



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**RANGEL RODRIGUES BOMFIM**

**EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E  
ANTINOCICEPTIVO DO ISOPROPÓXI-CARVACROL  
EM ROEDORES**

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2013**

**RANGEL RODRIGUES BOMFIM**

**EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DO  
ISOPROPÓXI-CARVACROL EM ROEDORES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Enilton A. Camargo

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

B695e Bomfim, Rangel Rodrigues  
Efeitos antioxidante, anti-inflamatório e antinociceptivo do isopropóxi-carvacrol em roedores / Rangel Rodrigues Bomfim ; orientador Enilton A. Camargo. – São Cristóvão, 2013.  
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) –  
Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Monoterpenos. 2. Isopropóxi – Carvacrol. 3. Antinociceptivo.  
4. Agentes anti-inflamatórios. I. Camargo, Enilton A., orient. II.  
Título.

CDU 615.276

**RANGEL RODRIGUES BOMFIM**

**EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DO  
ISOPROPÓXI-CARVACROL EM ROEDORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFS, como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Aprovado em: 11 de março de 2013

---

1° Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

---

2° Examinador: Prof. Dr. Josemar Sena Batista

---

3° Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto V. dos Santos

## AGRADECIMENTOS

- **DEUS**
- Minha Família (mãe, irmãos, tios, tias, primos, sobrinhos)
- Ao meu orientador Prof. Dr. Enilton A. Camargo
- Aos membros da banca (Prof. Dr. Josemar Sena Batista e Prof. Dr. Márcio Roberto V. dos Santos)
- Orientadores de iniciação científica
- Aos amigos do LAFAPI-UFS
- Amigos e Professores do Procfis
- Amigos e Professores da Graduação
- Amigos da ETF-SE
- Colaboradores da UFAL (Prof. Dr. Emiliano Barretto de Oliveira e seus alunos)
- CAPES/Fapitec

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	1
1.2 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO: VASODILATAÇÃO, FORMAÇÃO DE EDEMA E MIGRAÇÃO CELULAR.....	2
1.3 A DOR INFLAMATÓRIA E SEUS MEDIADORES .....	5
1.4 ANTIOXIDANTES .....	7
1.5 MONOTERPENOS E ISOPROPÓXI-CARVACROL (IPC) .....	9
2.0 OBJETIVOS .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 ANIMAIS.....	13
3.2 OBTENÇÃO DO ISOPROPÓXI-CARVACROL.....	13
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO IPC .....	13
3.3.1 ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	14
3.3.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO.....	14
3.4 AVALIÇÃO FARMACOLÓGICA .....	15
3.4.1 TESTE DA FORMALINA .....	15
3.4.2 MEDIDA DA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA NA PATA DE CAMUNDONGOS.....	15
3.4.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS NO CAMPO ABERTO.....	16
3.4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA. ....	17
3.4.5 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO 12-O-TETRADECANOILFORBOL- ACETATO (TPA) E DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE.....	17
3.4.6 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	18
3.4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR BROMETO DE 3-[4,5- IMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENIL TETRAZÓLIO (MTT) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS .....	19
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
4 RESULTADOS.....	20

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO IPC .....	20
4.1.1 ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE ÓXIDO NÍTRICO PELO IPC.....	20
4.1.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO.....	21
4.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO IPC.....	22
4.2.1 EFEITO DO IPC NO TESTE DA FORMALINA.....	22
4.2.2 EFEITO DO IPC NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA ...	23
4.2.3 EFEITO DO IPC SOBRE A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DE CAMUNDONGOS NO CAMPO ABERTO .....	24
4.2.4 EFEITO DO IPC NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.	24
4.2.5 EFEITO DO IPC NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA E ATIVIDADE DE MPO.....	26
4.2.6 EFEITO DO IPC NA PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA .....	27
4.2.7 EFEITO DO IPC NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT.....	29
5 DISCUSSÃO .....	30
6 CONCLUSÃO .....	38
7 REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFS.....	54

## RESUMO

### **Efeitos antioxidante, anti-inflamatório e antinociceptivo do isopropóxi-carvacrol em roedores. Rangel Rodrigues Bomfim, UFS, São Cristóvão, 2013.**

Estudos anteriores mostraram que monoterpenos podem exercer ações farmacológicas importantes. O isopropóxi-carvacrol (IPC) é um novo derivado sintético do monoterpeno carvacrol e suas propriedades farmacológicas ainda não foram investigadas. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva do IPC. A atividade antioxidante (in vitro) foi avaliada através da determinação da atividade sequestradora de óxido nítrico e da dosagem da peroxidação lipídica induzida por  $\text{FeSO}_4$  ou  $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  em lipossomas. Para a avaliação in vivo, camundongos (25-30 g) e ratos (150-230 g) receberam administração de IPC nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg ou veículo (Tween 80, 0,5%), pela via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes dos agentes flogísticos. Para determinação do edema de orelha e atividade de mieloperoxidase os camundongos receberam administração tópica nas doses de 0,3, 1 ou 3 mg/orelha, no momento da indução do edema de orelha. Os parâmetros nociceptivos observados foram o tempo de labida/mordida após injeção de formalina e a hiperalgesia após administração de carragenina, ambas na pata de camundongos. Como parâmetros inflamatórios foram avaliados o edema de pata induzido por carragenina em ratos, o edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA) em camundongos (acompanhado da atividade da enzima mieloperoxidase nestas orelhas) e a migração de leucócitos induzida por carragenina para a cavidade pleural de camundongos. Além disso, foram avaliados a atividade deambulatoria de camundongos em campo aberto e a citotoxicidade do IPC em macrófagos peritoneais murinos. Os resultados obtidos mostraram que o IPC apresentou atividade antioxidante em concentrações variando entre 100 pg/mL e 100 µg/mL. No teste da formalina o IPC reduziu o tempo de lambida da pata na 1ª fase, na dose de 100 mg/kg e na 2ª fase com as doses de 30 e 100 mg/kg, quando comparado com o grupo tratado com veículo. Na avaliação da hiperalgesia induzida por carragenina, apenas a dose de 100 mg/kg de IPC, foi capaz de reduzir o limiar de nocicepção nos tempos de 1 e 3 h após a indução, quando comparado ao grupo veículo. Além disso, a administração de IPC não afetou a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Em ratos, a administração de IPC na dose de 100 mg/kg promoveu uma redução no edema de pata induzido por carragenina, quando comparado com o grupo veículo. Na orelha de camundongos não foi observado efeito antiedematogênico pela administração local de IPC, contudo, houve redução da atividade de mieloperoxidase nas orelhas, nas doses de IPC utilizadas (0,3–3,0 mg/orelha). Na pleurisia induzida por carragenina, a dose de 100 mg/kg reduziu o número de leucócitos totais e de mononucleares na cavidade pleural, quando comparado com o grupo tratado com veículo, sem alterar as contagens de polimorfonucleares. Além disso, o IPC não causou redução na viabilidade celular de macrófagos peritoneais nas concentrações testadas (0,1-100 µg/mL). Estes resultados demonstram que o IPC possui atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, servindo de base para estudos futuros que visem investigar os mecanismos envolvidos nesses efeitos farmacológicos e podendo contribuir para o desenvolvimento de novas substâncias para o tratamento da inflamação e da dor.

**Descritores:** Monoterpenos, isopropóxi-carvacrol, inflamação, nocicepção, estresse oxidativo.



## ABSTRACT

### **Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of isopropoxy-carvacrol in rodents. Rangel Rodrigues Bomfim, UFS, São Cristóvão, 2013.**

Previous studies have shown that monoterpenes, compounds mainly presented in essential oils, as well as some synthetic derivatives, have important pharmacological actions. Isopropoxy-carvacrol (IPC) is a new synthetic derivative, which was obtained from carvacrol and its pharmacological properties have not yet been investigated. The aim of this study was to analyze the antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of IPC. In order to investigate the antioxidant activity, the nitric oxide scavenger activity and the inhibitory effect on the lipid peroxidation induced by  $\text{FeSO}_4$  or  $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  in liposome preparation were measured *in vitro*. For the *in vivo* evaluation, mice (25-30 g) and rats (150-230 g) were used. These animals received the administration of IPC at the doses of 10, 30 or 100 mg/kg or vehicle (Tween 80, 0.5%) by the intraperitoneal route (i.p.), 30 minutes before the experiments, or at the doses of 0.3-3 mg/ear, applied topically during the induction (in the case of mice ear edema test). The nociceptive parameters evaluated were the licking/biting time induced by formalin and the hyperalgesia induced by carrageenan, both injected in the mice paw. The inflammatory parameters evaluated were the rat paw edema induced by carrageenan, the mice ear edema induced by TPA (accompanied by the myeloperoxidase activity measurement in the ears) and leukocyte migration induced by carrageenan to the mice pleural cavity. We also assessed the locomotor activity of mice in the open field and the cytotoxicity of IPC in murine peritoneal macrophages. As the results of this study, IPC showed antioxidant activity in concentrations varying from 100 pg/mL to 100  $\mu\text{g/mL}$ . Additionally, the pre-treatment with IPC reduced the licking/biting time of the mice paws, both in the first and second phases of the formalin-induced nociception, respectively at the doses of 100 mg/kg or 30 and 100 mg/kg, when compared with the vehicle-treated group. In the assessment of carrageenan-induced hyperalgesia, the dose of 100 mg/kg of IPC was able to reduce the nociceptive threshold response at the time points of 1 h and 3 h after induction, when compared with the vehicle group. Besides, the administration of IPC did not affect the locomotor activity of mice in the open field test. In rats, the administration of IPC at the dose of 100 mg/kg significantly diminished the carrageenan-induced paw edema, when compared with the vehicle group. No antiedematogenic effect was observed by the local administration of IPC in the TPA-induced mice ear inflammation test, however, the myeloperoxidase activity was significantly decreased in the ears by the simultaneous application of IPC (0.3, 1 or 3.0 mg/ear). In the mice pleurisy induced by carrageenan, the dose of 100 mg/kg of IPC significantly reduced the number of total leukocytes and mononuclear cells found in the pleural cavity, when compared with the vehicle treated group, without altering the number of polymorphonuclear cells. Moreover, the IPC concentrations ranging from 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$  did not affect the peritoneal macrophages viability. These results demonstrate that IPC has antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities, which enable future studies directed to the investigation of the mechanisms underlying the pharmacological effects of IPC and may contribute for the development of new drugs for the treatment of inflammation and pain.

**Keywords:** monoterpene, isopropoxy-carvacrol, inflammation, nociception, oxidative stress.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Mecanismo simplificado da migração celular na inflamação.....	04
Figura 2: Estruturas químicas de monoterpenos.....	11
Figura 3: Aparatos do Von Frey eletrônico.....	16
Figura 4: Atividade sequestradora de óxido nítrico pelo IPC in vitro.....	20
Figura 5: Efeito do IPC na produção de TBARS in vitro.....	21
Figura 6: Efeito do IPC e controles na 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> fase do teste da formalina.....	22
Figura 7: Efeito do IPC na hiperalgesia mecânica em camundongos.....	23
Figura 8: Efeito do IPC na atividade exploratória de camundongos no campo aberto	24
Figura 9: Efeito do IPC no edema de pata induzido por carragenina.....	25
Figura 10: Efeito do IPC no edema de orelha induzido por TPA.....	26
Figura 11: Efeito do IPC sobre a migração de leucócitos na pleurisia.	28
Figura 12: Ausência citotoxicidade do IPC em macrófagos peritoneais murinos	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH : 2,2-azobis-2-metilpropionamida  
AAS : ácido acetilsalicílico  
ASC : área sob a curva  
ATP : adenosina trifosfato  
CAT: catalase  
CEPA: Comitê de Ética em Pesquisa Animal  
CGRP : peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
COX : ciclo-oxigenase  
EDTA : ácido etilenodiaminotetracético  
ERN : espécies reativas de nitrogênio  
ERO: espécies reativas de oxigênio  
HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio  
IASP: Associação Internacional para Estudo da Dor  
IL: interleucina  
i.p. : intraperitoneal  
i.pl.: intrapleural  
IPC: isopropóxi-carvacrol  
iNOS: óxido nítrico sintase induzível  
LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>  
MDA: malondialdeído  
MPO: mieloperoxidase  
NO: óxido nítrico  
PAF: fator de agregação plaquetária  
PG: prostaglandina(s)  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina  
PKA: proteína quinase A  
PKC: proteína quinase C  
PMN: polimorfonucleares  
s.c. : subcutânea  
SNC: sistema nervoso central  
SOD : superóxido dismutase

SP: substância P

s.pl.: subplantar

TBA : ácido tiobarbitúrico

TBARS : substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TNF- $\alpha$  : fator de necrose tumoral -  $\alpha$

UMPO: unidades de mieloperoxidase

v.o. : via oral

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN et al., 2006; WARD, 2010). Este processo pode ser entendido como um mecanismo de defesa do organismo, permitindo abrir caminhos para os processos de reparação, como a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (TIZARD, 2002). Apesar de extremamente necessário, este processo poderá em determinadas situações ser exacerbado, levando a efeitos deletérios (GILMAN et al., 2006; WARD, 2010). Assim, a inflamação envolve as várias mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados, como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas.

A inflamação pode ser classificada em aguda e crônica, em que a primeira tem duração relativamente curta por apresentar-se em um período de minutos, horas ou dias e a segunda em um período longo, de meses ou anos (BAUMANN; GAULDIE, 1994). A fase aguda do processo inflamatório pode ser caracterizada por sinais cardinais descritos por Cornelius Celsius desde 30 A.C., que incluem rubor, tumor, calor e dor, além da perda de função, um quinto sinal que foi acrescentado por Virchow (1821-1902) (ROCHA E SILVA, 1978). Esses sinais são causados como consequência das alterações vasculares e celulares na microcirculação da área lesada, por conta da liberação de vários mediadores químicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005)

Por sua vez, a inflamação crônica está associada, em seus aspectos histológicos, à presença, no local lesado, de linfócitos e macrófagos, além da proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose (GILROY et al., 2004; WARD, 2010), sendo que alguns leucócitos são capazes de liberar citocinas, que vão contribuir para a migração de novas células para o local da lesão (RIBEIRO et al., 2000). Todas as etapas envolvidas no processo inflamatório têm por objetivo principal, sobretudo na inflamação aguda, limitar e/ou remover o agente causador e reparar o tecido lesado (KUMAR et al., 2004; WARD, 2010). A magnitude da resposta inflamatória é importante, pois uma resposta

insuficiente resulta em uma defesa inadequada, o que pode levar à infecção ou ao câncer, assim como uma resposta exacerbada pode causar morbidade e mortalidade, como na artrite reumatóide, na doença de Alzheimer, na aterosclerose, no diabetes, no choque séptico, entre outras doenças (TRACEY, 2002).

No que concerne ao tratamento de desordens inflamatórias tem-se hoje um grande arsenal terapêutico, como exemplo, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) que constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética eficazes. Entretanto, a frequência dos efeitos adversos descritos por pacientes que fazem uso dessa classe medicamentosa é alta (BJORKMAN, 1996; WALLACE, 1997). Estes agentes são eficazes na maioria dos casos, mas os efeitos colaterais são comuns, especialmente quando são utilizados cronicamente. O efeito colateral mais comum são os distúrbios gastrointestinais (BJORKMAN, 1996; WALLACE, 1997; SCARPIGNATO; HUNT, 2013). Dessa forma pode-se afirmar que ainda não dispomos do fármaco anti-inflamatório ideal, com efeitos indesejáveis mínimos e que seja realmente eficaz nos transtornos inflamatórios, o que fomenta a busca por moléculas inovadoras com potencial anti-inflamatório.

## 1.2 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO: VASODILATAÇÃO, FORMAÇÃO DE EDEMA E MIGRAÇÃO CELULAR

Entre os vários fatores que caracterizam o processo inflamatório agudo encontra-se a vasodilatação, que é capaz de fornecer um maior aporte sanguíneo ao sítio inflamado e que objetiva aumentar a eficácia da ação dos agentes de defesa. Aliada a esta vasodilatação, pode ocorrer o aumento da permeabilidade vascular, com o consequente extravasamento de fluidos (HENSEN, 2005). Estas alterações levam ao acúmulo de líquido e proteínas (LAUPATTARAKEN et al., 2003) e são importantes para a formação de edema inflamatório.

O edema caracteriza-se como o acúmulo de líquido no interstício ou em cavidades do organismo, podendo ser localizado ou sistêmico e, de acordo com sua composição, pode ser definido como transudato ou exsudato (ALLER et al., 2007). Quando o líquido extravasado possui baixa densidade e teor de proteínas, como

consequência da preservação da permeabilidade vascular, tem-se o transudato (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Por sua vez, o exsudato é um líquido com alta densidade e teor de proteínas e pode implicar na presença de processo inflamatório acompanhado de aumento da permeabilidade vascular, como resultado da liberação de mediadores inflamatórios (BARAK; KATZ, 2005).

A exsudação plasmática é um evento inicial do processo inflamatório, que é dependente do aumento da permeabilidade vascular e ocorre principalmente nas vênulas, pelo estímulo de histamina e outros mediadores, quando há lesões de menor intensidade e no endotélio, quando a lesão é de maior intensidade (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). O extravasamento das proteínas plasmáticas durante a exsudação eleva a pressão oncótica intersticial, favorecendo a retenção de líquido fora dos vasos, acarretando o aumento da hidrofilia local (ALLER et al, 2006). Assim, o edema ocorre principalmente no espaço extravascular, devido ao extravasamento de líquido que ocorre para os espaços intersticiais por meio dos capilares e pela incapacidade dos vasos linfáticos drenarem esta grande demanda (KUMAR et al., 2004).

Aliado à vasodilatação e formação de edema, os mediadores inflamatórios contribuem para a migração de leucócitos para o local do tecido lesado para reagir contra o agente responsável pela agressão tecidual (GRONEBERG et al., 2003). Estes leucócitos sofrem marginação, processo pelo qual são deslocados à margem do vaso por causa do direcionamento centralizado de eritrócitos nos vasos sanguíneos, o que permite a migração para o foco inflamatório extravascular, orientados por mediadores químicos produzidos na região lesada, num processo chamado de quimiotaxia (LUSTER et al., 2005; OKAYAMA; KAWAKAMI, 2006; Figura 1). Uma vez que alcançam o foco inflamado, estas células podem cumprir sua função, realizando fagocitose dos patógenos e degradando tecido necrótico e outros antígenos (NIGROVIC; LEE, 2005). Associado a estes processos, os leucócitos que migraram podem contribuir para a lesão tecidual, pois podem induzir à formação de mediadores e radicais livres, podendo prolongar a inflamação (FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004).

De maneira geral, todos os leucócitos respondem aos agentes quimiotáticos com níveis diferenciados de velocidade, sendo esta resposta mais eficaz para os granulócitos e monócitos e, em menor grau, para os linfócitos (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005). A migração de leucócitos para os sítios inflamatórios e a sua presença como células

residentes em tecidos representa um importante mecanismo na defesa do organismo contra agentes agressores. Dentre os leucócitos residentes em tecidos, os macrófagos são células chave para a defesa contra agentes invasores, pois são capazes de sintetizar várias substâncias quimiotáticas, como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (MACMILLIAN; FOSTER, 1988) e citocinas como a interleucina (IL)-1 $\beta$  (CYBULSKY; COLDITZ; MOVAT, 1986), e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MING; BERSANI; MANTOVANI, 1987).

A ação das citocinas e outros mediadores quimiotáticos regula o processo de quimiotaxia, desde a adesão dos leucócitos ao endotélio até sua migração para fora da luz vascular em direção ao foco inflamado, orientada por um gradiente de concentrações crescentes dessas substâncias (WILKINSON, 1994; WARD et al., 2010). A primeira fase consiste na adesão fraca de leucócitos ao endotélio, o que permite o rolamento destas células sobre o endotélio, etapa que envolve a expressão de selectinas (L-selectinas em leucócitos, E-selectinas e P-selectinas em células endoteliais) (Figura 1). Como a interação entre essas moléculas de adesão é fraca, não permite que leucócitos possam migrar para o compartimento extravascular. A adesão firme ao endotélio ocorre com a ativação de proteínas da família das integrinas leucocitárias, que interagem com as moléculas de adesão intercelulares (ICAM) 1 e 2 (Figura 1) e permite a posterior travessia do leucócito pela barreira de células endoteliais, chamada de diapedese ou transmigração.

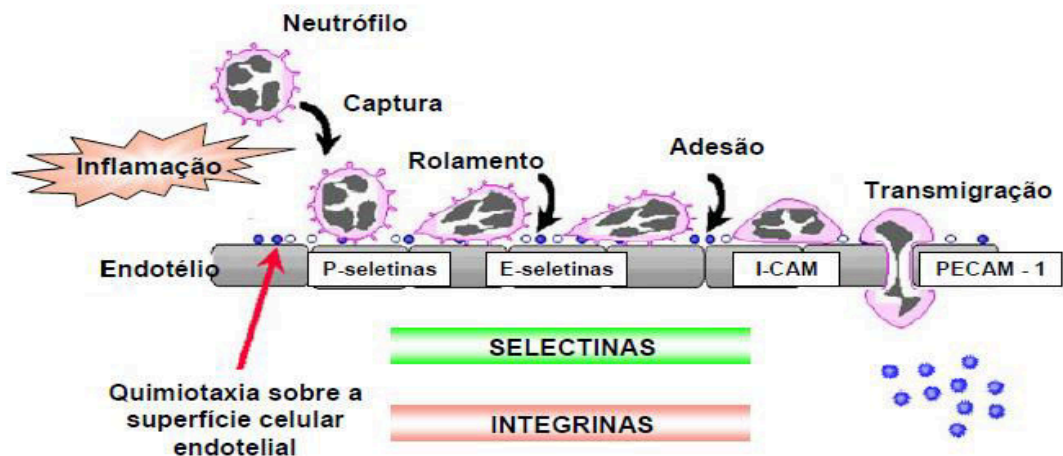


Figura 1: Mecanismo simplificado da migração celular no processo inflamatório. Adaptado de SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY (2004) por BOLLER, (2007).



Dessa forma, a quimiotaxia de leucócitos durante a resposta inflamatória é um processo que envolve interações entre moléculas de adesão presentes nas superfícies dos leucócitos e das células endoteliais, que são específicas e complementares (CRONSTEIN; WEISSMANN, 1993). A regulação da expressão dessas moléculas é ordenada fisiologicamente para otimizar o processo de migração, principalmente por aumentar a eficiência do reconhecimento e da interação neutrófilo/endotélio. Estes fatores demonstram que a migração de neutrófilos é um processo multimediado, que conta com a ação de vários mediadores liberados no foco inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

### 1.3 A DOR INFLAMATÓRIA E SEUS MEDIADORES

Além do papel sobre a formação de edema e migração de leucócitos, vários mediadores inflamatórios podem contribuir para a indução da dor. Este é um fenômeno complexo que envolve não somente a transmissão do estímulo nocivo da periferia ao córtex, mas, também, todo o processo cognitivo e emocional que ocorre no cérebro. É importante observar que há uma diferença conceitual entre os termos nocicepção e dor; o primeiro refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo lesivo, enquanto o segundo envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração dos impulsos sensoriais (MILLAN, 2002; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

A dor decorrente de processos inflamatórios é resultante de alterações funcionais em neurônios aferentes primários (nociceptores), que possuem seus corpos celulares no gânglio dorsal, próximos da medula espinhal (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988). Dessa maneira, a dor ocorre como consequência da interação entre os componentes do tecido danificado e os neurônios sensoriais periféricos que expressam receptores para muitos dos mediadores inflamatórios (BASBAUM et al., 2009). Em uma situação de dor inflamatória observa-se que as células danificadas após o comprometimento tecidual liberam, no local da lesão, ATP e prótons que, juntamente com a bradicinina derivada do plasma, vão produzir efeitos excitatórios. Concomitantemente haverá liberação pelos mastócitos de aminas (5-hidroxitriptamina e histamina) e também ocorre liberação de metabólitos do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas (COUTAUX et al.,

2005). Essas substâncias alteram o limiar das terminações nervosas ao estímulo térmico e mecânico (GRUBB, 1998). Além disso os macrófagos migram para o local da lesão onde liberam citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), e fatores de crescimento (COSTIGAN; WOOLF, 2000). A participação das fibras aferentes primárias no processo se dá pela liberação de neuropeptídeos, tais como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (COSTIGAN; WOOLF, 2000; COUTAUX et al., 2005).

Conforme supracitado, a dor inflamatória exige a participação de diversos mediadores, esses mediadores inflamatórios originam-se do plasma, onde estão em formas precursoras, ou de células onde são sintetizados e eliminados em decorrência de determinados estímulos (RYAN; MAJNO, 1977). Dentre esses mediadores pode-se citar a bradicinina, que induz a ativação de nociceptores (GOMEZ et al., 2011). Os mediadores inflamatórios produzidos são capazes de atuar de forma sinérgica e causar alterações no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, de forma a aumentar a sensibilidade dos nociceptores de elevado limiar e, com isso, reduzir o limiar de percepção do estímulo doloroso e causando a intensificação da resposta a estímulos nociceptivos supralimiais (hiperalgesia) (MEYER; CAMPBELL; RAJAS, 1994). Pode-se também observar alodínia, que é uma sensação dolorosa diante de estímulos inócuos (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008), ou ainda, quando não se pode afirmar que um referido estímulo ativa nociceptores (SANDKUHLER, 2009).

Dentre os mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório, talvez os que tenham sido mais extensivamente estudados na nocicepção inflamatória são os metabólitos da ciclo-oxigenase (COX) (principalmente prostaglandina E<sub>2</sub> e prostaciclina; PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, respectivamente) e as aminas simpáticas (noradrenalina, adrenalina e dopamina), que interagem com os seus respectivos receptores acoplados a proteínas G (RANG et. al., 2011). Além dos mediadores acima citados, as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  também merecem destaque na dor inflamatória. Segundo Mc Dermott (2001), o TNF- $\alpha$  é o protótipo de citocina pró-inflamatória em virtude de sua capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos. Essa citocina, juntamente com a IL-1 $\beta$ , pode promover um aumento da expressão da COX-2 e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (WOOLF et al., 1997).

Em humanos, nas doenças que cursam com processo inflamatório agudo ou crônico, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) participam de uma série de respostas do organismo, tais como: febre, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de corticosteróides, alteração da atividade cerebral das monoaminas e hiperalgesia (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). Em animais experimentais foi definida a liberação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela liberação/produção de prostaglandinas e aminas simpáticas, que são considerados os mediadores finais. A administração de carragenina, por via intraplantar, induz a produção de bradicinina, que estimula a liberação de TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  induz a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , que estimulam a formação de produtos da ciclo-oxigenase através da indução enzimática da COX-2, resultando principalmente na produção de PGE<sub>2</sub> (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993a; FERREIRA et al., 1993b; CUNHA et al., 2005).

Além das citocinas e outros autacóides mencionados anteriormente, é preconizado um papel importante para os radicais livres na indução e manutenção do processo inflamatório, sendo capazes, desta forma, de contribuir para a indução da hiperalgesia (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SZABÓ et al., 2007, GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

#### 1.4 ANTIOXIDANTES

Substâncias com atividade antioxidante são preconizadas há muito tempo como promotores de melhora do estado de saúde em condições patológicas como a inflamação, embora existam muitas controversas e muitos antioxidantes ainda necessitem de mais estudos para a comprovação dos seus efeitos benéficos para a saúde humana (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Os antioxidantes são substâncias que neutralizam os radicais livres, prevenindo os danos causados pela reação dos mesmos com diversos alvos biológicos (AZZI; DAVIES; KELLY, 2004). Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Os radicais livres que possuem o elétron desemparelhado centrados no átomo de oxigênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO), quando está centrado no átomo de nitrogênio ou cloro são denominados,

respectivamente, espécies reativas de nitrogênio (ERN) ou de cloro (ERC) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Estas espécies são geradas principalmente nas células aeróbicas como subprodutos de uma série de reações metabólicas e são rapidamente removidas por sistemas antioxidantes existentes na própria célula (URUÑUELA et al., 2002), dentre esses sistemas antioxidantes pode-se citar as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Existem três tipos de SOD: citosólica, mitocondrial e extracelular e essas enzimas catalisam a dismutação de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Por sua vez, a CAT ocorre abundantemente no corpo, com a atividade mais elevada no fígado, eritrócitos e pulmões (MCCORD, 1986).

Se a capacidade desses sistemas for superada desenvolve-se o estresse oxidativo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004), que provoca distúrbios na homeostase celular. As várias espécies de radicais livres podem causar alterações bioquímicas e funcionais em diferentes níveis celulares, como lipoperoxidação das membranas celulares o que pode promover a perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas da célula para o espaço extracelular, e até mesmo sua ruptura (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; DAMASCENO et al., 2002). Além disso, pode ocorrer oxidação de proteínas ou danos aos ácidos nucleicos, desoxirribonucléico (DNA) (ZHARKOV, 2013). Estas consequências do estresse oxidativo podem ser importantes para o desenvolvimento de muitas doenças, como se observa na doença de Alzheimer, câncer e aterosclerose (BADARINATH et al., 2010)

Um dos alvos dos antioxidantes é o radical óxido nítrico (NO), que é uma molécula endógena envolvida em inúmeros eventos, como por exemplo, na manutenção da dinâmica vascular pelo seu efeito vasorelaxante, na modulação negativa da expressão de moléculas de adesão (KUBES, 1991), no processamento da dor a nível medular (FAN et al., 2012), na modulação da produção de prostaglandina E<sub>2</sub> em câncer oral (KORDE et al., 2012), na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias (KOBAYASHI, 2010) e na nocicepção orofacial (FAN, et al., 2012), dentre outros. Em altas concentrações o NO pode reagir com o ânion superóxido produzindo o peroxinitrito (PELUFFO; RADI, 2007), aumentando o estado de estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica, desestabilidade nas membranas, oxidação e nitração de

proteínas e danos ao DNA (ROBINSON, 2001; VIRÁG et al., 2003; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RAD, 2007). Ataques promovidos por espécies reativas de oxigênio, como o peroxinitrito, às membranas produzem vários aldeídos, a exemplo do malondialdeído (MDA), que é o principal aldeído liberado pelas membranas das células (URUÑUELA et al., 2002). Essa substância pode ser determinada através de reações com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e constitui um dos principais marcadores biológicos desse tipo de lesão em membranas celulares (DRAPER; HADLEY, 1990; BADARINATH et al., 2012).

Substâncias que sequestram o radical óxido nítrico podem desempenhar um importante papel citoprotetor, agindo nos processos de toxicidade induzida por espécies reativas de nitrogênio (RNS), modulando os processos inflamatórios, diminuindo o estado de estresse oxidativo e podendo apresentar-se como alternativa terapêutica para algumas dessas desordens (SAHA et al., 2006).

Dessa forma, compostos que sejam capazes de reduzir as lesões oxidativas induzidas pelos diversos radicais livres, como o NO, podem ser importantes como auxiliares na promoção da saúde e há vários anos tem-se buscado estas substâncias em fontes naturais e sintéticas. Dentre as fontes naturais, os flavonóides e os terpenos são classes de compostos que apresentam esta atividade (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; GRABMANN, 2005), além de influenciarem no desenvolvimento de resposta inflamatória (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ et al., 2013) e nociceptiva (SOUSA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2013), tendo assim potencial para o tratamento de várias doenças.

### 1.5 MONOTERPENOS E ISOPROPÓXI-CARVACROL (IPC)

Os monoterpenos pertencem a um grupo grande e diverso de compostos químicos chamados de terpenos e são representantes de uma classe de compostos orgânicos de ocorrência natural cuja estrutura química consiste de duas unidades isoprênicas ligadas entre si, onde cada unidade isoprênica é formada por 5 carbonos (BAKKALI et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória de alguns monoterpenos, tais como  $\alpha$  ou  $\beta$ -pineno, carvacrol,  $\alpha$ -terpineol, e citronelol, dentre outros (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ;

ANDRADE; SOUSA, 2013; GUIMARÃES et al., 2013; BRITO, et al., 2012). Recentemente, foi descrito que a hidróxi-di-hidrocarvona, um derivado sintético pertencente a esta classe, possui atividade anti-inflamatória, na medida em que reduz o edema de pata de rato e o influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, ambos induzidos pela carragenina (DE SOUSA et al., 2010). Oliveira et al. (2008) descreveram previamente que este composto também possui apreciável atividade antinociceptiva periférica e central.

De maneira geral, os monoterpenos possuem um potencial terapêutico para tratar a inflamação e a dor, através de mecanismos que não são totalmente compreendidos. Contudo, existem evidências de que alguns destes compostos sejam capazes de inibir a via de sinalização intracelular do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), uma via pleiotrópica envolvida nas repostas imune e inflamatória (SALMINEN et al., 2008), o que reforça seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo. Este mecanismo poderia levar a diminuição da expressão da COX-2, da iNOS e de citocinas inflamatórias, além de vários outros efeitos induzidos pela translocação do NF- $\kappa$ B para seu sítio de ligação no DNA (KARIN; GRETEN, 2005; PERKINS, 2007).

Dois monoterpenos conhecidos por suas ações farmacológicas são o 1,8-cineol (figura 2A) e o carvacrol (figura 2B). O 1,8-cineol pode ser encontrado no óleo essencial de muitas plantas como o eucalipto (*Eucalyptus globulus*), que popularmente é utilizado para tratar doenças respiratórias (SANTOS et al., 2004). Na colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico, o efeito anti-inflamatório do 1,8-cineol foi observado em ratos que foram pré-tratados com doses de 200 e 400 mg/kg dessa substância, além disso, também foi observado redução no infiltrado de neutrófilos (SANTOS et al., 2004). Também foi demonstrado que animais tratados com doses de 1,8-cineol (100, 200 ou 400 mg/kg) apresentaram redução do edema de pata induzido por carragenina (SANTOS e RAO, 2000). Quanto a atividade antinociceptiva, foi relatado que o 1,8-cineol reduziu a resposta nociceptiva em vários testes comportamentais e essa inibição não parece envolver o sistema opióide (GUIMARAES et al., 2013).

O carvacrol é um monoterpeno presente no óleo essencial de várias plantas aromáticas tais como *Nigella sativa* L., *Thymus vulgaris* L. (DE VICENZI, 2004). Estas plantas são usadas na medicina popular para o tratamento da dor, artrite, asma e cefaléia

(ENOMOTO et al., 2001). Estudos prévios mostraram que o carvacrol possui atividade anticociceptiva, antioxidante e anti-inflamatória em roedores (GUIMARÃES et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012, LIMA et al., 2012), além de reduzir o desenvolvimento da periodontite em ratos, quando administrado em associação com chalconas (BOTELHO, 2008). O estudo de Hotta et al. (2010) demonstrou que o carvacrol é capaz de suprimir a expressão de COX-2 via ação sobre os receptores ativado por proliferador de peroxisomo (PPAR), um importante fator de transcrição nuclear, que inclusive está relacionado com a translocação do NF- $\kappa$ B.

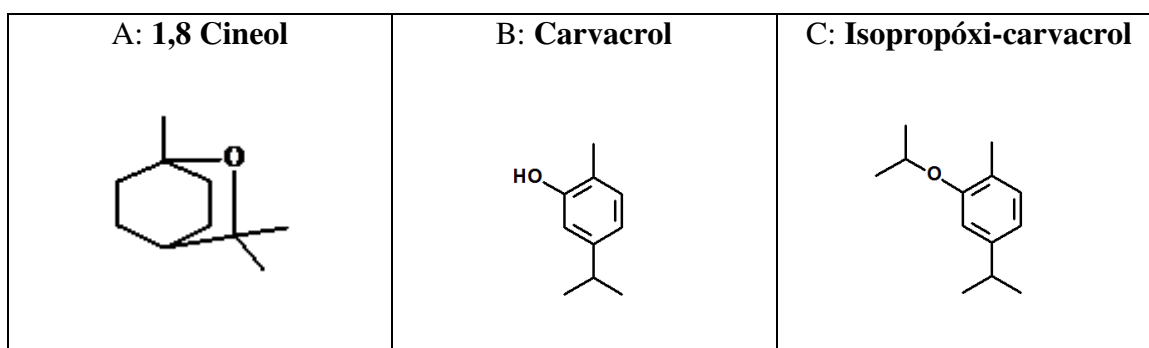


Figura 2: Estruturas químicas dos monoterpênos 1,8 cineol (A), carvacrol (B) e isopropóxi-carvacrol (C).

O composto de interesse no presente estudo é o isopropóxi-carvacrol (IPC) (figura 2C), um derivado sintético obtido a partir do carvacrol e que se assemelha quimicamente do 1,8-cineol. Não existem informações sobre os efeitos farmacológicos do IPC, mas o potencial deste composto como anti-inflamatório e analgésico se justifica pelas informações disponíveis acerca dos compostos correlatos. Dessa forma, são necessários estudos que possam comprovar a ação farmacológica do IPC em modelos animais, nos quais as substâncias da mesma classe química apresentam atividades biológicas satisfatórias. No presente projeto avaliou-se as propriedades farmacológicas do IPC, em modelos de nocicepção e inflamação experimentais, bem como as propriedades citotóxicas e antioxidantes do IPC que foram investigadas in vitro.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptivas do IPC.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a possível ação antioxidante do IPC.
- Investigar a atividade antinociceptiva do IPC na hipernocicepção induzida por diferentes agentes flogísticos.
- Avaliar a possível ação do IPC sobre a atividade locomotora dos animais.
- Investigar a atividade anti-inflamatória do IPC no edema de pata, edema de orelha e pleurisia.
- Avaliar a possível ação citotóxica do IPC em macrófagos peritoneais murinos.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (150-230 g) e camundongos Swiss (25-30 g), machos, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil) e trazidos para o biotério local do Departamento de Fisiologia antes do uso. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos e mantidos em caixas plásticas retangulares (5 ratos ou 10 camundongos por caixa) em sala com temperatura controlada (~22°C), com água e ração ad libitum, sob ciclo claro/escuro natural de 12:12 h, e troca da maravalha em dias alternados. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos durante o período das 7:00 as 17:00 h, e realizados de acordo com as normas de procedimentos sobre cuidados com animais para uso em pesquisa do Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe (aprovado sob protocolo nº 09/2011, Anexo I) e da Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório (SBCAL).

Após os procedimentos experimentais os animais foram anestesiados e eutanasiados com isoflurano inalatório (Cristália, Brasil), acondicionados em sacos plásticos brancos e guardados em freezer reservado para esta finalidade, até o descarte definitivo.

#### 3.2 OBTENÇÃO DO ISOPROPÓXI-CARVACROL

O IPC foi sintetizado e cedido pelo Prof. Dr. Damião P. de Sousa (Departamento de Farmácia-UFS).

#### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO IPC.

### 3.3.1 ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A atividade do IPC como sequestradora do radical NO foi medida em um sistema in vitro de produção de NO por nitroprussiato de sódio em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO reage com oxigênio para produzir nitrito, que é quantificado espectrofotometricamente pela reação de Griess. Após incubação (1 h) do sistema de produção de NO na presença ou ausência de IPC (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 µg/mL) ou ácido ascórbico (1,67 µg/mL), o reagente de Griess foi adicionado e incubado por mais 15 min, sendo a absorbância medida em um comprimento de onda de 540 nm usando um espectrofotômetro (MAIA, et al, 2010).

### 3.3.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO

Para determinar o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicativo de lipoperoxidação, conforme previamente descrito por Gelain et al (2004), foram utilizados sistemas in vitro de produção de radicais com FeSO<sub>4</sub> (0,145 mM) ou FeSO<sub>4</sub> (0,145 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,4 M) e a capacidade do IPC de interferir no dano oxidativo causado por esses sistemas em uma preparação de lipossomos (gema de ovo 1% m/v em 20 mM tampão fosfato, pH 7,4 sonificado por 10 s em potência 4) foi quantificada. Após incubação por 1 h com IPC (0,0001 - 100 µg/mL), as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 20%, as amostras foram centrifugadas (1200xg por 10 min) e o sobrenadante incubado com ácido tiobarbitúrico (TBA, solução 0,67%) em banho a 95°C por 20 min. Após resfriamento em banho de gelo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (535 nm), a concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada usando o coeficiente de absorção ( $1,56 \times 10^5/M \times cm$ ) e os resultados, em triplicata, expressos em percentual de MDA, o qual se condensa com o TBA produzindo cromógenos com absorvidade molar no espectro visível. O sistema contendo o AAPH, gema de ovo a 1% e tampão fosfato foi considerado como indutor de 100% de dano lipoperoxidativo (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Como controle padrão foi utilizado o ácido ascórbico (Sigma Chem Co, EUA; 1,67 µg/mL), em triplicata. Para normalizar os resultados encontrados, todos os valores obtidos foram subtraídos do valor do branco (gema de ovo a 1% em tampão fosfato).

### 3.4 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

#### 3.4.1 TESTE DA FORMALINA

Este teste foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por HUNSKAAR e HOLE (1987). Grupos de camundongos (n=6 por grupo) receberam injeção intraplantar de formalina a 2% (20 µL/animal). Logo após, foi cronometrado o tempo (s) de lambidas da pata durante a primeira fase (0-5 min) e a segunda fase (15-30 min) do teste. Os animais foram pré-tratados, 30 min antes da injeção de formalina na pata, com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg, i. p.) ou AAS (300 mg/kg; i. p., Sigma Chem Co., EUA) ou morfina (7,5 mg/kg, i.p., Cristália, Brasil). O grupo controle recebeu o tratamento com veículo (twen 80, 0,5 %, i. p.).

#### 3.4.2 MEDIDA DA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA NA PATA DE CAMUNDONGOS

Esta avaliação foi realizada seguindo descrição de Cunha e colaboradores (2004). Foi utilizado um analgesímetro digital modelo EFF 302 (Insight®, Ribeirão Preto, SP, figura 3), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g), com precisão de 0,1 g e que permite medidas entre 0,1 e 1000 g. Para o contato do transdutor de pressão com a pata dos animais, foi adaptada uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro. Assim, uma pressão manual e linearmente crescente, realizada na região plantar da pata dos animais, foi proporcionada por intermédio desta ponteira adaptada, de maneira a produzir uma resposta característica de retirada da pata estimulada (flinch).

As caixas de acrílico, utilizadas para o acondicionamento dos animais durante as avaliações, foram acomodadas sobre uma estante que fornece como assoalho uma rede de malha de 5 mm<sup>2</sup> (tipo tela) confeccionada em arame não maleável de 1 mm de espessura. Esta estante permitiu a utilização de um espelho, acoplado 25 cm abaixo das caixas, com inclinação de aproximadamente 35 graus, possibilitando a visualização das plantas das patas dos animais (figura 3). Após um período de 15 min para a adaptação

dos animais às caixas, o comportamento nociceptivo foi obtido através da média de três valores expressos em gramas, representando a intensidade de estímulo mecânico necessária para a retirada da pata (medida basal). Após esta medida, os animais (n=5) foram pré-tratados com IPC (10, 30, ou 100 mg/kg; i.p), veículo (tween 80, 0,5 %; i.p.) ou indometacina (15 mg/kg; i.p.; Sigma, Brasil, dissolvida em tampão fosfato). Decorridos 30 minutos deste tratamento, foi realizada a administração de 20  $\mu$ L de carragenina (300  $\mu$ g/pata) e foram feitas as medidas em tempos subsequentes (1, 3 e 5 h) da mesma maneira que a medida basal. Os valores foram expressos como variação ( $\Delta$ ) da intensidade de estímulo (g), pela diferença entre o valor obtido em cada tempo experimental e o valor basal ( $\Delta$ = medida no tempo experimental – medida basal).



Figura 3: Analgesímetro digital (A) e caixas de acondicionamento do Von Frey eletrônico (B).

### 3.4.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS NO CAMPO ABERTO

Esta investigação foi utilizada para verificar uma possível ação estimulante ou depressora do IPC sobre o sistema nervoso central. A avaliação da atividade locomotora foi realizada baseando-se na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973). Foram utilizados grupos de 6 camundongos tratados previamente com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg, i.p.), veículo (tween 80; 0,5 %) ou diazepam (5 mg/kg, i.p.; Cristália, Brasil). Os animais foram colocados, 30 minutos após os tratamentos, em um campo aberto confeccionado em acrílico com diâmetro de 60 cm, dividido em 12

campos previamente demarcados (Insight®, Ribeirão Preto, SP) e foram observados durante 5 min, sendo avaliado o número total de cruzamentos efetuados pelos animais nos campos demarcados.

#### 3.4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

Esse teste foi realizado seguindo metodologia descrita por Winter, Risley e Nuss (1962) com pequenas modificações, conforme abaixo. Os animais (n=5) foram previamente tratados com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg; i.p.), veículo (tween 80; 0,5 %) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.; EMS, Brasil). Após 0,5 h, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e receberam uma injeção subplantar de carragenina 0,5% ou salina estéril na pata direita, em um volume final de 0,1 mL. O volume da pata foi medido imediatamente antes da injeção (basal) e em tempos regulares após a mesma (1, 2, 3 e 4 h), usando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile). Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (mL) calculado pela subtração do volume medido em cada tempo do volume basal. Também foi calculada a área sob a curva ( $ASC_{0-4h}$ ) através da regra trapezoidal.

#### 3.4.5 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO 12-O-TETRADECANOILFORBOL-ACETATO (TPA) E DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

O edema foi avaliado de acordo com a metodologia revisada por De Young et al. (1989). Para tanto, os camundongos (n=5), foram anestesiados com isoflurano pela via inalatória. Em seguida, foram tratados topicamente com o IPC (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/orelha dissolvido em 20 µL de acetona), dexametasona (0,05 mg/orelha dissolvido em 20 µL de acetona) ou veículo (acetona, 20 µL/orelha). Simultaneamente a esses tratamentos foi realizada a administração de TPA (Sigma, EUA) (1 µg/orelha dissolvido em 20 µL de acetona). Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foram administrados topicamente 20 µL de acetona e cada animal serviu como seu controle. A eutanásia foi realizada por excesso de isoflurano inalatório 6 h após a indução da inflamação. Em seguida, os sítios das orelhas foram recortados circularmente com 8 mm de diâmetro e foi medida a espessura das orelhas, com o auxílio de um paquímetro. Os

valores foram expressos em  $\mu\text{m}$  e representam a subtração entre as orelhas direita e esquerda de cada animal.

O recrutamento de neutrófilos foi investigado indiretamente nos sítios de orelha pela dosagem da atividade da MPO. Após a medida da espessura, as amostras de orelha foram cortadas em pedaços pequenos e mantidas em tubos na presença de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Cada amostra foi homogeneizada e alíquotas do homogenato foram centrifugadas. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO, conforme segue: em placa de 96 poços, os sobrenadantes foram adicionados à solução de di-hidrocloreto de o-dianisidina (0,167 mg/mL, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As alterações nos valores de absorvância a 460 nm foram registradas a cada 15 s durante um período de 5 min e os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO/mg de tecido), considerando-se 1 UMPO como a quantidade de enzima que degrada 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 25°C, gerando variação de absorvância de 0,0113 unidades de absorvância, conforme previamente descrito (BRADLEY et al., 1982).

#### 3.4.6 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

Este teste foi realizado segundo metodologia proposta por Vinegar et al., 1973. Os animais (n=5) foram submetidos à injeção intrapleural de carragenina (300  $\mu\text{g}$ /cavidade, Sigma, EUA) dissolvida em solução fisiológica. Os grupos de animais foram tratados previamente (-30 min) com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg; i.p), dexametasona (1 mg/kg, s.c.; Research Biochemicals Internatinal, EUA) ou com veículo (tween 80; 0,5 %). Após 4 h, os camundongos foram eutanasiados por excesso de isoflurano inalatório e foi coletado lavado pleural. Este lavado foi centrifugado e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida foi feita a contagem diferencial de leucócitos que foi realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga e coradas com corante Panótico<sup>®</sup>, sendo contabilizadas 100 células/lâmina, diferenciando-se as células polimorfonucleares das

mononucleares, baseando-se no critério morfológico normal. Os resultados foram expressos como número de leucócitos/cavidade.

#### 3.4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR BROMETO DE 3-[4,5-IMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENIL TETRAZÓLIO (MTT) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT (DENIZOT; LANG, 1986). Alíquotas de 0,1 mL de macrófagos ( $2 \times 10^5$  células/mL de MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL), foram depositadas em microplacas de 96 poços. Após 24 h de incubação, o meio de cultivo foi removido e meio fresco contendo diluições seriadas de 0,1; 1,0; 10; 50 ou 100  $\mu$ M de IPC foram adicionadas.

Foram utilizados 4 poços da microplaca para cada diluição e 0,1 mL de inóculo por poço, ademais, foram utilizados dois controles, um constituído apenas com o meio de cultura e outro constituído com meio de cultura mais tween a 3%, utilizado como controle de morte celular. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 e 48 h. Após esse período, o meio foi desprezado e acrescentou-se 100  $\mu$ L de MTT a uma concentração de 5 mg/mL. As microplacas foram incubadas por 4 h a 37°C para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente, esses foram solubilizados pela adição de 100  $\mu$ L de uma solução de 95% de isopropanol e 5% de ácido fórmico. A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de ELISA a uma absorvância de 600 nm. Com os valores das densidades ópticas determinou-se a concentração da droga capaz de reduzir o número de células viáveis.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

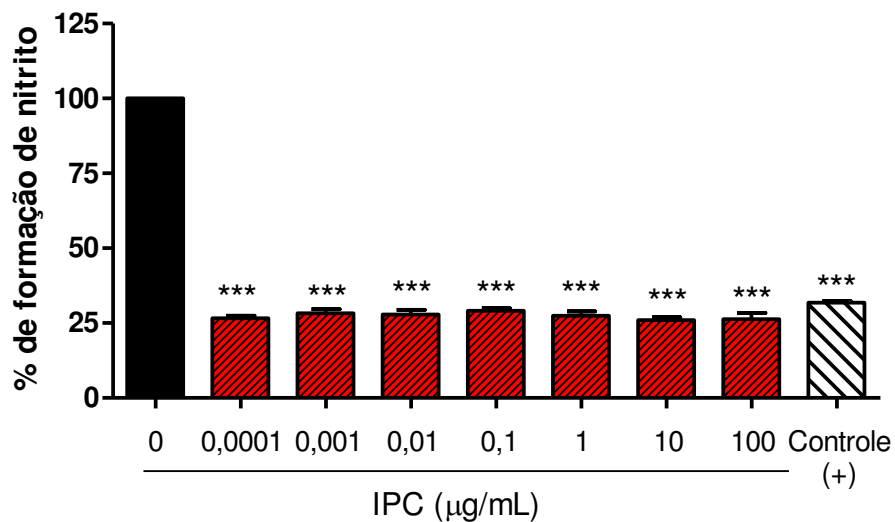
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média para n entre 4-6 animais (experimentos in vivo) ou em 3-4 replicatas (experimentos in vitro) e foi utilizada a análise da variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por pós-testes específicos, conforme indicado nas figuras. Foi utilizado software GraphPad Prisma (versão 5). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO IPC

#### 4.1.1 ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE ÓXIDO NÍTRICO PELO IPC

A incubação de IPC (100 pg/mL- 100 µg/mL) em um meio com doador químico de NO (nitroprussiato de sódio) causou a redução significativa do percentual de formação de nitrito em todas as concentrações utilizadas, um indicativo de consumo do NO pelo IPC (figura 3). Este efeito também foi observado para o ácido ascórbico ( $P < 0,001$ ).

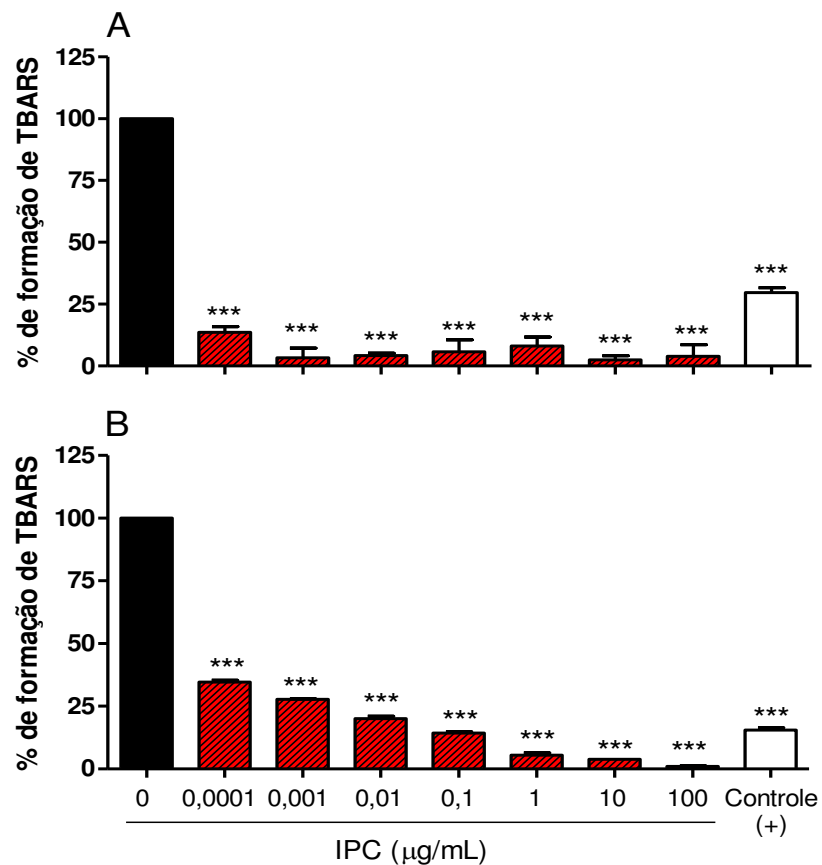


**Figura 4: Atividade sequestradora de óxido nítrico pelo IPC in vitro.** Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E. P. M. do percentual de formação de nitrito, para  $n=3$ . Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico (1,67 µg/mL). \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo incubado com o veículo (0 µg/mL de IPC), ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.



#### 4.1.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA IN VITRO

A atividade antioxidante do IPC foi testada in vitro frente à formação de TBARS induzida por  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  em preparação de lipossomos. Foi observado que o IPC, na faixa de concentrações utilizadas (100 pg/mL – 100  $\mu\text{g/mL}$ ), inibiu a formação de TBARS induzida por  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  ( $p < 0,001$ ; Fig 4A), quando comparado ao controle sem IPC. Além disso, no dano oxidativo induzido por  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  em lipossomos, foi observada inibição da formação de TBARS de maneira concentração dependente (Fig 4B). Como controle, o ácido ascórbico também causou inibição da formação de TBARS induzido por ambos os estímulos.

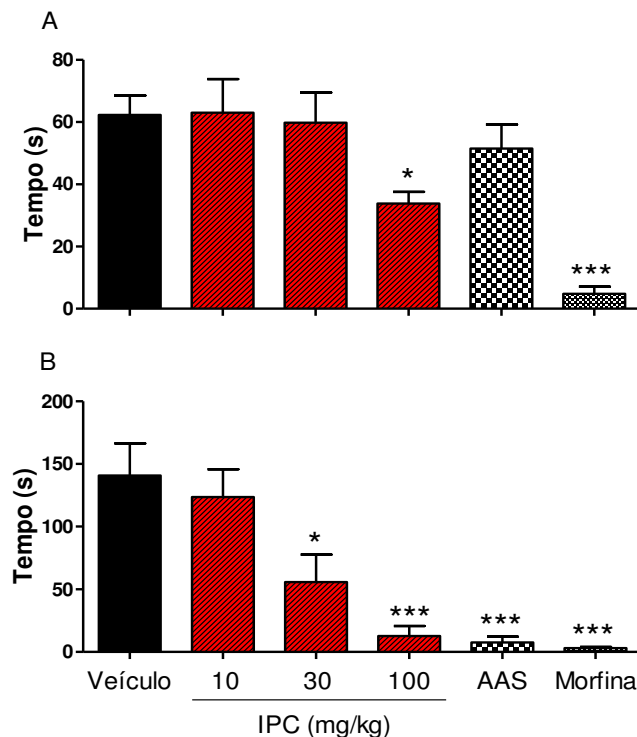


**Figura 5: Efeito do IPC na produção de TBARS in vitro na presença de dano oxidativo produzido por  $\text{FeSO}_4$  (Painel A) ou  $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (Painel B).** Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E. P. M. do percentual de formação de TBARS, para  $n=3$ . Como controle positivo (+) foi utilizado o ácido ascórbico (1,76  $\mu\text{g/mL}$ ). \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo incubado com o veículo (0  $\mu\text{g/mL}$  de IPC), ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.

## 4.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO IPC

### 4.2.1 EFEITO DO IPC NO TESTE DA FORMALINA

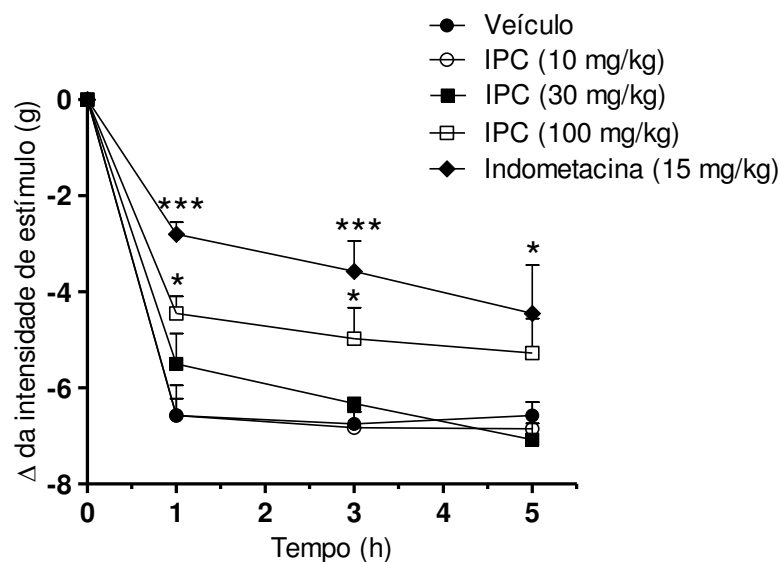
Na primeira fase do teste da formalina (Fig. 5A), o pré-tratamento com 100 mg/kg de IPC causou redução do tempo de lambida na pata ( $P < 0,05$ ), bem como o pré-tratamento com morfina (7,5 mg/kg;  $P < 0,001$ ), quando comparados com o grupo que recebeu veículo. Além disso, na segunda fase deste teste (Fig. 5B), as doses de 30 e 100 mg/kg de IPC reduziram significativamente o tempo de lambida da pata, quando comparado ao grupo veículo. Nesta fase, os grupos tratados com AAS (300 mg/kg) ou morfina causaram redução significativa do tempo de lambida, quando comparados ao grupo veículo, que foi semelhante à encontrada para a dose de 100 mg/kg de IPC.



**Figura 6. Efeito do IPC, AAS e morfina na 1ª (Painel A) e 2ª fases (Painel B) do teste da formalina.** Grupos de camundongos foram pré-tratados com veículo (tween 80, 0,5%), AAS (300 mg/kg), morfina (7,5 mg/kg) ou IPC (10, 30 ou 100 mg/kg). Posteriormente, foi administrada formalina (2%, 20  $\mu$ L, s.pl.) na pata posterior direita. As barras representam a média  $\pm$  E. P. M. do tempo que os animais gastaram lambendo e/ou mordendo sua pata após a injeção de formalina. \* $P < 0,05$  ou \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo veículo, ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett ( $n = 6$ ).

#### 4.2.2 EFEITO DO IPC NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

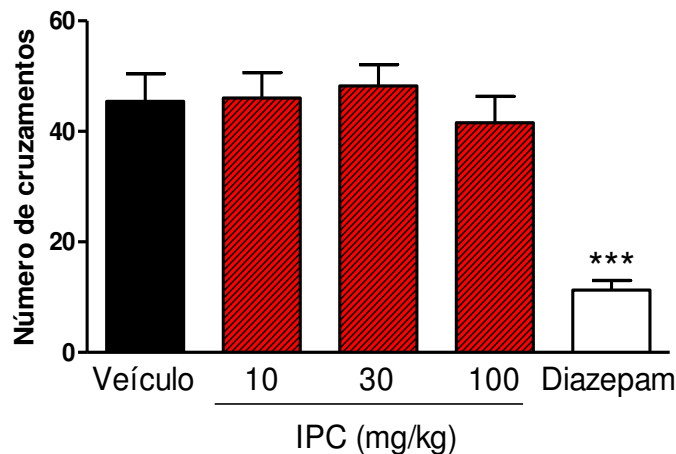
A injeção de carragenina na pata causou uma variação no limiar de nocicepção mecânica (hiperalgesia) de aproximadamente 7 g desde a primeira hora e que se manteve até a quinta hora pós-administração (Figura 6). Para os grupos pré-tratados com IPC, observou que apenas a dose de 100 mg/kg induziu redução significativa da hiperalgesia induzida pela carragenina na primeira e na terceira hora pós-injeção, quando comparado com o respectivo grupo tratado com veículo (Figura 6). Os animais que receberam tratamento com indometacina (controle positivo) também apresentaram a redução da hiperalgesia quando comparado com o grupo veículo (Figura 6).



**Figura 7: Efeito do IPC e indometacina na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos.** Grupos de camundongos foram pré-tratados com veículo (tween 80, 0,5%), IPC (10, 30 ou 100 mg/kg) ou indometacina (15 mg/kg). Em seguida os animais foram submetidos a injeção i. pl. de carragenina (1%) e foi realizada a medida da intensidade de estímulo suportada pelo animal. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  E. P. M. para n=5 animais. \*P<0,05 ou \*\*\*P<0,001 comparando-se com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni).

#### 4.2.3 EFEITO DO IPC SOBRE A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DE CAMUNDONGOS NO CAMPO ABERTO

A atividade exploratória foi avaliada observando-se o número de cruzamentos realizados pelos animais no campo aberto durante 5 minutos de exposição. O grupo de animais que recebeu IPC não apresentou alteração no número de cruzamentos com nenhuma das doses testadas, quando comparado com o grupo que recebeu veículo. Os animais que receberam diazepam (5 mg/kg) apresentaram redução significativa do número de cruzamentos, em comparação com o grupo veículo (Figura 7).

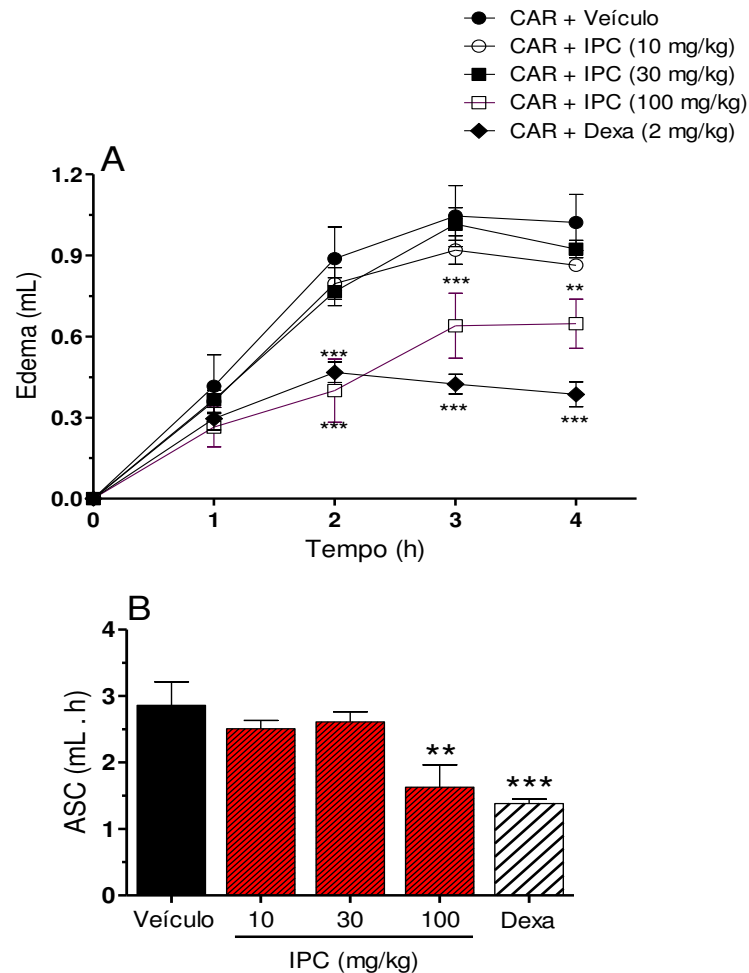


**Figura 8: Efeito do IPC e diazepam na atividade exploratória de camundongos no campo aberto.** Os camundongos foram pré-tratados (i.p.) com veículo (tween 80, 0,5%), IPC (10, 30 ou 100 mg/kg) ou diazepam (5 mg/kg). Os animais foram colocados, 30 minutos após o tratamento, no campo aberto e observados durante 5 min. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E. P. M. para n=6 animais. \*\*\*P<0,001 em relação ao grupo tratado com veículo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett.

#### 4.2.4 EFEITO DO IPC NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A administração de carragenina na pata de ratos induziu edema, de forma gradual, até o tempo de três horas (Fig. 8A). O pré-tratamento com IPC (100 mg/kg) ou dexametasona (2 mg/kg) reduziu a formação de edema promovido pela carragenina,

quando comparados com o grupo que recebeu veículo, o que pode ser melhor visualizado através da diminuição ( $P < 0,01$ ) da área sob a curva (Fig. 8B).



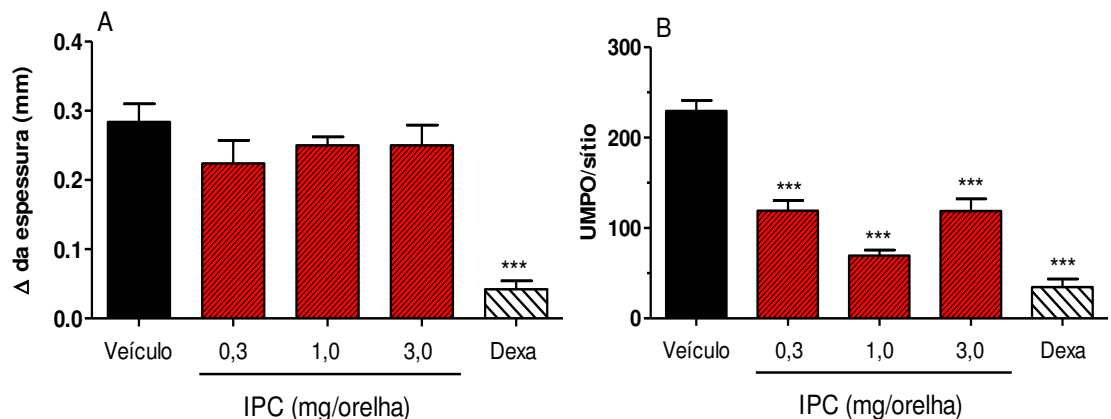
**Figura 9: Efeito do IPC no edema de pata induzido por carragenina (CAR).**

Os ratos foram pré-tratados pela via i.p. com IPC (10, 30 e 100 mg/kg) ou veículo (Tween 80, 0,5 %). Um grupo de animais foi pré-tratado com dexametasona (Dexa, 2 mg/kg, s.c.) e usado como controle positivo. Meia hora após, os animais receberam injeção subplantar de carragenina 0,5% na pata direita. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. para a variação do volume das patas (Painel A) e como área sob a curva (ASC) do edema de pata (Painel B), para  $n=5$  animais. \*\* $P < 0,01$  ou \*\*\* $P < 0,001$  vs o respectivo controle; Painel A: ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni; Painel B: ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.2.5 EFEITO DO IPC NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA E ATIVIDADE DE MPO

A ação tópica do IPC foi testada no modelo de edema de orelha induzido por TPA. A figura 9A demonstra que a coadministração tópica de IPC (0,3-3 mg/orelha) com TPA (1  $\mu$ g/orelha) não afetou o aumento da espessura da orelha induzido pelo TPA, porém a coadministração de dexametasona (0,05 mg/orelha) reduziu o edema de orelha ( $P < 0,001$ ), quando comparado com o grupo com aplicação concomitante de TPA e veículo. Não foram observadas diferenças entre os diâmetros das orelhas contralaterais (valores não mostrados).

Em contrapartida, a aplicação de IPC com TPA causou redução significativa da atividade de MPO na orelha dos camundongos, quando comparado ao grupo TPA + veículo, o que também foi observado para a aplicação de dexametasona (Fig 9B). A administração do veículo nas orelhas contralaterais conduziu a valores muito baixos e próximos do limite de detecção da atividade de MPO (menores que 1 UMPO/sítio).



**Figura 10: Efeito do IPC e dexametasona no edema de orelha induzido por TPA.**

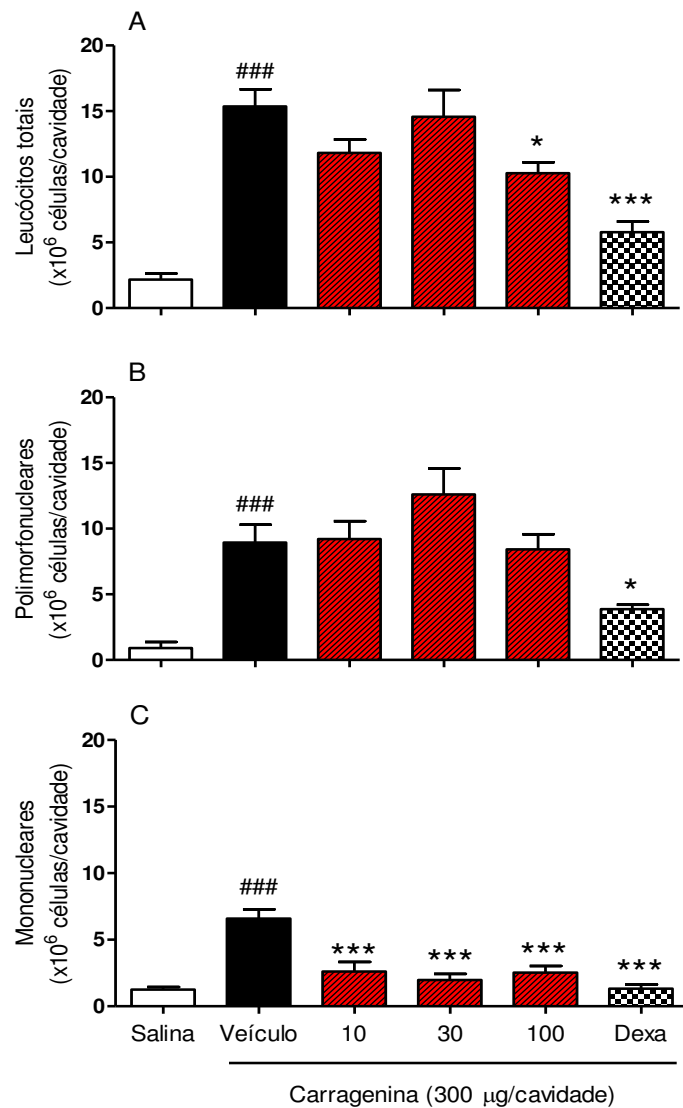
Os camundongos receberam tratamento tópico com IPC (0,3, 1 ou 3,0 mg/orelha), dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1  $\mu$ g/orelha). Após 6 h, foi medida a espessura das orelhas (Painel A) e atividade de MPO nos tecidos (Painel B). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. para a variação da espessura da orelha comparando-se com a orelha contralateral (Painel A) ou a atividade de MPO/sítio (Painel B), para  $n=5$  animais. \*\*\* $P < 0,01$  em relação ao respectivo grupo veículo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett.

#### 4.2.6 EFEITO DO IPC NA PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

A administração de carragenina (300 µg/cavidade) na cavidade pleural dos camundongos induziu a migração leucocitária, como demonstrado na figura 10, que foi caracterizada pelo aumento da contagem de leucócitos totais (Fig. 10A), polimorfonucleares (Fig. 10B) e mononucleares (Fig. 10C) ( $P < 0,001$ ).

Os grupos de animais que foram previamente tratados com IPC (10 ou 30 mg/kg) não apresentaram alteração significativa na contagem total de leucócitos, porém, o tratamento com a dose de 100 mg/kg de IPC causou redução ( $P < 0,05$ ) da contagem total, em relação ao grupo tratado com veículo. Conforme esperado, o grupo previamente tratado com dexametasona (1 mg/kg) também apresentou redução significativa da contagem total, quando comparado com o grupo veículo (Fig. 10A).

Avaliando-se o tipo celular mobilizado para cavidade pleural após estímulo com carragenina, observou-se a presença de um intenso infiltrado de polimorfonucleares no tempo de 4 h (Fig 10B). A contagem de polimorfonucleares foi caracterizada pela presença de neutrófilos, sendo que praticamente não foram observados eosinófilos nas lâminas dos grupos avaliados. Observa-se também que o pré-tratamento dos animais com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg) não alterou o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural. Para os animais previamente tratados com dexametasona foi observada a redução significativa na contagem de neutrófilos na cavidade pleural, quando comparado com o grupo tratado com veículo. Apesar da falta de efeito sobre a contagem de polimorfonucleares, o pré-tratamento dos animais com IPC nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg foi capaz de alterar de maneira significativa o número de células mononucleares recrutadas para cavidade pleural. O grupo controle tratado com dexametasona, 1 mg/kg (s.c.), também apresentou redução dos mononucleares, quando comparado com o grupo tratado com veículo.

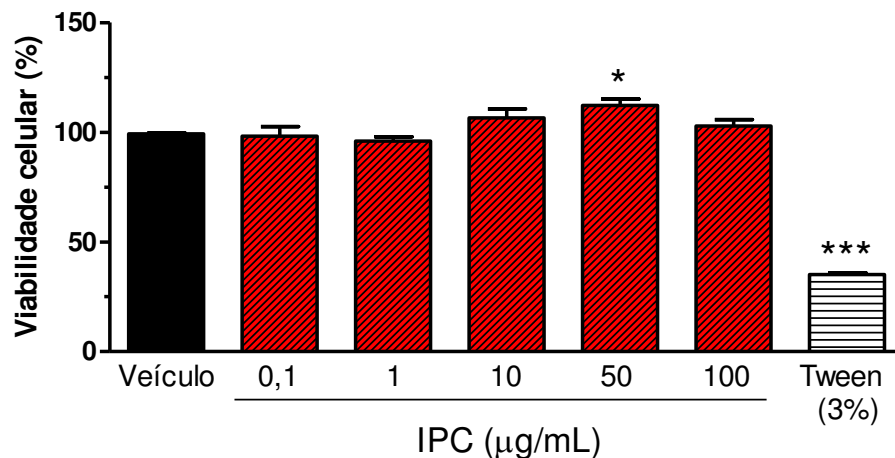


**Figura 10: Efeito do IPC e dexametasona sobre a migração de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina em camundongos.** Os animais foram submetidos a injeção intrapleurial de carragenina (300 µg/cavidade) ou salina. Os grupos foram tratados previamente (30 min) com IPC (10, 30 ou 100 mg/kg, i.p.), dexametasona (1 mg/kg, s.c.) ou com o veículo (tween 80, 0,5 %) e eutanasiados após 4 h da injeção de carragenina. Os dados de contagem total de leucócitos (A) ou parcial de células polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) foram expressos como a média ± E. P. M., para n=5. ###P<0,001 em relação ao respectivo grupo salina e \*P<0,05 ou \*\*\*P<0,001 em relação ao respectivo grupo carragenina + veículo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.



#### 4.2.7 EFEITO DO IPC NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT

Para verificar a ação do IPC sobre a viabilidade celular de leucócitos, macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados com este composto. A figura 11 demonstra que o IPC, incubado com macrófagos peritoneais de camundongos, em concentrações variando entre 0,1 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentou efeito citotóxico, pois não causou redução do percentual de viabilidade destas células. Ao invés disto, observou-se que a concentração de 50  $\mu\text{g}$  de IPC elevou a incorporação do MTT quando comparado às células incubadas apenas com o meio de cultura ( $P < 0,05$ ). Já o controle de morte celular (tween 3 %) induziu a redução da viabilidade celular ( $P < 0,001$ ).



**Figura 11: Ausência de efeito citotóxico do IPC em macrófagos peritoneais.** Os macrófagos foram incubados por 24 h com IPC (0,1; 1,0; 10; 50 ou 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou tween 80 (3%) e em seguida a viabilidade das culturas foi mensurada pelo teste de MTT. Os valores são representados como média aritmética  $\pm$  E. P. M. do percentual de viabilidade para 4 replicatas/tratamento. \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ , em relação ao grupo incubado com meio de cultura (veículo), ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett.

## 5 DISCUSSÃO

Os compostos monoterpênicos representam na atualidade uma classe com importante potencial terapêutico. Muitos desses compostos tem sido preconizados para o uso em condições dolorosas (DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2013) e cada vez mais são publicadas evidências científicas de que estes compostos possuem ação anti-inflamatória (HOTTA et al., 2010; SU et al., 2010; INOUE et al., 2011; CHO et al., 2012; LIMA et al., 2012; RIELLA et al., 2012; DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ et al., 2013). O IPC foi sintetizado com o propósito de melhorar as atividades farmacológicas do seu precursor, o carvacrol, que é um monoterpene fenólico encontrado em óleos essenciais de várias espécies do gênero *Thymus* (DE SOUSA, 2011) e que apresenta atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2012).

Inicialmente foi realizada a avaliação da atividade antioxidante do IPC *in vitro*, pelo uso de técnicas envolvendo sistemas que permitem inferir acerca da atividade sequestradora de NO e da ação inibitória sobre a peroxidação lipídica. Nestes ensaios o IPC mostrou efeito antioxidante em todas as concentrações testadas, que se estenderam até o valor mínimo de 100 pg/mL (aproximadamente 474 pmol/mL). Ficou evidenciado assim que o IPC reduziu a porcentagem de nitrito formada, o que indica que este composto possui atividade sequestradora de NO. O NO é um radical livre que apresenta grande importância no contexto inflamatório, pois sua produção excessiva tem participação importante no estresse oxidativo, por exemplo, por levar a formação de peroxinitrito após a reação com o ânion superóxido (PELUFFO; RADI, 2007). O peroxinitrito, por sua vez, causa a nitração de vários componentes celulares, como as proteínas e o DNA, comprometendo suas funções (MAIA et al., 2010). Além disso, o peroxinitrito pode regular a resposta inflamatória em vários níveis. Estudos mostram que a administração de peroxinitrito, na pata de ratos, induz respostas álgicas que foram inibidas com a administração de inibidores de peroxinitrito (SZABÓ et al., 2007), dessa forma, substâncias que possam inibir a formação de NO e consequente inibição de peroxinitrito apresentam potenciais propriedades farmacológicas.

Membranas e organelas celulares contém grande quantidade de lipídios poli-insaturados e a peroxidação lipídica consiste na oxidação desses lipídios (URSO;

CLARKSON, 2003). O MDA é um dos produtos formados na peroxidação lipídica e é utilizado, através da reação com o TBA, na análise da lipoperoxidação *in vitro* (ALAM, et al, 2012), uma vez que, existe uma estreita correlação de TBARS como marcadores de lipoperoxidação e produtos que provocam dano oxidativo ao DNA (SHIBAMOTO, 2006). É interessante ressaltar que as reações de peroxidação lipídica geralmente ocorrem pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, nesta ordem (GUTTERIDG; HALLIWELL, 1990). Vários agentes são descritos como capazes de iniciar este processo, como é o caso do íon  $Fe^{+3}$ , tanto na ausência, quanto na presença de  $H_2O_2$  (BRAUGHLER; DUCAN, 1986). Os resultados obtidos para o IPC estão de acordo com os encontrados por Guimarães et al. (2010) que mostraram que o carvacrol (1 ng-1 mg/ml) apresenta atividade antioxidante nos mesmos testes utilizados para o IPC. Não foram encontrados dados sobre atividade antioxidante do 1,8-cineol na literatura, mas segundo estudo publicado por Wannes (2010), o óleo essencial de *M. communis* possui atividade antioxidante e apresenta, como composto majoritário, o 1,8-cineol. Como pode haver sinergismo entre os diversos compostos no óleo essencial, a comparação da atividade antioxidante do IPC com o 1,8-cineol deve ser realizada com cautela. De maneira geral, a descrição de que o IPC possui atividade antioxidante *in vitro* reforça a necessidade da investigação de suas atividades *in vivo*, pois o estresse oxidativo está envolvido com o desenvolvimento de várias condições inflamatórias/dolorosas e substâncias que possam atenuar o estresse oxidativo têm potencial para tratar tais doenças (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Com o propósito de direcionar os testes para determinação das atividades farmacológicas *in vivo* do IPC foi realizado inicialmente o teste da formalina. Esse teste é bastante utilizado para verificar o potencial analgésico e/ou anti-inflamatório de novas substâncias. De acordo com Amaral et al. (2007) na 1ª fase (“dor” neurogênica) desse teste ocorre estimulação direta dos nociceptores que estão presentes nas fibras aferentes (predominantemente as fibras C). Já a “dor” de origem inflamatória é observada na 2ª fase do teste e é resultado da ação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, serotonina e bradicinina) nos tecidos periféricos e também no corno dorsal da medula (CHA et al., 2011). Drogas das classes dos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais são capazes de diminuir o comportamento nociceptivo durante a 2ª fase, já as drogas opióides são capazes de inibir ambas as fases (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

Os resultados obtidos com IPC mostram que ambas as fases são afetadas por este composto, diferente do AAS, um anti-inflamatório não esteroidal, que tem efeito apenas na 2ª fase do teste, e semelhante à morfina, um analgésico opióide que afeta ambas as fases. Dessa forma é possível especular que o IPC poderia atuar causando inibição das COXs e consequente redução da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que por sua vez, têm ação vasodilatadora e sensibilizam os nociceptores, bem como poderia possuir ação analgésica central, semelhante a um opióide, mas outros mecanismos podem estar presentes e contribuir para estes efeitos. Esta ação do IPC se assemelha à ação previamente descrita para o carvacrol (GUIMARÃES et al., 2010) e 1,8-cineol (DE SOUZA, 2011) ou outros monoterpenos, como p-cimeno (BONJARDIM et al., 2012), citronelol (BRITO et al., 2012), óxido de rosa (NONATO et al., 2012), ou derivado sintético, como a hidrox-di-hidrocarvona (DE SOUSA et al., 2010).

Segundo resultados publicados por Guimarães et al. (2012), o carvacrol apresenta a propriedade de reduzir (aproximadamente 5 g) a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina no teste do Von Frey eletrônico, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. De acordo com Ferreira (1993), a injeção de carragenina na superfície plantar de camundongos induz a liberação de citocinas por células residentes ou migratórias, essas citocinas promovem a liberação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005), que por sua vez estimulam fibras nervosas sensoriais periféricas (fibras A $\delta$  e C), que causam a liberação de substância P e neurocinina A, promovendo assim um incremento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular. Como o IPC causou a reversão parcial do limiar de sensibilidade mecânica (aproximadamente 4,5 g) na dose de 100 mg/kg, pode-se inferir que este composto pode atuar em algum destes mecanismos.

Entretanto, sabe-se que fármacos que possuem a capacidade de reduzir a atividade central podem causar um resultado falso positivo nas medidas nociceptivas, que, por natureza, dependem de observações comportamentais, como lambar ou retirar a pata. Para confirmar o efeito antinociceptivo dessas substâncias, torna-se necessário a realização de experimentos como o campo aberto ou o rota rod. No campo aberto, o número total de cruzamentos, que infere sobre a atividade exploratória do animal, pode ser afetado por fármacos com ação depressora do SNC ou relaxantes musculares

periféricos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946). Assim, foi realizado o teste do campo aberto com a finalidade de observar se a ação analgésica observada na dose de 100 mg/kg do IPC seria decorrente de ação depressora no SNC. Dessa forma, a falta de efeito do IPC, nas doses testadas, sobre o número de cruzamentos realizados pelos camundongos é um importante indicativo de que este composto causa efeito antinociceptivo ao invés de qualquer outro efeito central que comprometeria as medidas baseadas em observação do comportamento dos animais, como lambar ou levantar das patas. É importante ressaltar que o carvacrol induziu uma redução parcial no número de cruzamentos no campo aberto, 30 min após administração da dose de 100 mg/kg (GUIMARÃES et al., 2012), mas não afetou o tempo que os animais permaneceram no rota rod (GUIMARÃES et al., 2010). Contrariamente ao carvacrol, o 1,8-cineol reduziu a atividade locomotora de ratos e elevou o tempo de sono induzido por tiopental o que indica uma atividade depressora central (SANTOS; RAO, 2000). Comparativamente, o IPC nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg não apresentou atividade depressora central nesse teste e isto reforça seu potencial analgésico.

O efeito antinociceptivo do IPC poderia ser causado pela sua habilidade de interferir na produção ou ação de diferentes mediadores. Embora estes mediadores não tenham sido identificados no presente estudo, os resultados publicados por Juergens et al. (2004) mostram que o monoterpeneo 1,8-cineol reduziu, em cultura humana de linfócitos e monócitos, a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Além disso, o estudo de Guimarães et al. (2012) mostra que o carvacrol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) promoveu uma redução da produção de TNF- $\alpha$  na cavidade pleural de camundongos injetados com carragenina. O fato destes mediadores serem comuns aos processos nociceptivo e inflamatório, favoreceu a investigação da atividade anti-inflamatória do IPC.

Um dos modelos mais tradicionalmente utilizados no screening de substâncias com potencial efeito anti-inflamatório é o edema de pata de rato induzido por carragenina. Sabe-se que vários mediadores inflamatórios estão envolvidos na geração do edema de pata induzido por este agente, que é capaz de promover um quadro de inflamação aguda, ocasionando uma alteração vascular que desencadeia o acúmulo extravascular de líquido e leucócitos na pata e a produção de diversos mediadores

ligados ao processo inflamatório (SPILLER et al., 2004). Segundo Di Rosa et al. (1971) a carragenina causa uma resposta inflamatória aguda em ratos com três fases distintas, na qual a primeira fase relaciona-se com liberação de histamina e serotonina, a segunda fase envolve a liberação de bradicinina, enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na última fase.

A administração do IPC resultou na redução do edema de pata de rato, mais proeminente após a 2<sup>a</sup> hora da indução e foi mantida até a 4<sup>a</sup> hora, apenas para a maior dose utilizada deste composto. Este resultado sugere que o IPC poderia inibir a formação ou ação de mediadores inflamatórios como a bradicinina, as prostaglandinas ou mesmo o NO, entretanto outros estudos são necessários para investigar estas possíveis ações do IPC e não podem ser descartados outros efeitos. De maneira geral, pode-se afirmar que o IPC tem atividade anti-edematogênica quando administrado sistemicamente. Os resultados obtidos para o IPC corroboram com aqueles encontrados para o carvacrol e o 1,8-cineol (GUIMARÃES et al. 2010; SANTOS; RAO, 2000), sugerindo que o IPC compartilharia de mecanismos de ação semelhantes a estes monoterpenos.

Em seguida, foi avaliada a atividade do IPC após administração tópica na orelha de camundongos. O edema de orelha de camundongos induzido pelo TPA é um modelo utilizado para avaliar a resposta inflamatória, uma vez que esse agente flogístico induz inflamação cutânea e hiperproliferação celular em animais, semelhantes a diversas doenças de pele como, por exemplo, a psoríase (GÁBOR; RAZGA, 2000). Nesse modelo, entre os mediadores inflamatórios importantes estão os eicosanóides, como a prostaglandina E<sub>2</sub> e o leucotrieno B<sub>4</sub> (RAO et al., 1993; PUIGNERO; QUERALT 1997). Tanto inibidores de COX ou de 5-lipoxigenase (LOX), bem como antagonistas de receptores de leucotrieno B<sub>4</sub> inibem o edema causado pelo TPA (RAO et al., 1993). Sabe-se que o TPA induz vasodilatação, edema, eritema e agregação plaquetária na orelha que inicia-se dentro de 2 h e se agrava nos tempos posteriores. Os efeitos edematogênicos do TPA não foram afetados pelo IPC, mas, interessante, houve redução na atividade da enzima mieloperoxidase nas orelhas, que é indicativo de inibição da migração de neutrófilos para este tecido.

É descrito que os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) podem ser visualizados aderindo-se à parede do vaso em até 6 h após a aplicação de TPA

(YOUNG et al., 1983; YOUNG e De YOUNG, 1989). Esse influxo de leucócitos para sítios inflamatórios é um processo orquestrado por diversos mediadores, como as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (ZIMMERMAN et al., 1996; GARIN; PROUDFOOT, 2011). Dessa forma é possível que a aplicação do IPC possua alguma ação inibitória sobre a síntese ou liberação de algum desses mediadores. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os descritos para o 1,8-cineol que também promoveu redução da atividade de MPO em ratos com colite (SANTOS et al., 2004).

Tendo-se em vista os resultados obtidos na 2<sup>a</sup> fase do teste da formalina e no edema de pata, que sugerem uma ação anti-inflamatória do IPC, e considerando-se a possibilidade do efeito de redução da migração de neutrófilos observado no edema de orelha, foi então realizado o modelo de pleurisia induzida por carragenina.

O modelo experimental de pleurisia tem sido amplamente utilizado para investigar a fisiopatologia da inflamação aguda e também para avaliar a eficácia de drogas. A administração intrapleural de carragenina promove aumento do volume do exsudato na cavidade pleural e também migração leucocitária, além disso, observa-se a liberação de mediadores como prostaglandinas e leucotrienos e também aumento dos níveis de COX-2 (DUTRA et al., 2006; MOORE et al., 2010; WILLOUGHBY et al., 2000).

A administração de IPC causou efeito inibitório moderado sobre a migração total de leucócitos para a cavidade pleural, que foi caracterizado pela redução de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sem afetar a migração de polimorfonucleares. Em relação à migração de polimorfonucleares, há uma discrepância com os resultados recentemente observados por Guimarães et al. (2012). Nesse estudo, o carvacrol inibiu o infiltrado de neutrófilos induzidos pela carragenina para a cavidade pleural de camundongos. Por sua vez, a redução da contagem de mononucleares promovida pelo IPC está de acordo com o observado por Guimarães et al. (2012) para o carvacrol, em doses que se equiparam.

A importância do efeito inibitório do IPC sobre o número de mononucleares, sem alterar a quimiotaxia de polimorfonucleares, pode ser considerada menos expressiva, além de ser de difícil entendimento, considerando-se os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de migração para o foco inflamatório, pois no

tempo experimental avaliado neste estudo (6 h) o perfil celular de migração é predominante de polimorfonucleares. Contudo, algumas especulações podem ser feitas, como a sugestão de que o IPC poderia exercer algum efeito citotóxico sobre as células mononucleares impedindo sua migração, ou ainda, a possibilidade de que o IPC interferiria mais especificamente na produção de citocinas quimiotáticas para monócitos, como a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) (YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Para confirmar estas possibilidades outros estudos são necessários.

Em relação a sugestão do efeito citotóxico do IPC, foi utilizado o método de redução de MTT, que é comumente empregado na avaliação da citotoxicidade de extratos, frações e substâncias naturais e/ou sintéticas. Como descrito previamente por Mosmann (1983), esse método de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato MTT a cristais de formazana na mitocôndria da célula, servindo como indicativo da viabilidade e proliferação celular, uma vez que a quantidade de formazana formada é diretamente proporcional ao número de células vivas (VAN MEERLOO et al., 2011).

Os resultados obtidos com o IPC mostraram que mesmo nas elevadas concentrações testadas (até 100 µg/mL, aproximadamente 0,47 mmol/L) não houve alteração da viabilidade de macrófagos peritoneais; ao contrário, na concentração de 50 µg/mL houve um aumento da incorporação do MTT pelos macrófagos, o que sugere uma possível ação do IPC em induzir as enzimas mitocondriais que fazem o metabolismo do MTT. De qualquer forma, o maior significado deste resultado é a falta de citotoxicidade do IPC, nas concentrações testadas, sobre os macrófagos peritoneais murinos. Este achado sugere que outros mecanismos devem contribuir para a redução da contagem de mononucleares na cavidade pleural, que não o efeito citotóxico. Contudo, é interessante ressaltar que o IPC foi capaz de reduzir o influxo de neutrófilos para a orelha dos camundongos e as diferenças entre os resultados no edema de orelha e na pleurisia podem possuir relação com a via de administração utilizada (tópica e sistêmica, respectivamente).

De maneira geral, os resultados deste estudo sugerem o efeito antioxidante (in vitro), a atividade antinociceptiva (pela redução do tempo de lambida no teste da formalina e da inibição da hiperalgesia induzida por carragenina, sem afetar a atividade locomotora) e a atividade anti-inflamatória do IPC (pela redução do edema de pata de



rato e da migração de leucócitos mononucleares na pleurisia em camundongos, ambos induzidos por carragenina, bem como da atividade de MPO nas orelhas expostas ao TPA). Embora os resultados obtidos apontem para a redução da produção de mediadores inflamatórios, estudos futuros poderão elucidar o mecanismo pelo qual o IPC induz estes efeitos e identificar os possíveis mediadores envolvidos.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o IPC possui efeitos antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório em roedores, sendo de interesse para o tratamento de condições inflamatórias e dolorosas, bem como para futuras abordagens experimentais que visem melhorar a estrutura química deste composto para as referidas atividades.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, MD. (In press) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2012.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SANCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v.68, p. 202-209, 2007.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.
- ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S. & TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**,v.1000, p. 40-56, 2004.
- AMARAL, J.F.; SILVA M.I.G.; NETO P.F.T.; MOURA B.A.; MELO C.T.V.; ARAUJO, F.L.O.; DE SOUSA D.P.; VASCONCELOS S.M.; SOUSA F.C.F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p. 1217–1220, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.
- AZZI, K.J.A. DAVIES, F. KELLY. Free radical biology—terminology and critical thinking, **FEBS Letters**, vol. 558, p. 3–6, 2004.
- BADARINATH, A.V.; RAO, K. M.; CHETTY, C.M.S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T.V.S.; GNANAPRAKASH, S. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, n.2, p. 1276-1285, 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n.2, p. 446–475, 2008.
- BANKS, W.A.; KASTIN, A.J. Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems., **Life Sciences**, v.48, n.25, p. 117-121, 1991.
- BARAK, M.; KATZ, Y. Microbubbles-Pathophysiology and clinical implications. **Chest**, v.128, n.4, p. 2918-2932, 2005.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139,n.2, pp. 267–284, 2009
- BATTAGLIA, G. & RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 277, n. 2, 302-12, 1988.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, vol. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BEESON, P.B., Temperature elevating effect of substance obtained from polyorphonuclear leukocytes, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 27, p. 524, 1948.

BIRRELL, G. J.; MCQUEEN, D. S.; IGGO, A., COLEMAN, R. A. & GRUBB, B. D. PGI<sub>2</sub>- induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. **Neurosciences Letters**, v. 124, n. 1, p. 5-8, 1991.

BJORKMAN, D.J.; Nosteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. **The American Journal of Medicine**, v.101, n.1A, p.25-32, 1996.

BLATEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of this regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v.11, n.1, p. 194-223, 2006.

BOLLER, S. **Atividade antiinflamatória tópica do extrato e compostos isolados da Baccharis illinita DC, (Asteraceae) em camundongos.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2007.

BONICA, J.J.; YAKSH, T.; LIEBESKIND, J.C., PECHNICK, R.N., DEPAULIS, A. Biochemistry and modulation of nociception and pain. em: Bonica, JJ - **The Management of Pain**, 2nd Ed, vol 1, Malvern, Lea & Febiger,; 95-121, 1990.

BONJARDIM, L.R.; CUNHA, E.S.; GUIMARÃES, A.G.; SANTANA M. F, OLIVEIRA M. G.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S. C. SANTOS, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR L.J. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of p-cymene in mice. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 67, n. 1-2, p.15-21, 2012.

BOTELHO, M.A., RAO, V.S., MONTENEGRO, D., BANDEIRA, M.A., FONSECA, S.G., NOGUEIRA, N.A., RIBEIRO, R.A., BRITO, G.A. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 442-449, 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, M D; CHRISTENSEN, M D; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAUGHLER, J.M.; DUNCAN, L. A.; CHASE, R. L. The involvement of iron in lipidperoxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 10282-1289, 1986.

BRITO, R. G.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS J. S.; SANTOS, M. R, DE SOUSA, D. P.; BADAUE-PASSOS D. JR, DE LUCCA, W. J. R, BRITO, F. A, BARRETO, E.O, OLIVEIRA, A.P, QUINTANS-J L. J. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces

nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n.4, p. 637-44, 2012.

CHA D.S.; EUN, J.S.; JEON, H.; Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, n.2, p. 305–312, 2011.

CHO, S.; CHOI, Y.; PARK, S.; PARK T. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v. 23, n.2, p.192-201,2012.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, cap. 3, p. 50-88, 1999.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **The Journal of Pain**, v. 1, n.3, supplement 1, p. 35-44, 2000.

COTRAN, R. S, KUMAR, V., COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J. C. & LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n.5, p. 359-71, 2005.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 136, n.2, p. 147-157, 1993.

CUNHA, F. Q., LORENZETTI, B. B., POOLE, S. & FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, n.2, 765-7, 1991.

CUNHA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B. & FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n.3, p.660-664, 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA I.F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; JR., SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q. FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,v. 102, p. 1755-1160, 2005.

CYBULSKY, M. I.; I. G.; COLDITZ, MOVAT H. Z. 1986. The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. **The American Journal of Pathology**, v. 124, n.3, p.367-372, 1986.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, São Paulo, v. 5, n. 5, p. 355- 361, 2002.

DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ R.; ANDRADE L. N.; SOUSA, D. P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. **Molecules**, v. 18, p. 1227-1254, 2013.

DE SOUSA, D. P.; CAMARGO, E.A.; OLIVEIRA, F.S.; DE ALMEIDA, R.N. Anti-inflammatory Activity of Hydroxydihydrocarvone. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of bioscience**, v.65, n.9-10, p.543-550, 2010.

DE SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.6, n.3, p.2233-2252, 2011.

DE VICENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VICENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. **Fitoterapia**, v.75, p. 801–804, 2004.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M.. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, 1989.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v.89, n.2, p.271-277, 1986.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, n.1, p.15-29, 1971.

DINARELLO, C. A., Biology of Interleukin-1. **Journal of Endotoxin Research**, v.10, p. 201-22, 2004.

DIP, E. C.; PEREIRA, N. A.; FERNANDES, P. D. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta* shott in mice. **Toxicon**, v. 43, p. 729-735, 2004.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p.421-431, 1990.

DRAY, A. & BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **Trends in Pharmacology Science**, v.14, n.8, p. 287-290, 1993.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.75, n.2, p.125-31,1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.75, n.6, p. 704-712, 1997.

DUBUISSON D, DENNIS S. G. Formalin test – quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain-stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, n.2, p. 161-174, 1977.

DUTRA, R. C., TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; ORLANDO, V. S.; PIMENTA D. S. Investigation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Echinodorus grandiflorus* rhizomes methanol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.16, n.4, p.469-474, 2006.

EK, M.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T.; ERICSSON, A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 beta: role of endogenous prostaglandins. **The Journal of Neurosciences**, v.18, n.22, p. 9471-9479, 1998.

ENGBLOM, D., EK, M.M., SAHA, S., ERICSSON-DAHLSTRAD, A., JAKOBSSON, P.J., LOMQVIST, A. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain-barrier. **Journal of Molecular Medicine**, v.80, n.1, p.5-15, 2002.

ENOMOTO, S.; ASANO, R.; IWAHORI, Y.; NARUI, T.; OKADA, Y. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.307-310, 2001.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN. **Methods in Enzymology**, L. Packer, ed, v. 186, p. 407-421, 1990.

FAN, W., HUANG, F., WU, Z., ZHU, X., LI, D., HE, H., The role of nitric oxide in orofacial pain. **Nitric Oxide**, v.26, p.32–37, 2012.

FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATEIS, C M. Preoptic  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ -noradrenergic agonist induce, respectively, PGE2-independent and PGE2-dependent hyperthermic responses in guinea pig. **American Journal of Physiology**, v.286, n.6, p. R1156-R1166, 2004.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCÍA, M.D.; SÁENZ, M.T.; VILLAR A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n.11, p. 1533-1539, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B.; Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal Pharmacology**, v. 141, n.5, p. 787-794, 2004.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v.46, Suppl 1, p. 1-9, 1993.

GABOR, M., RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTINEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v.58, p.537–552, 2009.

GARIN, A.; PROUDFOOT, A. E. I.Chemokines as targets for therapy. **Cell Research** 317, 602–612. 2011.

GELAIN, D. P.; SOUZA, L. F.; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. Extracellular inosine is modulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protects Sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. **Free Radical Research**, v. 38, n. 1, p. 37-47, 2004.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**, v.3, p.104-416, 2004.

GIVALOIS, L., DORNAND, J., MEKAOUICHE, M., SOLIER, M.D., BRISTOW, A.F., IXART, G., SIAUD, P., ASSENMACHER, I., BARBANEL, G., Temporal cascade of plasma level suges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n.1, p. R164-70, 1994.

GOMEZ, R.; POR, E. D.; BERG, K. A.; CLARKE, W. P.; GLUCKSMAN, M. J.; JESKE, N. A. Metallopeptidase inhibition potentiates bradykinin-induced hyperalgesia. **Pain**, v.152, p. 1548–1554, 2011.

GRABMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, E. F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with a-tocopherol and b-carotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**,v.12, p.416-423, 2005.

GRONEBERG, D. A.; WITT, H.; ADECOCK, I. M.; HANSEN, G.; SPRINGER, J. Sands as intracellular mediators of airway inflammation. **Experimental Lung Research**, v. 30, n. 3, p. 223-250, 2003.

GUALILO, O.; EIRAS, S.; LAGO, F.; DIÉGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sciences**, v. 67, p. 2433-2441, 2003.

GUIMARÃES, A. G., OLIVEIRA, G. F., MELO M. S.; CAVALCANTI, S. C.H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS J. P. A.; ROCHA R. F. ; MOREIRA, J. C. F.; ARAUJO, A. A. S.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR L. J. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.107, n.6, p. 949–957, 2010.



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

GUIMARÃES, A.G., XAVIER, M. A., DE SANTANA, M. T.; CAMARGO, E. A. SANTOS, C.A., BRITO, F.A., BARRETO EO, CAVALCANTI SC, ANTONIOLLI AR, OLIVEIRA RC, QUINTANS-JÚNIOR LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n.3, p.253-63, 2012.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, 1990.

GUTTERIDGE, J. M; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 561-564, 2010.

HALLETT, M. B.; LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. **Immunology Today**, v. 16, n. 6, p. 264-8, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-55, 2004.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemistry Journal**, v.265, p. 621-36, 1990.

HENSEN, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1179-1181, 2005.

HERWIG, R; GLODNY, B.; KUHLE, C.; SCHLUTER, B.; BRINKMAN, O. A.; STRASSER, H.; SENNINGER, N.; WINDE, G. Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. **Disease Colon Rectum**, v. 45, n. 4, p. 514-521, 2002.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M. HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H.; Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v.51, n.1, p.132-139, 2010.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v.51, n.1, p.132-139, 2010.

HUNSKAAR, S, HOLE K. The formalin test in mice – dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v.30, n.1, p.103-114, 1987.

INOUE, K.; TAKANO, H. Therapeutic effects of inhaled 1,8-cineole on allergic airway inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.108, n.5, p.295-6, 2011.

JEONG, H. J.; KOO, H.N.; NA, H.J.; KIM, M.S.; HONG, S.H.; EOM, J.W.; KIM, K.S.; SHIN, T.Y.; KIM, H.M. Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. **Cytokine**, v. 18, n.5, p. 252-259, 2002.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v.7, n.3, p.256-257.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 749-759, 2005.

KAUR, G.; HAMID, H.; ALI, A.; ALAM, M. S.; ATHAR, M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 285-292, 2004.

KHANUM, S. A.; SHASHIKANTH, S.; DEEPAK, A. V. Synthesis and anti-inflammatory activity of benzophenone analogues. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, p. 211-222, 2004.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.1-12, 2008

KLIR, J.J.; ROTH, J.; SZELENYI, Z.; MCCLELLAN, J.L.; KLUNGER, M.J. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. **The American Journal of Physiology**, v.265, p.R512- R517, 1993.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, n.6, p. 1157- 1162, 2010.

KOO, H. J.; SONG, Y.S.; KIM, H.J.; LEE, Y.H.; HONG, S.M.; KIM, S.J.; KIM, B.C.; JIN, C.; LIM, C.J.; PARK, E.H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, p. 201-208, 2004.

KORDE, S.; SRIDHARAN, G.; GADBAIL, A.; POORNIMA, A. Nitric oxide and oral cancer: A review. **Oral Oncology**, v.48, p. 475-483, 2012.

KRAYCHETE D.L C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE C. M. L.; Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira Reumatologia**, v.46, n.3 ,2006.

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

KUMAR, R.; CLERMONT, G.; VODOVOTZ, Y.; CHOW, C. C. The dynamics of acute inflammation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 230, p. 145-155, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Conran Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7. Ed. Elsevier, 2005.

LAU, C. W.; CHEN, Z. Y.; WONG, C. M.; YAO, X. H, Z.; HUANG, Y. Attenuated endothelium-mediated relaxation by acetoaside in rat aorta: Role of endothelial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Life Sciences**, v. 75, p. 1149-1157, 2004.

LAUPATTARAKEN, P.; HOUGHTON, P. J.; HOULT, J. R. S.; ITHARAT, A. A evaluation of activity to inflammation of plants used in Thailand to treat arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 207-215, 2003.

LEVINE, J. D., TAIWO, Y. O., COLLINS, S. D. & TAM, J. K. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. **Nature**, v.323, n. 6084, p.158-160, 1986.

LI, R.; CHEN, B.; WU, W.; BAO, L.; LI, J.; QI, R. Ginkgolide B suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression via blocking nuclear factor-kappaB activation in human vascular endothelial cells stimulated by oxidized low-density lipoprotein. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 110, n.3, p. 362-369, 2009.

LIMA, M.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SANTANA, W. A.; MARTINS, K. C., PEREIRA, S. M. B.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v.699, n.1-3, p.112-117, 2012.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as Phospholipase A2 Inhibitors: Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II Phospholipase A2. **Inflammation**, v. 21, n. 3, p.347-356, 1997.

LIU, H.; MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release form Primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 386, p. 721-724, 1997.

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

LUHESHI, G. N., Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.856, p.83-89, 1998.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p. 1182-1190, 2005.

MACMILLIAN, R. M.; FOSTER, S. J. Leucotriene B4 and inflammatory disease. **Agents and Actions**, v. 24, n. 1/2, p. 114-119, 1988.

MAIA, R. M.; MOURA, C. W. N.; BISPO, V. S.; SANTOS, J. L. A.; SANTANA, R. S.; MATOS, H. R. Evaluation of nitric oxide (NO) scavenging for the metanol extract

of the alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.4, 2010.

MC DERMOTT, M. F. TNF and TNFr biology in health and disease. **Cellular and Molecular Biology**, v.47, n.4, p. 619-635, 2001.

MCCORD, J.M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 2,p. 307–310, 1986.

MEYER, R. A., CAMPBELL, F.N.; RAJA, S. N. **Peripheral neural mechanisms of nociception. em: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain**, 3 Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, p.13-44, 1994.

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

MING, W. J.; BERSANI, L.; MANTOVANI, A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leucocyte. **Journal of Immunology**, v. 138, n.5, p. 1469-1474, 1987.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v.84, n.1-2, p.41-47, 1998.

MOORE, A.R., AYOUB, S.S., SEED, M.P. Cyclooxygenase enzymes and their products in the carrageenan-induced pleurisy in rats. **Methods in Molecular Biology**, v. 644, p. 201–205, 2010.

MORITA, K.; MORIOKA, N.; ABDIN, J.; KITAYAMA, S.; NAKATA, Y. & DOHI, T. Development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia by intrathecally administered platelet-activating factor in mice. **Pain**, v.111, n.3, p.351-359, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Jounal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NIGROVIC, P. A.; LEE, D. M. Mast cells in inflammatory arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n.1, p. 1-11, 2005.

NONATO, F.R.; SANTANA, D.G.; DE MELO F.M.; DOS SANTOS, G.G.; BRUSTOLIM, D.; CAMARGO, E.A.; DE SOUSA D.P.; SOARES, M.B.; VILLARREAL, C.F. Anti-inflammatory properties of rose oxide. **International Immunopharmacology**, v.14, n.4, p.779-784, 2012.

OKA, T., Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: the role de prostaglandin E (EP) receptors, **Frontiers in Bioscience**, v.9, p. 3046-3057, 2004.

OKAYAMA, Y.; KAWAKAMI, T. Development, Migration, and Survival of Mast Cells. **Immunological Research**, v. 34, n. 2, p. 97–115, 2006.

OLIVEIRA F. S. DE SOUSA, D. P., DE ALMEIDA, R. N. Antinociceptive Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.4, p.588-591, 2008.

OSADEB, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 19 – 24, 2003.

OSAKA, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> fever mediated by inhibition of the GABAergic transmission in the region immediately adjacent to the organum vasculosum of the lamina terminalis. **Pflügers Archives: European Journal of Physiology**, v.456, n.5, p.837-846, 2008.

PELUFFO, G.; RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovasc Research**, v.75, p.291-302, 2007.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. **Nature Reviews. Molecular and Cellular Biology**, v. 8, p. 49–62, 2007.

POOLE, S., CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. Cytokines and Pain. (eds L. R. Watkins & S. F. Maier), pp. 59-87. Springer, Berlin, 1999.

PUIGNERO, V., QUERALT, J. Effect of topically applied cyclosporin A on arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation in mouse ear. **Inflammation**, v. 21, n.3, p. 357-369, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7<sup>a</sup> Ed. Editora Elsevier, 2011.

RAO, Y. S.; CURRIE, J. L.; SCAHFFER, A. F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) - and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n.6, p. 723-741, 1993.

RAYCHAUDHURI, A.; CHERTOCK, H.; CHOVAN, J.; JONES, L.S.; KIMBLE, E.F.; KOWALSKI, T.J.; PEPPARD, J.; WHITE, D.H.; SATOH, Y.; ROLAND, D. Inhibition of LTB<sub>4</sub> biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn Schmiedebergs' Archives of Pharmacology**, v. 355, n. 4, p. 470-474, 1997.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. C. Involvement of resident macrophages and mast cells in writhing nociceptive response induced by zymosan acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n.1, p. 111-118, 2000.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R.N., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.656 - 663, 2012.

ROBINSON, V. K. Peroxynitrite inhibits inducible (type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v.30, p.986-991, 2001.

ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H., **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag, p.6-5, 1978.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A.I.; SZEKELY, M. Neural Route of Pyrogen Signaling to the brain., **Clinical Infectious Diseases.**, v.31, S162-S167, 2000.

ROTH, J., CONN, C.A., KLUGER, M.J., ZEISBERGER, E., Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs., **American Journal of Physiology**, v.265, R653-R658, 1993.

RYAN, G.B., MAJNO, G. Acute inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 86, n. 1, p. 184-271, 1977.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v.285, n.2, p. 109-115, 2009.

SAHA, R. N. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 154-163, 2006.

SALMINEN A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.19, p.2979-2999, 2008.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n.4, p. 829-838, 1996.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**. Rockville Pike. v.89. n.2. p.707 – 758, 2009.

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.

SANTOS, F.A.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; ARAÚJO, R.P.; JÚNIOR, R.C.P.L.; RAO, V.S.N. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.579–584, 2004.

SAPER, C.B.; BREDER, C.D. The neurologic basais of fever. **The New England Journal of Medicine**, v.330, n.26, p.1880-1886, 1994.

SCARPIGNATO, C.; HUNT, R. H. Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Related Injury to the Gastrointestinal Tract: Clinical Picture, Pathogenesis, and Prevention. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, n.3, p. 433–464, 2010.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E<sub>2</sub>. **The Journal of Physiology**, v.403, p. 91-104, 1988.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice Research & Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 12-25, 2006.

SIELGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **The Journal of Psychology**, v.21, p.227-236, 1946.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SPILLER, R. C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. **Best Practice and Research Gastroenterology**, v. 18, n. 4, p. 641-661, 2004.

STEINER, A.A.; IVANOV, A.I.; SERRATS, J.; HOSOKAWA, H.; PHAYRE, A.N.; ROBBINS, J.R.; ROBERTS, J.L.; KOBAYASHI, S.; MATSUMURA, K.; SAWCHENKO, P.E.; ROMANOVSKY, A.A. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. **Plos Biology**, v.4, n.9, p. 284, 2006.

SU, Y.W.; CHAO, S.H.; LEE, M.H.; OU, T.Y.; TSAI, Y.C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production in macrophages. **Planta Medica**, v.76, n.15, p.1666-71, 2010.

SU, Y.W.; CHAO, S.H.; LEE, M.H.; OU, T.Y.; TSAI, Y.C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production in macrophages. **Planta Medica**, v.76, n.15, p.1666-71, 2010.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS H.; RAD, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, p.662-680, 2007.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 853-859, dez., 2002.

URUÑUELA, A., SEVILLANO, S., MANO, A.M., MANSO, M.A., ORFAO, A., DIOS, I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1588, p. 159-164, 2002.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189 p. 41-54, 2003.

VAN MEERLOO, J.V.; KASPERS, G.J.; CLOOS J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v.731, p. 237–245, 2011.

VERRI, J.R.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, n.1, p.116-138, 2006.

VINEGAR, R., TRAUJ. J.F.; SELPH JL. Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, n.3, 711-714.; 1973.

VIRÁG L.; SZABÓ, E.; GERGELY, P.; SZABÓ, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology Letters**, V.140-141, p.113-124, 2003.

WALLACE, J.L. Nonsteroidal anti\_inflammatory drugs and gastroenteropathy: The second hundred years. **Gastroenterology**, p.112, n.3, p.1000-1016, 1997.

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, G. H.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362–1370, 2010.

WARD, PA. The inflammatory response – An overview. In: SERHAN, CN, WARD, PA, GILROY DW. **Fundamentals of Inflammation**. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge University Press., cap. 1, p. 1-16, 2010.

WATKINS, L.R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms. **Life Sciences**, v.57, n.11, p.1011-26, 1995.

WILKINSON, P.C. **Cellular accumulation and inflammation**. In: Textbook of Immunopharmacology. DALE, M. M.; FOREMAN, J. C.; FAN, D. (eds.), 3a edição, Oxford, **Blackwell Scientific Publication**, cap. 19, p. 218-31, 1994.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE A.R.; COLVILLE-NASH P.R.; GILROY D. Resolution of inflammation. **International International Journal of Immunopharmacology**, v.22, n.2, p. 1131–1135, 2000.

WINTER, C.A.; RISLEY EA, NUSS GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p.544-547, 1962.



WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN B.; POOLE, S: Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumour necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**, v.121, n.3, p.417-424, 1997.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 441, n. 11 p. 1570–1579, 2010.

YOUNG, J. M.; DE YOUNG, L. M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In: Chang, J. Y., Lewis, A. J. (Eds.). *Modern Methods in Pharmacology 5. Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. Alan R. Liss, New York, NY. p. 215-231, 1989.

YOUNG, J.M. WAGNER, B.M.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n.1, p. 48-52, 1983.

ZHARKOV, D. O. DNA Oxidation. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, p. 77-81, 2013.

ZHONG, W.; CHI, G.; JIANG, L.; SOROMOU, L.W.; CHEN, N.; HUO, M.; GUO, W.; DENG, X.; FENG, H. p-Cymene Modulates In Vitro and In Vivo Cytokine Production by Inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B Activation. **Inflammation**. [Epub ahead of print] PubMed, 2012.

ZIMMERMAN, G.A.; ELSTAD, M.R.; LORANT, D.E.; MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., TOPHAN M.K., WEYRICH, A.S.; WHATLEY, R.E. Plateletactivating factor (PAF) signaling and adhesionin cell-cell interactions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 416, p. 269-304, 1996.

## ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação do Potencial Anti-inflamatório e Antipirético do Isopropóxi-carvacrol, em roedores**”, sob coordenação do **Prof. Dr. ENILTON APARECIDO CAMARGO** (protocolo **CEPA 09/2011**), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 19/04/2011.

São Cristóvão, 19 de abril de 2011.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Flavia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS

---

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”  
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE  
49100-000  
Fones: 3212 6661/6606