBA formando compostos cromóforos que são medidos espectrofotometricamente (ZIN; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2002; FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007; SERAFINI et al. 2011). Substâncias antioxidantes são capazes de prevenir a formação de TBARS. Este método é bastante utilizado para avaliar a atividade antioxidante de vários produtos naturais (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O álcool perílico, em todas as concentrações testadas, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por AAPH, inibindo a quantidade de TBARS formadas em 70%. Resultado semelhante foi obtido com o trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol (vitamina E), que é largamente usado como padrão antioxidante (Gráfico 6). A partir destes resultados, pode-se sugerir que o AP exerce um efeito antioxidante que, provavelmente, protege as biomoléculas lipídicas, essenciais para o funcionamento da membrana celular (SERAFINI et al., 2011).

Outras metodologias bastante empregadas para avaliar a atividade antioxidante de uma substância baseiam-se na capacidade de sequestrar radicais livres, por meio da interação direta de uma substância com moléculas reativas, convertendo os radicais livres em espécies menos reativas e, portanto, mais estáveis (HOELZL et al., 2005; SANTOS, 2011).

A capacidade de uma substância sequestrar $\cdot\text{OH}$ é diretamente relacionada com sua atividade antioxidante, uma vez que impede o dano oxidativo causado por este radical (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHUKLA et al., 2009; SERAFINI et al., 2011). Neste método, o radical $\cdot\text{OH}$ é gerado pela reação de Fenton, na qual o Fe^{2+} reage com H_2O_2 resultando na produção do $\cdot\text{OH}$. Estes radicais atacam o açúcar 2-desoxirribose (usado no método como alvo), degradando-o em uma série de fragmentos, entre eles, o malonaldeído (MDA) que, por sua vez, reage com o TBA, dando origem a um composto cromóforo, medido espectrofotometricamente (HALLIWELL, 1992; MAGALHÃES et al., 2008). Se uma substância sequestradora de $\cdot\text{OH}$ for adicionada ao sistema, ela competirá com o açúcar pela $\cdot\text{OH}$, inibindo a degradação deste alvo e, conseqüentemente, haverá

diminuição dos níveis de MDA quantificados (MAGALHÃES et al., 2008). Contudo, este método possui uma desvantagem, uma vez que muitos antioxidantes também têm propriedade quelante de metais, o que pode alterar a atividade do Fe^{2+} , mascarando, assim, a ação da substância em estudo (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Observando os resultados apresentados é possível sugerir que o AP possui atividade sequestradora de $\bullet OH$, exibindo uma atividade antioxidante significativa que pode ser capaz de inibir os danos celulares causados por este radical. O trolox, droga usada como padrão, também reduziu significativamente a degradação da 2-desoxirribose.

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

Neste estudo, o álcool perílico, nas concentrações testadas, diminuiu significativamente a produção de nitritos, demonstrando sua capacidade sequestradora de $\bullet NO$. É importante ressaltar que o $\bullet NO$ é uma molécula sinalizadora envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive na sinalização da dor. A influência do $\bullet NO$ sobre a transmissão nociceptiva é complexa e contraditória e o exato mecanismo destas ações apresenta controvérsia (MELLER; GEBHART, 1993; SOUSA; PRADO, 2001; KAWANO et al., 2009).

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

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

Estudo anterior mostrou que o efeito antinociceptivo do AP é, principalmente, em nível central (BENEDITO, 2009). Sendo este um monoterpene lipofílico que provavelmente ultrapassa a barreira hematoencefálica, decidimos avaliar se este composto provoca algum tipo de alteração histológica significativa em áreas cerebrais após administração aguda.

Buscou-se observar alterações histopatológicas dos neurônios do hipocampo e corpo estriado como, vacuolização, necrose, atrofia, degeneração e núcleos picnóticos, a fim de identificar uma possível neurotoxicidade causada pelo monoterpene. O álcool perílico provocou apenas alterações teciduais mínimas nas duas áreas estudadas.

O dano neuronal causado por algumas substâncias exógenas está associado, muitas vezes, ao estresse oxidativo, conseqüentemente formação de radicais livres. A atividade antioxidante apresentada pelo AP provavelmente foi determinante na ausência de lesões cerebrais observadas no estudo histopatológico. Resultados semelhantes ocorreram com o sesquiterpene alcoólico farnesol (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2012) e com o diterpene fitol (COSTA et al., 2012).

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, são sugestivos de que o AP apresenta um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opioide e possivelmente por mecanismos antioxidantes, sem a participação direta dos sistemas muscarínico, adenosinérgico, dopaminérgico (D_2), dos canais para K^+_{ATP} e da via L-arginina óxido nítrico. O monoterpene também não apresentou neurotoxicidade significativa.

O álcool perílico vem sendo estudado frente a alguns tipos de neoplasias, inclusive alguns estudos clínicos de fase I e II e tem apresentado resultados bastante satisfatórios (WISEMAN et al., 2007; DE OLIVEIRA, 2010). A dor esta presente na maioria das pessoas que possuem câncer. Uma droga com atividade antineoplásica e antinociceptiva seria de fundamental importância para, além de tratar o processo patológico, promover mais conforto a pacientes acometidos por esse tipo de doença.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- Álcool perílico apresenta um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opioide;
- Apresenta atividade antioxidante *in vitro* nos modelos avaliados;
- Os sistemas muscarínico, adenosinérgico, dopaminérgico (D₂), L-arginina óxido nítrico e os canais de K⁺_{ATP} não participam diretamente do mecanismo de ação do álcool perílico no modelo e condições experimentais avaliados;
- O monoterpeno não apresenta neurotoxicidade significativa nas áreas do hipocampo e corpo estriado.

Perspectivas

9 PERSPECTIVAS

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

- Estudar outros sistemas como o adrenérgico e serotoninérgico que possam estar envolvidos no mecanismo de ação do álcool perílico;
- Investigar o efeito antinociceptivo do álcool perílico por outras vias de administração, como a via oral, intratecal e a intracerebroventricular;
- Utilizar técnicas eletrofisiológicas, como, *single sucrose gap* e *patch-clamp*, que auxiliem na elucidação do mecanismo de ação;
- Realizar estudos de doses repetidas para avaliar o efeito do álcool perílico a longo prazo, bem como, melhor caracterizar possíveis efeitos tóxicos nesse período.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABELSON, K. S.; KOMMALAGE, M.; HOGLUND, A. U. Spinal cholinergic involvement after treatment with aspirin and paracetamol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 16, p. 116-120, 2004.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.
- AHMADI, A.; EBRAHIMZADEH, M. A.; ASHRAIA, S. A.; KARAMI, M.; MAHDAVI, M. R.; SARAVI, S. S. S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 72-79, 2011.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 17, p. 179-188.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; FATURI, C. B.; CATALLANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 77, p. 361-364, 2004.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p. 131-137.
- ALMEIDA, T. F., S. ROIZENBLATT E S. TUFIK. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, p.40-56. 2004.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p.209-215, 2006.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; SMIDERLE, F. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β-Glucan Isolated from *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. **Journal of Pain**, v. 11, p. 965-971, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BALASSIANO, I. T.; DE PAULO, S. A.; SILVA, N. H.; CABRAL, M. C.; GIBALDI, D.; BOZZA, M.; DA FONSECA, C. O.; CARVALHO, M. G. C. Effects of perillyl alcohol in glial C6 cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 10, p. 785-788, 2002.

BARROS, B. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico da espécie *Rhizoctonia solani***. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2010.

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

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

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

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

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

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

BENEDITO, R., B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeneo (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos, Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.

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

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

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

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

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

BOURINET, E.; ALLOUI, A.; MONTEIL, A.; BARRERE, C.; COUETTE, B.; POIROT, O.; PAGES, A.; MCRORY, J.; SNUTCH, T. P.; ESCHALIER, A.; NARGEOT, J. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. **The EMBO Journal**, v. 24, p. 315-324, 2005.

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

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

BRIGNOLA, G.; CALIGNANO, A.; DI ROSA, M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, 1372-1376, 1994.

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

BUREAU, Y. R. J.; PEREDERY, O.; PERSINGER, M. A.; Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380mg/kg) or lithium (3mEq/kg)/pilocarpine (30mg/kg) induced seizures. **Brain Research**, v. 648, 265-269, 1994.

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

CERDA, S. R.; WILKINSON, J.; THORGEIRSDOTTIR, S.; BROITMAN, S. A. R-(1)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased ras and p34cdc2 expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 19-30, 1999.

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

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

CLARK, S. S. Perillyl Alcohol Induces c-Myc-Dependent Apoptosis in Bcr/Abl-Transformed Leukemia Cells. **Oncology**, v. 70, p. 13-18, 2006.

CLARK, S. S.; PERMAN, S. M.; SAHIN, M. B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J. A. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia**, v. 16, p. 213-222, 2002.

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

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 421-428, 2012.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243-254. 2011.

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

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

DE OLIVEIRA, M. M. J. **Avaliação antitumoral do álcool perílico e ácido perílico em células de leucemia mieloide crônica e glioblastoma multiforme**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2010.

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

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

DHAVALIKAR, R. S.; BHATTACHARYYA, P. K. Protein Components of a Cytochrome P-450 Linalool 8-Methyl Hydroxylase. **Indian Journal of Biochemistry**, v. 3 p. 144, 1966.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 193-200, 1995.

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

DUGGAN, A. W.; NORTH, R. A. Electrophysiology of opioids. **Pharmacological Reviews**, v. 35, p. 219-281, 1984.

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

ELEGBEDE, J. A.; FLORES, R.; WANG, R. C. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. **Life Sciences**, v. 73, p.2831-2840, 2003.

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

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81-128, 1991.

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

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

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

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

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.

FREITAS, R. M.; NASCIMENTO, K. G.; FERREIRA, P. M. P.; JORDÁN, J. Neurochemical changes on oxidative stress in rat hippocampus during acute phase of pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 441-445, 2010.

FRITSCHY, J. M.; Lyons, W. E.; Mullen, C. A.; Kosofsky, B. E.; Molliver, M. E., Grzanna, R. Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: a combined anterograde transport and immunohistochemical study. **Brain Research**, v. 437, p. 176-180, 1987.

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

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

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 107, p. 39-48, 2007.

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

GAO, X.; ZHANG, Y. Q.; ZHANG, L. M.; WU, G. C. Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. **Brain Research Bulletin**, v. 54, p. 391-394, 2001.

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

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

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

GULÇIN, I.; ALICI, H. A.; CESUR, M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 281-285. 2005.

HABERBERGER, R. V.; BERNARDINI, N.; KRESS, M.; HARTMANN, P.; LIPS, K. S.; KUMER, W. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. **Autonomic Neuroscience**, v. 113, p. 32-42, 2004.

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

HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 51-58, 1992.

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

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

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

HARPUT, U. S.; ARIHAN, O.; ISKIT, A. B.; NAGATSU, A.; SARACOGLU, I. Antinociceptive, free radical-scavenging, and cytotoxic activities of *Acanthus hirsutus* Boiss, **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 767-774, 2011.

HERNÁNDEZ, A. V.; FÉLIX, R. Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje. **Avance y Perspectiva**, v. 20, p. 83-96, 2001.

HESS, S. **Atividade Antinociceptiva do ácido mirsinoico B**. 2006. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3ª Ed. Massachusetts: Sinauer, 2001. 814p.

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

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

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

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

JAASKELAINEN, S.; RINNE, J. O.; FORSSELL, H.; TENOVUO, O.; KAASINEN, V.; SONNINEN, P.; BERGMAN, J. Role of the dopaminergic system in chronic pain: a fluorodopa-PET-study. **Pain**, v. 90, p. 257-260, 2001.

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

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

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

JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova** v.30, p.382-387, 2007.

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

KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of Tropical Administration of L-arginine on Formalin-induced Nociception in the Mouse: A dual role of peripherally formed nitric oxide in pain modulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, p. 547-550, 1994.

KAWABATA, A.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. L-Arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: Involvement of the kyotorphin-met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, p. 73-79, 1993.

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

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

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

KLAUMANN, P. R.1; WOUK, A. F. P. F.2; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p.1-12, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LOHMANN, A. B.; WELCH, S. P. ATP-gated K⁺ channel openers enhance opioide nociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. **European Journal of Pharmacology**, v. 385, p. 119-127, 1999.

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

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

LOUTRARI, H.; HATZIAPOSTOLOU, M.; SKOURIDOU, V.; PAPADIMITRIOU, E.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. N.; PAPAPETROPOULOS, A. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, p. 568-575, 2004.

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

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

MAGNUSSON, J. E.; FISHER, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D (1) ad D (2) receptors in the dorsolateral striatum. **Brain Research**, v. 855, p. 260-266, 2000.

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

MANSOUR, A.; FOX, C. A.; BURKE, S.; MENG, F.; THOMPSON, R. C.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **Journal of Comparative Neurology**, v.350, p.412-438, 1994.

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

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

MATOS, J. M.; SCHMIDT, C. M.; THOMAS, H. J.; CUMMINGS, O. W.; WEIBKE, E. A.; MADURA, J. A.; PATRICK, L. J. AND CROWELL, P. L. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 194-199, 2008.

McCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

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

MCDONALD, J.; LAMBERT, D.G. Opioid mechanisms and opioid drugs. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 9, p. 33-37, 2009.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Planta Cell**. v.7, p.1015-26, 1995.

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

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

MELZACK, R.; KATZ, J. Pain. **WIREs Cognitive Science**, v. 4, p. 1-15, 2013.

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

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

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

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

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.

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

MERSKY, Y. H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. **Pain Supplement**, v. 3, p.1-226, 1986.

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

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

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

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

MIZOGUCHI, H.; WATANABE, C.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. New vistas in opioid control of pain. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, p. 87-91, 2012.

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

MORAES, D. S. C.; CAMARGO, E. A. Antidepressivos e anticonvulsivos utilizados no tratamento da dor neuropática. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 77, p. 44-47, 1999.

MUROTANI, T.; ISHIZUKA, T.; NAKAZAWA, H.; WANG, X.; MORI, K.; SASAKI, K.; ISHIDA, T.; YAMATODANI, A. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. **Brain Research**, v. 1306, p. 62-68, 2010.

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

NATHAN, A. T.; SINGER, M. The oxygen trail: tissue oxygenation. **British Medical Bulletin**, v. 55, p.96-108, 1999.

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.; BAEYENS, J. M. ATP-dependent K⁺ channel blockers antagonize morphine- but not U-504,88H-induced antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 230, p. 203-207, 1993.

OCANA, M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; BAEYENS, J. M. Subgroups among A-opioid receptor agonists distinguished by ATP-sensitive K⁺ channel-acting drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 1296-1302, 1995.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, W. M.; **BENEDITO, R. B.**; PEREIRA, W. B.; TORRES P. A.; RAMOS, C. A. F.; COSTA, J. P.; TOMÉ, A. R.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27 p. 419-426, 2012.

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

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

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

PASTERNAK, G. W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesis. **Clinical Neuropharmacology**, v. 16, p. 1-18, 1993.

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

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2th ed. New York: Academic Press, 1986.

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

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

PEANA, A. T.; RUBATTU, P.; PIGA, G. G.; FUMAGALLI, S.; BOATTO, G.; PIPPIA, P.; DE MONTIS, M. G. Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sciences**, v. 78, p. 2471-2474, 2006.

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

PHAM, T.; CARREGA, L.; SAUZE, N.; FUND, O.; DEVAUX, C.; PERAGUT, J. C.; SAADJIAN, A.; GUIEU, R. Supraspinal antinociceptive effects of mu and delta agonists involve modulation of adenosine uptake. **Anesthesiology**, v. 987, p. 459-464, 2003.

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

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

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v.57, p.405-424, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS, A. R. S.; GADOTTIA, V. M.; OLIVEIRA, G. L.; TIBOLA, D.; PASZCUKA, A. F.; NETO, A.; SPINDOLA, H. M.; SOUZA, M. M.; RODRIGUES, A. L. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, 1021-1034, 2005.

SANTOS, C. C. M. P. **Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos in vivo e in vitro**. 2011. 124f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2011.

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

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

SAWYNOK, J., LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p. 313-340, 2003.

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

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

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

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

SERAFINI, M. R.; SANTOS, R. C.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, J. P. A.; SANTOS, A. D. C.; ALVES, I. A., GELAIN, D. P.; NOGUEIRA, P. C. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1-8, 2011.

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

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

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais - potencial anti-inflamatório. **Biociência & Desenvolvimento**, p. 38-43. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br>>. Acesso em: 17 fev. 2013.

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

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

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

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

SOUZA, G. H. B.; MELO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. 1ed. Ouro Preto, UFOP, 2012.

STEIN, C.; HASSAN, A. H.; LEHRBERGER, K.; GIEFING, J.; YASSOURIDIS, A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. **Lancet**, v.342, p.321-324, 1993.

Stolfi, C.; Simone, V.; Pallone, F.; Monteleone, G. Mechanisms of Action of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Mesalazine in the Chemoprevention of Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 17972-17985.

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

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

TAO, L.; PEREIRA, M. A. Quantification of carvone, cineole, perillaldehyde, perillyl alcohol and sobrerol by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 71-76, 1998.

TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: Epidemiologia, Fisiopatologia, Avaliação, Síndromes Dolorosas e Tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, p. 406, 2001.

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

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

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

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

VAN DIJKEN, H.; DIJK, J.; VOOM, P.; HOLSTEGE, J.C. Localization of dopamine D₂ receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. **European Journal of Neuroscience**. v. 8, p. 621-628, 1996.

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

WAGNER, J. E.; HU, J. L.; RUST, W. L.; KINGSLEY, K.; PLOPPER, G. E. Perillyl Alcohol Inhibits Breast Cell Migration without Affecting Cell Adhesion. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, p. 136-140, 2002.

WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

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

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

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

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

WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. **World Health Organization**, p. 1-167. 2012.

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p. 1163-1170, 2007.

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

WOOD, P. B. A reconsideration of the relevance of systemic low-dose ketamine to the pathophysiology of fibromyalgia. **Journal of Pain**, v. 7, p. 611-614, 2006.

WOOD, P. B.; SCHWEINHARDT, P.; JAEGER, E.; DAGHER, A.; HAKYEMEZ, H.; RABINER, E. A.; BUSHNELL, M. C.; CHIZH, B. A. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3576-3582, 2007.

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

YAKSH, T. L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P.D.; Melzack, R. (Eds). **Textbook of Pain**, 4 ed. Edinburgo: Elsevier Churchill Livingstone, 2006. p. 371-414.

YAKSH, T. L. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 41, p. 9-111, 1997.

YAKSH, T. L.; MALMBERG, A. B. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: WALL, P. D.; MELZACK, R.; BONICA, J. J. **Textbook of Pain**, 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p.165-196.

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

YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; KIYOZUKA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; KANZAKI, H.; TSUBURA, A. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, p. 251-260, 2004.

ZAKARIA, Z. A.; SULAIMAN, M. R.; SOMCHIT, M. N.; JAIS, A. M.; ALI, D. I. The effects of L-arginine, D-arginine, L-NAME and methylene blue on channa striatus-induced peripheral antinociception in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 199-206, 2005.

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

Anexos

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

BENEDITO, R. B.; PEREIRA, W. B.; TORRES, P. A.; COSTA, J. P.; TOMÉ, A. R.; SÁ, R. C. S.; DE SOUSA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; FREITAS, R. M.; DINIZ, M. F. F. M., ALMEIDA, R. N. Perillyl alcohol: antinociceptive effects and histopathological analysis in brain of rodents. **Neurochemical Research**, 2013 (ARTIGO SUBMETIDO).

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; **BENEDITO, R. B.**; VIEIRA, Y. W.; ULIANA, M. P.; BROCKSOM, T. J.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive Activity of Thymoquinone and its Structural Analogues: A Structure-Activity Relationship Study. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13 (4), p. 605-610, 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, W. M.; **BENEDITO, R. B.**; PEREIRA, W. B.; TORRES P. A.; RAMOS, C. A. F.; COSTA, J. P.; TOMÉ, A. R.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27 p. 419-426, 2012.

OLIVEIRA JUNIOR, W. M.; **BENEDITO, R. B.**; SANTOS, C. C. M. P.; RODRIGUES, L. T. D.; MARINHO, A. F.; MORAIS, L. C. S. L.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Analgesic effect of hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl leaves. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v.10, p. 333-337, 2011.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; SANTOS, C. C. M. P.; **BENEDITO, R. B.**; VIEIRA, Y. W.; ULIANA, M. P.; BROCKSOM, T. J.; ALMEIDA, R. N. Anticonvulsant activity of thymoquinone and its structural analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 21, p. 427-431, 2011.

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

➤ **CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO**

ALMEIDA, R. N., **BENEDITO, R. B.** Potencial Terapêutico de Plantas Medicinais que Atuam no Sistema Nervoso Central In: **PLANTAS MEDICINAIS: GUIA PARA USO RACIONAL** 1ª ed. CURITIBA: EDITORA APPRIS, 2013, v.1, p. 137-162.

➤ **RESUMOS COMUNICADOS EM CONGRESSOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO:**

SANTOS, A. K. F. S.; SIMÕES, S. M. Q.; PEREIRA, W. B.; **BENEDITO, R. B.**; JUNIOR, W. M. D. O.; R. TORRES, P. A.; MORAIS, L. C. S. L. D.; SOUSA, D. P. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, N. Investigation of the possible mechanism of action of antinociceptive activity of Farnesol, **6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, Canelas / RS, 2012.

PEREIRA, W. B.; **BENEDITO, R. B.**; OLIVEIRA JUNIOR, W. M.; TORRES, P. A.; MORAIS, L. C. S. L.; De Sousa, D. P.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF FARNESOL: A CHEMICAL COMPONENT OF SOME ESSENTIAL OILS In: **I Congresso Luso-brasileiro de Patologia Experimental e XI Internacional Symposium on Experimental Techniques**, Recife / PE, 2011.

PEREIRA, W. B.; **BENEDITO, R. B.**; TORRES, P. A.; OLIVEIRA JUNIOR, W. M.; MORAIS, L. C. S. L.; Sousa, D. P.; FREITAS, R. M.; ALMEIDA, R. N. Histopathologic analysis in striatum and hippocampus of mice treated acutely with sesquiterpene

farnesol in: **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE**, Rio de Janeiro / RJ, 2011.

BENEDITO, R. B.; LIMA, M. R. V.; PEREIRA, W. B.; NOBREGA, F. F. F.; MORAIS, L. C. S. L.; De Sousa, D. P.; ALMEIDA, R. N. Avaliação comparativa de sete análogos estruturais do mentol quanto à atividade antinociceptiva In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

RAMOS, C.A.F.; SÁ, R. C. S.; **BENEDITO, R. B.**; ALMEIDA, R. N. Avaliação histopatológica da injúria hepática experimental induzida pelo tratamento crônico de ratos com o D-limoneno In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

PEREIRA, W. B.; **BENEDITO, R. B.**; LIMA, M. R. V.; NOBREGA, F. F. F.; MORAIS, L. C. S. L.; De Sousa, D. P.; ALMEIDA, R. N. Efeito antinociceptivo do monoterpene (S)-(-)-Álcool perílico em camundongos In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

RAMOS, C. A. F.; NOBREGA, F. F. F.; **BENEDITO, R. B.**; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N. Efeitos Comportamentais decorrentes do tratamento crônico com D-Limoneno em ratos no teste do campo aberto ("Open-field") In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

BENEDITO, R. B.; LIMA, M. R. V.; PEREIRA, W. B.; De Sousa, D. P.; MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N. Estudo comparativo da atividade antinociceptiva do Mentol, Neoisopulegol, Isopulegol e 9-mentenol In: **V Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, Aracaju / SE, 2010.

FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P. R. R.; **BENEDITO, R. B.**; NOBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N.; MORAIS, L. C. S. L. Estudo psicofarmacológico do extrato etanólico de *Sida Galheirensis* In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

BENEDITO, R. B.; LIMA, M. R. V.; PEREIRA, W. B.; De Sousa, D. P.; MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N. Investigação da atividade antinociceptiva do álcool perílico em camundongos In: **V Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, Aracaju / SE, 2010.

MOTA V. G.; **BENEDITO, R. B.;** LIMA, M. R. V.; MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N. Investigação de possível efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Lippia microphylla* (Verbenaceae) em camundongos In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa / PB, 2010.

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

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

➤ **ATIVIDADES EXTRAS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO:**

- Membro da comissão organizadora do **I CURSO E CONFERÊNCIAS EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO**, promovido pelos laboratórios de Percepção, Neurociências e Comportamento/CCHLA, Laboratório de Processamento Linguístico/CCHLA, Laboratório de Psicofarmacologia/CCS e Laboratório de Tecnologia farmacêutica/CCS, colaboração da PRAC/COP/ período de 19 a 23 de julho de 2010.
- Professor Substituto do Departamento de Fisiologia e Patologia (DFP) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB nas disciplinas de **Fisiologia Humana e Parasitologia**.