

ANDERSON BENTES DE LIMA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E
ANTIINFLAMATÓRIA DO 1-NITRO-2-FENILETANO,
PRINCIPAL CONSTITUINTE DA *Aniba canelilla***

BELÉM

2008

ANDERSON BENTES DE LIMA

AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO 1-NITRO-2-FENILETANO, PRINCIPAL CONSTITUINTE DA *Aniba canelilla*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do professor Dr. Pergentino José da Cunha Sousa.

Orientador: Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

Co-Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia

**BELÉM
2008**

ANDERSON BENTES DE LIMA

AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO 1-NITRO-2-FENILETANO, PRINCIPAL CONSTITUINTE DA *Aniba canelilla*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do professor Dr. Pergentino José da Cunha Sousa.

Banca Examinadora:

ORIENTADOR

1º EXAMINADOR

2º EXAMINADOR

Aprovado em: ____/____/____.

Este trabalho dedico:

A meus pais João Carlos Lopez de Lima e Maria Helena Bentes de Lima;
Ao meu irmão Emerson Bentes de Lima
E minha namorada Alessandra Souto Cardoso.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará.

A Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

Ao orientador, professor Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, pela orientação competente e pela amizade demonstrada em cada ensinamento e conselho durante esta caminhada.

Ao professor da Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos da UFPA José Guilherme Soares Maia por ter conceder o espaço físico e estrutura para o fracionamento do 1-nitro-2-feniletano.

A Joyce Kelly por ter realizado o fracionamento do 1-nitro-2-feniletano.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFPA por sua preciosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

A professora Gloria Emilia Petto de Sousa e toda sua equipa que foram importantes para a finalização deste estudo.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Helena, meu irmão, cujo amor e incentivo ajudaram na realização deste trabalho.

A minha namorada Alessandra Cardoso, por incentivar e compartilhar todos os momentos da minha vida e principalmente desse projeto com dedicação e amor.

Aos meus amigos, Christian, Edilberto, Maxwell, Luciana Bravim por me ajudarem nesse trabalho através do apoio, carinho e respeito que mantiveram por mim, além da amizade que foi se estreitando ao longo desse tempo.

Aos amigos do mestrado que participaram do processo de desenvolvimento desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa concedida.

Ao Instituto Evandro Chagas pela doação de animais.

Ao programa de biodiversidade PPBIO do Ministério da Ciência e Tecnologia pelo auxílio financeiro.

E, a todos aqueles que contribuíram de modo direto ou indireto, a realização desta dissertação.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

A *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez, conhecida popularmente como “casca-preciosa” é uma espécie da família Lauraceae que apresenta ampla distribuição na região amazônica. O chá das folhas e das cascas são utilizados na medicina popular como digestivo, carminativo e antiinflamatório. Neste estudo decidiu-se avaliar se esta atividade é devida a um de seus principais constituintes, o 1-nitro-2-feniletano. A amostra – obtida por purificação do óleo essencial de *Aniba canelilla* – possui 97,5% de 1-nitro-2-feniletano foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Química da UFPA. Nos modelos de nocicepção foram realizados os testes da contorção abdominal, placa quente e formalina. Enquanto que nos modelos de inflamação foram realizados a dermatite induzido pelo óleo de croton, edema de pata induzido por dextrana e carragenina e peritonite induzido pela carragenina. No teste de contorção abdominal induzido por ácido acético, o 1-nitro-2-feniletano nas doses de 15, 25 e 50 mg/kg reduziu de maneira significativa o número de contorções abdominais. No teste de placa quente ($55 \pm 0,5^\circ \text{C}$), o 1-nitro-2-feniletano nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg não induziu alterações no tempo de latência quando comparado ao grupo controle. No teste de formalina, o 1-nitro-2-feniletano nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu de maneira significativa o estímulo álgico na 2ª fase do teste. Além disso, a antinocicepção foi revertida pela naloxona na segunda fase. Na dermatite induzida pelo óleo de croton, o 1-nitro-2-feniletano nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu de maneira significativa o eritema em relação ao grupo controle (inibição de 73% e 79%, respectivamente). Nos edemas de pata induzido por carragenina e dextrana, o 1-nitro-2-feniletano foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema, nas doses de 25 e 50 mg/kg, em comparação com o grupo controle. Na peritonite induzida por carragenina, o 1-nitro-2-feniletano na dose de 25 mg/kg reduziu o número de células globais e o número de neutrófilos quando comparado ao grupo controle (inibição de 22,55% e 38,13%, respectivamente). Nossos resultados sugerem que o 1-nitro-2-feniletano tem atividade antinociceptiva e antiinflamatória, provavelmente, de origem periférica, além disso, os resultados sugerem que os receptores opióides estão envolvidos no efeito antinociceptivo do 1-nitro-2-feniletano.

Palavras-chave: *Aniba canelilla*; 1-nitro-2-feniletano; nocicepção; inflamação.

ABSTRACT

Aniba canellila is a large size tree found in Northern region of Brazil and largely used in folk medicine. The infusate of its leaves and bark skin is believed to be a good antispasmodic, antidiarrheic, anti-inflammatory, tonic agent and a good stimulant of digestive and the central nervous systems. This study was designed to evaluate the effects 1-nitro-2-phenylethane, main component of *Aniba canelilla*. We evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the 1-nitro-2-phenylethane which is the main component of essential oil of *Aniba canelilla*. For nociception models were designed the writhing test, hot plate test and formalin test. For inflammation models were designed the croton oil-induced ear edema, rat paw edema induced by carrageenan and dextran, and leucocyte and neutrophil migration on carrageenan-induced peritonitis. In the writhing test, the 1-nitro-2-phenylethane dosed at 15, 25 and 50 mg/kg reduced the abdominal writhes in a significant manner. In the hot plate test ($55 \pm 0.5^\circ \text{C}$), the 1-nitro-2-phenylethane dosed at 50, 100 and 200 mg/kg did not induced alterations in the latency time when compared to the control. In the formalin test, the 1-nitro-2-phenylethane dosed at 50 and 25 mg/kg reduced in a significant manner the second phase of the algic stimulus. In addition, its antinociception was reversed by naloxone in the second phase. The 1-nitro-2-phenylethane produced inhibition of rat paw edema induced by carrageenan and dextran in a dose-dependent manner at the doses of 25 and 50 mg/kg. Doses of 25 and 50 mg/kg caused a dose-dependent inhibition of croton oil-induced ear edema in mice (with inhibition of 73% and 79%, respectively). Pretreatment (60 min) of rats with 1-nitro-2-phenylethane (25 mg/kg) significantly decreased leucocyte and neutrophil migration on carrageenan-induced peritonitis (with inhibition of 22,55% and 38,13%, respectively). Our results suggest that 1-nitro-2-phenylethane has analgesic activity which, according to the tests employed, is probably of peripheral origin. The mechanism involved is not completely understood, however these results suggest that opioid receptors are involved in the antinociceptive action of the 1-nitro-2-phenylethane. Further, our results suggest that 1-nitro-2-phenylethane has anti-

inflammatory activity which, according to the tests employed, is probably of peripheral origin.

Keywords: *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-phenylethane, nociception, inflammation.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. PRODUTOS NATURAIS	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. FAMÍLIA LAURACEAE	17
2.2. <i>Aniba canelilla</i>	17
2.3. 1-NITRO-2-FENILETANO	19
2.4. INFLAMAÇÃO	19
2.5. DOR	21
2.6. MEDIADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	23
2.6.1. DERIVADOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	23
a) PROSTAGLANDINAS	23
b) LEUCOTRIENOS	25
2.6.2. AUTACÓIDES	25
a) SEROTONINA	25

b) HISTAMINA	26
2.7. NEUTRÓFILOS	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVOS GERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. MATERIAL BOTÂNICO	29
4.2. ANIMAIS	29
4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	30
4.4. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	30
4.4.1. ATIVIDADE ANALGÉSICA PERIFÉRICA	30
4.4.2. ATIVIDADE ANALGÉSICA CENTRAL	31
4.4.3. TESTE DE FORMALINA	31
4.5. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	32
4.5.1. DERMATITE INDUZIDA PELO ÓLEO DE CROTON	32
4.5.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-EDEMATOGÊNICA	32
a) EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA	32
b) EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	32
4.5.3. PERITONITE EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA	33
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.7. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES	34
4.8. APARELHAGEM E MATERIAIS UTILIZADOS	35
5. RESULTADOS	36
5.1. TOXICIDADE AGUDA DL ₅₀	36
5.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	37

5.2.1. ATIVIDADE ANALGÉSICA PERIFÉRICA_____	37
5.2.2. ATIVIDADE ANALGÉSICA CENTRAL_____	37
5.2.3. TESTE DE FORMALINA_____	38
5.3. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA_____	40
5.3.1. DERMATITE INDUZIDA PELO ÓLEO DE CROTON_____	40
5.3.2. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA_____	40
5.3.3. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA_____	41
5.3.4. PERITONITE EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA__	42
6. DISCUSSÃO_____	44
7. CONCLUSÃO_____	48
8. REFERÊNCIAS_____	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: *Aniba canelilla*, flores e folhas _____ 18
- Figura 2: 1-nitro-2-feniletano _____ 18
- Figura 3: Local de administração da carragenina e dextrana na região intraplantar de ratos _____ 33
- Figura 4: Determinação da DL₅₀ em camundongos através da equação da reta. No eixo das ordenadas: valores dos probitos, correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abscissas, as doses de 1-nitro-2-feniletano em escala logarítmica. _____ 36
- Figura 5: Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de Ácido Acético 0,6% em camundongos _____ 37
- Figura 6: Efeitos do 1-nitro-2-feniletano sobre o estímulo nociceptivo térmico (55± 0,1°C) induzido em camundongos _____ 38

Figura 7: Efeito do 1-nitro-2-feniletano, dependente de concentração, sobre a primeira fase do estímulo nociceptivo induzido por Formalina 1%__

_____39

Figura 8: Efeito do 1-nitro-2-feniletano, dependente de concentração, sobre a segunda fase do estímulo nociceptivo induzido por Formalina 1%__

_____39

Figura 9: Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de croton em camundongos_____ -

_____40

Figura 10: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) administrado por via oral, em relação ao efeito antiedematogênico no teste de edema de pata induzido por dextrana em ratos_____

_____41

Figura 11: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) administrado por via oral, em relação ao efeito antiedematogênico no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos_____

_____42

Figura 12: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) administrado por via oral, em relação ao efeito sobre a migração de células totais na peritonite induzida por carragenina em ratos_____

_____43

Figura 13: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) administrado por via oral, em relação ao efeito sobre a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina em ratos_____

_____43

Tabela 1: Efeito do 1-nitro-2-feniletano nas contorções induzidas por Ácido Acético 0,6% _____

_____63

Tabela 2: Efeito do 1-nitro-2-feniletano no teste da placa quente em camundongos__

_____63

Tabela 3: Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a nocicepção induzida por Formalina 1% em camundongos_____

_____64

Tabela 4: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na dermatite induzida pelo óleo de croton_____

_____64

Tabela 5: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na migração de leucócitos induzida por carragenina._____

_____65

Tabela 6: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na migração de neutrófilos induzida por carragenina._____

_____65

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de variância
IL	Interleucina
IL-8	Interleucina 8
COX	Ciclooxygenase
IL-1β	Interleucina 1 β
DL₅₀	Dose letal para 50% dos animais tratados
E.P. M	Erro padrão da média
I.P.	Intraperitoneal
TXA₂	Tromboxano A ₂
IL-10	Interleucina 10
PGD₂	Prostaglandinas da série D ₂
PGF₂	Prostaglandinas da série F ₂
PGs	Prostaglandinas

PLA₂	Fosfolipase A ₂
5-LOX	5-lipoxigenase
PGE₂	Prostaglandinas da série E ₂
PGI₂	Prostaglandinas da série I ₂
PAF	Fator Ativador Plaquetário
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
V.O.	Via oral
P.O.	Per oral
S.C.	Subcutânea
NF-κB	Fator nuclear κ B
NOS	Sintetase do óxido nítrico
GMPc	Guanosina monofostato cíclico
AMPc	Monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina
BK	Bradicinina
LTB₄	Leucotrieno B ₄

1 Introdução

1.1 Produtos Naturais

A utilização de produtos naturais como matéria prima para a produção de substâncias com atividade biológica, especialmente os fármacos, tem sido extensamente relatado ao longo dos anos (PIETROVSKI, 2004).

Os produtos naturais representam fontes de diversidades moleculares na descoberta de drogas. Ainda permanece urgente a necessidade para identificar novos quimiotipos para conduzir o desenvolvimento em muitas áreas terapêuticas. Entre o desafio para a tentativa de diversidade de produtos naturais é preciso permanecer competitivo com substâncias sintéticas. Avanços significativos são realizados para a formação de enzimas adaptadas envolvidas na biossíntese de produtos naturais, além de novas estruturas que produzem substituintes não naturais (ZHANG, C. et al, 2006).

Enquanto os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos terapêuticamente aproveitáveis, o interesse no desenvolvimento de produtos naturais pela indústria farmacêutica tem declinado. Entretanto, os produtos naturais permanecem biologicamente validados e, como tal, devem proporcionar uma boa produção de opções terapêuticas. Se os produtos naturais são mais uma vez interesse de extensa descoberta de drogas no mundo, eles precisam ser utilizados ao alcance de conduzir novos padrões de produção terapêutica (QUINN et al, 2008).

Os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros), sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como GMPc, AMPc, proteínas quinases, etc.), na expressão e transcrição de fatores como AP-1, NF- κ B, e proto-oncogenes (c-jun, c-fos e c-myc), e na expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenase (COX-2), citocinas (IL- β , TNF- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO et al, 2003).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Deste modo, o emprego de

técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000).

A partir da medicina popular, foram realizados estudos com o óleo essencial de *Aniba canelilla* no laboratório de Farmacodinâmica da Universidade Federal do Pará, nos quais foram demonstrados atividades antinociceptiva e antiinflamatória daquele. Portanto, decidiu-se avaliar se estas atividades são devido a um de seus principais componentes, o 1-nitro-2-feniletano.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Família Lauraceae

A Lauraceae é uma importante família de árvores e arbustos com registro que se estende ao período Cretáceo (HU et al, 2007). A família Lauraceae é constituída por 30 gêneros, com distribuição marcadamente tropical e subtropical, com ocorrência em todo mundo, especialmente as florestas centro e sul-americanas e, em sua maioria, espécies lenhosas arbóreas. As espécies aromáticas de Lauraceae estão compreendidas principalmente entre os gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Licaria* e *Dicypellium* (MARQUES, 2001).

O gênero *Aniba* compreende cerca de 41 espécies cujos representantes se encontram em sua maioria na Amazônia. Algumas espécies são exploradas para a preparação de produtos medicinais, óleos essenciais, e outras que são considerados potencialmente no lenho e na casca (MELO et al, 2006).

Uma revisão da literatura revelou que a destilação da madeira de *Aniba* spp cresceu na Amazônia brasileira. Ela é conhecida popularmente como óleo de pau-rosa. Toxicidade bacteriana e fúngica foram descritos para os óleos. Outros componentes presentes no gênero *Aniba* incluem os alcalóides, neoligninas e flavonóides, sem atividade antimicrobiana relatada (KLAUSMEYER et al, 2004).

Foi demonstrado que a *Aniba riparia*, a qual é conhecida popularmente no Brasil como “louro” apresenta atividade sobre o sistema nervoso central, com efeitos ansiolíticos, demonstrando elevada confusão e dificuldade motora em camundongos (MELO et al, 2006).

Simic et al (2004) mostraram que a atividade antifúngica do óleo essencial *Aniba roseadora* era devido à presença do linalol.

2.2 – *Aniba canelilla*

Segundo PINTO (1995), o primeiro contato com a *Aniba canelilla* foi obra do acaso, quando os irmãos Francisco e Gonzalo Pizarro ouviram uma história fantástica de que existia uma terra do outro lado da muralha andina onde a canela (*Cinnamomum zeylanicum*) crescia por profusão.

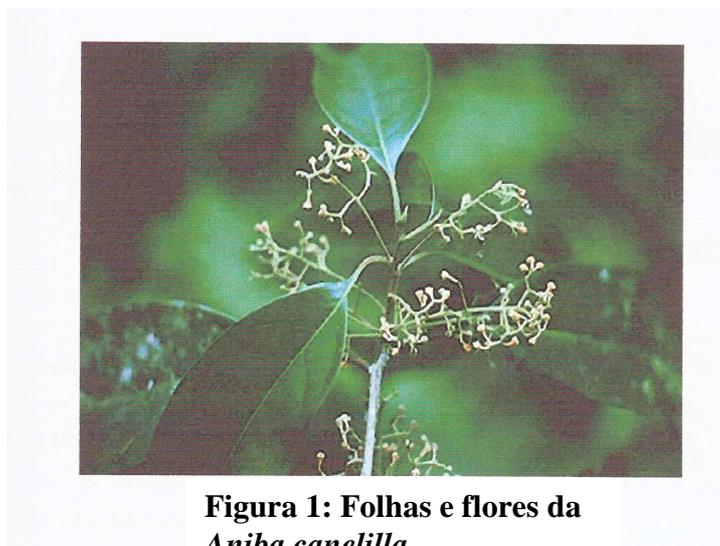
Esta possibilidade os fez imaginar que poderiam romper o monopólio da canela, a qual, na época estava nas mãos dos portugueses e era a especiaria mais procurada no mercado europeu, tornando seu comércio bastante lucrativo (PINTO, 1995).

Nesta tentativa, Gonzalo Pizarro saiu à procura de canela a frente de um exército de 80 espanhóis e avançou a pé, mata adentro, na região Amazônica. Após dois meses de busca Pizarro e seus homens julgaram ter encontrado algumas árvores de canela e ter findado a busca, mas foram traídos pelo olfato, pois o aroma da planta encontrada muito se assemelhava ao da canela. Na realidade não se tratava do *Cinnamomum zeylanicum*. Pizarro havia feito o primeiro contato com a casca preciosa, a *Aniba canelilla* (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1978).

A *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez (Figura 1), conhecida popularmente como casca-preciosa, casca-do-maranhão, canela-cheirosa, folha preciosa, pau cheiroso, é uma espécie da família Lauraceae que apresenta ampla distribuição na região amazônica. O chá das folhas e cascas é utilizado na medicina popular como digestivo, carminativo e antiinflamatório (MAIA, ZOGHBI & ANDRADE, 2001).

No óleo essencial da casca da *Aniba canelilla* foi avaliada a função gastrointestinal no músculo liso do íleo de cobaio, promovendo a inibição das contrações induzidas por potássio, acetilcolina e histamina e, revertendo às contraturas induzidas por potássio e tetraetilamônio, demonstrando, deste modo, uma atividade antiespasmódica (SOUSA et al., 2004).

Este mesmo óleo quando administrado em ratos normotensos apresentou efeito hipotensor devido a um relaxamento vascular ativo, sem interferir com o tono simpático, a bradicardia pareceu depender da presença de um impulso parassimpático funcional e operacional para o coração (LAHLOU et al, 2005).



Fonte: <http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo10.htm>

2.3 1-nitro-2-feniletano

Do óleo essencial de *Aniba canelilla* foi isolado e identificado o único nitro derivado odorífero conhecido até hoje, o 1-nitro-2-feniletano que se encontra em todos os órgãos da planta, além do eugenol, metileugenol e safrol. A presença de 1-nitro-2-feniletano distingue a espécie *Aniba canelilla* das demais, em toda a família Lauraceae (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).

O componente principal do óleo essencial de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez, o 1-nitro-2-feniletano, é o responsável pelo odor de canela. O percentual deste componente na *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez difere de acordo com a estação do ano. No período chuvoso, o 1-nitro-2-feniletano atinge valores próximos de 95%. Enquanto na época seca, o 1-nitro-2-feniletano diminui para 39% (TAVEIRA et al., 2003).

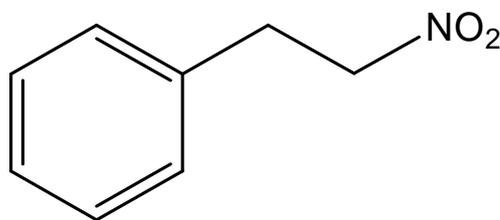


Figura 2: 1-nitro-2-feniletano

2.4 Inflamação

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ter natureza química, física ou biológica (ZHOU et al., 2007).

A inflamação aguda em indivíduos normais é normalmente um mecanismo de proteção localizada em resposta a invasão microbiana, trauma/injúria ou estímulo químico. Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar a diversas desordens que formam as patologêses mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN & CHIANG, 2004).

O acúmulo e a ativação de leucócitos são as maiores desordens inflamatórias. Existe grande distância entre o controle de eventos pelo mediador químico endógeno e a resposta do hospedeiro. Estes pequenos sinais químicos regulam o tráfico de leucócitos como os sinais cardinais da inflamação – são eritema, dor, calor, edema e perda de função da área lesionada. Estes sinais são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios. Há o aumento do fluxo sanguíneo na área lesada produzindo calor e eritema. Com aumento da temperatura, as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. O edema surge com aumento da permeabilidade (VERGNOLLE, 2008).

Esses efeitos são estabelecidos por eicosanóides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta de interesse na inflamação. Nos anos recentes, o alcance e o conjunto de mediadores químicos têm sido identificados consideravelmente. Esse conjunto inclui novos mediadores, novas citocinas (interleucina-10, fator de crescimento β), gases (óxido nítrico), como também novas funções para nucleosídeos e nucleotídeos (SERHAN & CHIANG, 2004).

Os mediadores da inflamação, portanto, são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos, citocinas, etc). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU et al., 2007).

Além disso, muitos mediadores inflamatórios provocam mudanças na excitabilidade do neurônio. Entre os mediadores envolvidos estão: histamina, serotonina, adenosina, bradicinina, citocinas (interleucina-1-beta, interleucina-6), leucotrienos, nervo de crescimento neural, prostaglandinas, óxido nítrico e mais recentemente as serinas proteases. Esses mediadores induzem despolarização da membrana, diminuição na condutância da membrana, elevação da excitabilidade ou supressão da hiperpolarização após os potenciais de ação. Os mediadores inflamatórios provocam ativação direta sobre reflexo os nociceptores periféricos, causando hipersensibilidade imediata (VERGNOLLE, 2008).

Os principais componentes para o desenvolvimento da inflamação são: (i) vaso dilatação; (ii) aumento da permeabilidade vascular; (iii) ativação e adesão celular; (iv) e coagulação (SAYERS, 2002).

O resultado da ativação de leucócitos para migrarem para o tecido é atuarem contra agentes nocivos. Isto é uma resposta benéfica “normal” que é essencial para a sobrevivência, além de reparar e curar o tecido. Os eventos celulares envolvem a adesão de leucócitos à parede do endotélio e subsequente migração de neutrófilos para o interior dos tecidos (SAYERS, 2002).

Os efetores da resposta inflamatória são citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e várias interleucinas (ILs). As citocinas são produzidas por uma variedade de células envolvidas na resposta inflamatória, incluindo macrófagos, neutrófilos de células endoteliais, os quais têm uma variedade de efeitos, inserindo expressão da molécula de adesão, quimiotaxia e ativação de outras vias inflamatórias (coagulação, complemento, cininas e fibrinólise). Esta resposta local é firmemente controlada pela produção de interleucinas antiinflamatórias (IL-10) e antagonista endógeno (SAYERS, RD, 2002).

O fator nuclear κ B (NF- κ B) representa a família de fatores de transcrição eucariótica, regulados pela expressão de genes envolvidos em proliferação celular, resposta inflamatória e adesão de células (NIEDERBERGER et al, 2001).

A ativação do NF- κ B foi relatada para induzir transcrição de múltiplos mediadores pro-inflamatórios, como o iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-1 β , os quais são envolvidos na patogenia da doença inflamatória (HUTTI et al, 2007).

Devido à função crítica do NF- κ B na expressão do gene inflamatório, o NF- κ B é alvo corrente no tratamento de várias doenças inflamatórias. Drogas antiinflamatórias demonstraram inibição da expressão de citocinas inflamatórias pela inibição da via da ativação de NF- κ B (HAYDEN & GHOSH, 2004). Portanto, um inibidor do NF- κ B é uma droga terapêutica em potencial na aplicação clínica para regular a resposta imune em doença inflamatória (HUTTI et al, 2007).

2.5 Dor

A dor é uma sensação de experiência desagradável que acontece quando o tecido é lesionado. Deste modo, a sensação de dor protege o corpo de uma possível ameaça ou lesão. A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas das fibras C não-mielinizadas e nas fibras A δ mielinizadas. A maioria dos nociceptores responde a

estímulos mecânicos, térmicos e químicos, razão pela qual são chamados de nociceptores polimodais (YUNJONG LEE et al, 2005).

O estímulo nódico de uma intensidade suficiente para causar lesão tecidual está associado à liberação de numerosos mediadores inflamatórios. Alguns desses mediadores estimulam diretamente nociceptores periféricos. Recentes avanços na pesquisa com canais iônicos em neurônios sensoriais revelaram mecanismos moleculares essenciais, para a transmissão de vários tipos de sinais neurais, os quais são conduzidos do encéfalo para o local de percepção da dor (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Vários mediadores químicos conhecidos presente no local lesado podem estimular os nociceptores e, portanto, promover a dor. Dentre os mediadores inflamatórios incluídos neste grupo estão a histamina (que também causa prurido) e a bradicinina (BK). A BK atua através de receptores ligados à proteína G, produzindo uma variedade de efeitos pró-inflamatório que inclui vasodilatação e edema (MAYER, 2006). A bradicinina também estimula atividade enzimática da fosfolipase A₂ ligada à membrana que, por sua vez, provoca a desesterificação da membrana levando à liberação do ácido araquidônico livre (ácido ecosatetraenóico) e à biossíntese subsequente de prostaglandinas (por exemplo, PGE₂ e prostaciclina, PGI₂) pela ciclooxigenase (COX). As prostaglandinas são potentes vasodilatadoras e importantes mediadores na dor inflamatória (WIENECKE, 2008).

A dor pode resultar de vários fatores, como aumento da pressão, devido ao edema, sobre tecidos e terminações nervosas; de lesão das fibras nervosas; da irritação tóxica produzidas por microorganismos ou extravasamento de substâncias intracelulares de células lesadas e, também por cininas que afetam terminações nervosas. As prostaglandinas intensificam a dor associada à inflamação (ROCHA et al, 2007).

A dor é desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). Entretanto, ela pode ser resultante de lesão de fibras sensoriais, ou dano ocasionado no sistema nervoso central (MILLAN, 2002). A dor pode ser subdividida em aguda e crônica. A dor aguda é de curta duração, geralmente persistente apenas no período de duração do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo. A dor crônica é evidente quando cessa a função dos mecanismos normais de cicatrização e em doenças como artrite reumatóide pode persistir por semanas, meses ou até mesmo anos (PAGE et al., 2004).

A dor não é uma entidade isolada, ela difere essencialmente nas causas que variam de acordo com sintomas e mecanismos neurobiológicos. Em curso de escala, três formas de dor podem ser distinguidas (ZEILHOFER, 2007).

A dor nociceptiva originada da ativação de neurônios nociceptivos primários, os quais têm função fisiológica importante como a proteção da lesão tecidual. A dor de origem inflamatória origina todas as formas de inflamação. Finalmente, a dor neuropática originada de uma lesão tecidual de origem periférica ou de nervos e neurônios centrais. A dor neuropática é acompanhada por dor espontânea intensa e dor provocada por leve estímulo. A dor inflamatória e a dor neuropática podem exceder a duração da causa primária da dor. Elas podem se tornar síndromes de dor crônica (ZEILHOFER, 2007).

2.6 Mediadores da resposta inflamatória

2.6.1. Derivados do ácido araquidônico

A estimulação das membranas celulares induz a liberação, via ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) do ácido araquidônico, de um ácido graxo insaturado que contém vinte carbonos e quatro duplas ligações. A seguir ocorre a sua biotransformação à prostaglandinas (PGs), via ação de ciclooxigenase (COX), a leucotrienos via ação das lipoxigenases, entre outras substâncias (WANG et al, 2007).

Os metabólitos do ácido araquidônico formados através das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase representam importantes classes de mediadores inflamatórios. A prostaglandina, em particular a PGE₂, é conhecida por causar ou aumentar os sinais cardinais da inflamação. O ácido araquidônico provoca uma resposta inflamatória intensa, a qual é afetada por inibidores da lipoxigenase e da ciclooxigenase (SANJITA et al, 2008).

a) Prostaglandinas

As prostaglandinas estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, contração e relaxamento da musculatura brônquica e uterina, hipotensão, ovulação, metabolismo ósseo, aumento do fluxo sanguíneo renal (resultando em diurese, natriurese e estimulação da renina), supressão da secreção ácido gástrica, hiperalgesia, regulação de atividade quimiotática celular, resposta endócrina e angiogênese, entre outros (HILÁRIO et al, 2006).

No trato gastrointestinal, as prostaglandinas I₂ e E₂ são citoprotetoras da mucosa gástrica, porque diminuem a secreção ácido gástrica, aumento do fluxo sanguíneo local, estimulam produção de muco e aumento da síntese de glutatona (e consequentemente capacidade de eliminar radicais livres), além de aumentar a síntese de bicarbonato e de fluxo sanguíneo na superfície da camada da mucosa gástrica. Nos rins, as prostaglandinas aumentam a filtração glomerular porque possuem efeito vasodilatador. Finalmente, dentro do sistema cardiovascular, eles podem causar severos efeitos hemodinâmicos com a vasodilatação (HILÁRIO et al, 2006).

As prostaglandinas também têm efeitos fisiopatológicos, como eritema e aumentos do fluxo sanguíneo local, hiperalgesia, provavelmente devido à sensibilização de nociceptores, aumento da temperatura corporal através de estimulação de citocinas sobre o hipotálamo. Quando a produção de prostaglandinas é aumentada, há o aumento da sensibilidade à dor e febre, além da resposta inflamatória aumentada. Todavia, as prostaglandinas também são capazes de ação antiinflamatória devido a supressão da síntese de IL-1 e síntese de TNF (HILÁRIO et al, 2006).

Em 1971, um trabalho pioneiro realizado por Vane e colaboradores identificou a inibição da síntese de prostaglandinas como mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico (aspirina) e relatou as drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES). Essa inibição ocorre através da inibição de duas ciclooxygenases, uma constitutivamente expressada (COX-1) e uma induzida, a COX-2. Ambas as enzimas são formadas pelo ácido araquidônico, o qual é liberado devido à lesão tecidual que promove a ativação de fosfolipase A₂. A expressão aumentada de COX-2 é associada com vários fatores fisiopatológicos, incluindo doenças inflamatórias e diferentes cânceres (HARPER & TYSON-CAPPER, 2008). O terminal tecidual de prostaglandina sintetase ou isômeros, em seguida, convertem PGH₂ em diferentes prostaglandinas ativadas (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PCI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), coletivamente chamados de prostanoides (ZEILHOFER, 2007).

Além das duas enzimas, foi descrita por Chandrasekharan em 2002 a COX-3, o qual pode ser uma variação da COX-1. Nos seres humanos o RNAm da COX-3 é expresso em maior quantidade no córtex cerebral e no coração.

Os AINES bloqueiam ambas as enzimas e induzem o aparecimento de graves efeitos adversos como sangramento gastrointestinal, alterações renais e nos mecanismos de hemóstase, resultado da inibição da atividade da prostaglandina E₂ sintetase. Essas alterações, que parecem ser decorrentes da inibição da COX-1, levaram à busca de

inibidores mais seletivos, o que resultou no surgimento de drogas mais seletivas para COX-2 (SCHOLICH & GEISLINGER, 2006).

Inibidores seletivos e específicos para COX-2 foram desenvolvidos na tentativa de reduzir os efeitos da inibição da COX-1 (BRUNE & HINZ, 2004). Esses inibidores incluem o piroxicam, meloxicam, diclofenaco, naproxeno e nimesulida (primeira geração dos inibidores de COX-2), e celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib e lumiracoxib (segunda geração, mais específico, seletivo para inibidores de COX-2) (VAN HECKEN et al, 2000).

Rofecoxib e celecoxib foram os primeiros inibidores seletivos da COX-2 aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite e alívio da dor aguda (CAPONE et al, 2003). Contudo, estes inibidores seletivos de COX-2 inibem a PGI₂ que tem efeitos protetores sobre o sistema vascular. A PGI₂ atenuada pode explicar a maior incidência de ataques cardíacos e acidente vascular cerebral entre aqueles que tomam estes fármacos (SCHOLICH & GEISLINGER, 2006).

b) Leucotrienos

Os leucotrienos são uma família de substâncias farmacologicamente ativas e potentes derivadas do ácido araquidônico por ação de 5-lipooxigenases. Estas são enzimas solúveis localizadas no citosol e encontradas predominantemente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSCHI, 2007).

A via da 5-lipooxigenase (5-LOX) é associada com uma variedade de doenças inflamatórias incluindo asma, arteriosclerose, artrite reumatoide, dor, câncer e fibrose hepática. Muitas classes de inibidores da 5-lipooxigenase foram identificados, mas apenas uma droga, o zileuton, um inibidor redox da 5-LOX, foi aprovado para uso clínico (ZWEIFEL et al, 2008).

Os leucotrienos são potentes mediadores pro-inflamatórios, estimulam diretamente e indiretamente proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (WAN & WUF, 2007). Os leucotrienos consistem em diidroxi leucotrieno LTB₄ e cistenil leucotrienos LTC₄, LTD₄ e LTE₄, por ação de receptores expressos em superfícies de células inflamatórias e em paredes de vasos. Os leucotrienos induzem ativação de leucócitos e quimiotaxia com alta e baixa afinidade pelos receptores BLT1 e BLT2, respectivamente (BÄCK, 2006).

O leucotrieno B₄ (LTB-4) é um lipídio inflamatório derivado da membrana de fosfolípidios pela sequência de ação da fosfolipase A₂ citosólica, 5-lipoxigenase e leucotrieno A₄ hidrolase. Muitas doenças inflamatórias são associadas com elevados níveis de LTB-4 como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e artrite (HICKS et al, 2007).

2.6.2. Autacóides

a) Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é sintetizada a partir do triptofano numa reação mediada por triptofano sintetase. Encontrada em células enterocromafins intestinais, plaquetas humanas, mastócitos de ratos, mas não de humanos, e sistema nervoso central, a amina possui multiplicidade de ações biológicas em função da variedade de receptores farmacológicos (GERSHON, 2004). A maior fonte de serotonina está nos neurônios entéricos do trato gastrointestinal, em particular os interneurônios. A 5-HT tem sido reconhecida como um mediador endógeno da resposta inflamatória em tecidos periféricos. As ações de serotonina são traduzidas por uma larga família de receptores serotoninérgicos divididos em sete classes (5-HT₁–5-HT₇) (WOUTERS et al, 2007).

A serotonina tem funções rigorosas distintas no trato gastrointestinal, atuando como fator parácrino, traduzindo informação das células enterocromafins para neurônios aferentes primários (GERSHON, 2004) e para células adjacentes na mucosa e submucosa (ZHU et al, 2001). Além disso, a serotonina é um neurotransmissor (KIM et al, 2000).

A indução de hiperalgesia por carragenina sugere que os subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} parecem ter efeito facilitatório no processamento do mecanismo nociceptivo na espinha dorsal de ratos (ZHANG, Y. et al., 2001). Estes dados reforçam o aumento da participação de 5-HT_{1A} na resposta nociceptiva (PARADA et al., 2001).

b) Histamina

A histamina foi descoberta em 1910 por Dale & Laidlaw e foi caracterizada como mediador da resposta anafilática em 1932. A histamina, mediador armazenado em mastócitos juntamente com 5-HT, é uma amina formada a partir da histidina por ação da histidina descarboxilase e encontrada em vários tecidos. Tem ampla distribuição tecidual, mas está concentrada principalmente nos pulmões, pele e trato gastrointestinal. É liberada através da interação de antígenos com imunoglobulina E na superfície de

células mastocitárias, deste modo, desempenhando uma função central na hipersensibilidade imediata e respostas alérgicas. Suas ações fisiológicas resultam de ação em quatro receptores farmacológicos denominados H₁, H₂ e H₃ (MAINTZ & NOVACK, 2007) e H₄ (RABER, 2007), sendo que todos os receptores atuam sobre a família da acoplados a proteína G (THURMOND et al, 2008).

Os receptores H₁ são acoplados a proteína G induzem a ativação de fosfolipase C, produção de fosfato de inositol e mobilização de cálcio. Os receptores H₂ ativam a proteína G, aumentando a formação de AMP cíclico (BAKKER et al, 2002). Os receptores H₃ são mediados pela proteína e induzem a inibição da formação do AMP cíclico, aumentando a mobilização de cálcio e ativando a proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPKs) (LEURS et al, 2005). Os receptores H₄ atuam ao inibir a formação de AMP cíclico (THURMOND et al, 2008).

A histamina tem participação importante em fenômenos inflamatórios. Na rinite alérgica e na asma, a administração de bloqueadores dos receptores H₁ reduz a sintomatologia inflamatória. Tem ação vasodilatadora pronunciada. A histamina induz síntese de PGI₂ e NO que produzem vasodilatação, além do aumento da permeabilidade vascular, principalmente pela ação sobre as vênulas pós-capilares. Provoca vasoconstrição dos músculos intestinais e brônquicos (FOGEL et al, 2005; CHIMONA et al, 2008).

Existem quatro classes de antagonistas da histamina: os antagonistas dos receptores H₁, H₂, H₃ e H₄. O primeiro grupo – afeta mecanismos inflamatórios e alérgicos – é representado por antagonistas H₁ de primeira geração (difenidramina, mepiramina, entre outros) e de segunda geração (loratadina, terfenadina, entre outros) (THURMOND et al, 2008).

A histamina é também encontrada nas células parietais da mucosa gástrica, onde atua sobre receptores H₂. Os antagonistas de receptores H₂ são eficazes na cura de úlceras gastrintestinais através da inibição da secreção ácido gástrica. Eles são representados por cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina (LEFRANC, 2006).

A histamina é encontrada no cérebro em menor quantidade do que em outros tecidos, como a pele e pulmões. A liberação endógena de histamina no cérebro é regulada pelos receptores H₃. No SNC, os receptores H₃ são frequentemente expressos como auto-receptores pré-sinápticos (RABER, 2007). Estes receptores histaminérgicos são exclusivamente encontrados no núcleo tuberomamilar do hipotálamo posterior e são transmitidos por quase toda região do encéfalo (TASHIRO & YANAI, 2007).

Os receptores H_4 não são frequentemente expressos como os outros receptores histaminérgicos. Eles estão envolvidos em liberação de agentes quimiotáticos e de mediares inflamatórios por eosinófilos, mastócitos, monócitos, células dendríticas e células T CD^+4 , sugerindo uma importante função no sistema imune (RABER, 2007; HUANG & THURMOND, 2008).

2.7 Neutrófilos

O recrutamento de neutrófilos para o tecido injuriado é essencial para a inflamação e para a defesa contra a infecção, mas ao mesmo tempo pode prejudicar a cura da lesão. Um mecanismo para a regulação dessa dualidade é promovido por lipídios autacóides, os quais atuam limitando a ativação de leucócitos e promovendo a resolução da inflamação (GRONERT, 2008).

O agrupamento de neutrófilos da circulação para o sítio inflamatório envolve muitos eventos, os quais se iniciam com o rolamento ao longo da parede da célula endotelial mediada predominantemente por L-, P-, e E-selectinas. Em seguida, os neutrófilos são ativados por quimiocinas liberadas por células inflamatórias presentes no endotélio. Isto induz ao aumento de integrinas, cuja função é mediar a adesão firme de neutrófilos nas células endoteliais. O ICAM-1 e o VCAM são exemplos de célula de adesão (RITTNER et al, 2005).

Na fase inicial da dor neuropática periférica, os neutrófilos também exercem papel importante tendo sido demonstrado que a sua depleção, ao mesmo tempo em que ocorre a injúria neuronal, atenua a indução da hiperalgesia térmica durante a depleção. Entretanto, em animais onde não é feita a depleção de neutrófilos, a resposta inflamatória pode estabelecer-se e, mesmo após oito dias, a depleção de neutrófilos não terá mais efeito sobre a hiperalgesia (PERKINS & TRACEY, 2000).

Segundo os autores, isto ocorre porque, nesta fase, os macrófagos e seus mediadores são provavelmente mais importantes que os neutrófilos na manutenção da hiperalgesia. Parece que os neutrófilos contribuem para a fase inicial da dor neuropática periférica através da liberação de mediadores algésicos, os quais sensibilizariam os nociceptores assim como estimulariam a liberação de fatores quimiotáticos, que recrutariam outras células do sistema imune, entre as quais os próprios macrófagos.

Os neutrófilos endoneurais podem agir no sítio da injúria nervosa para induzir hiperalgesia diretamente, através da liberação de mediadores que sensibilizam ou

ativam nociceptores aferentes, e também podem agir indiretamente, induzindo a liberação de mediadores algogênicos de outros tipos celulares (ZUO et al, 2003).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o 1-nitro-2-feniletano – o principal constituinte da *Aniba canelilla* – quanto à toxicidade aguda e, se este constituinte é o responsável pelas atividades antinociceptiva e antiinflamatória produzidas pelo óleo essencial.

3.2 Objetivos específicos

Determinar da toxicidade aguda (DL₅₀) do 1-nitro-2-feniletano.

Avaliar a atividade anti-nociceptiva do 1-nitro-2-feniletano.

Estudar a atividade anti-edematogênica do 1-nitro-2-feniletano.

Caracterizar o efeito do 1-nitro-2-feniletano na dermatite induzida pelo óleo de croton.

Determinar a atividade antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano na peritonite induzida por carragenina.

4 Materiais e Métodos

4.1 Material botânico

As amostras de plantas foram coletadas na reserva Cauaxi, município de Ulionópolis, Estado do Pará em maio de 2005. O exemplar da espécie foi identificado por comparação autêntica (MG 174904) de *Aniba canelilla*, que está registrada no herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará.

O 1-nitro-2-feniletano, com um grau de pureza de 97,5%, foi doado pelo laboratório de Engenharia Química da UFPA. Este constituinte foi obtido por purificação do óleo essencial da casca da madeira de *Aniba canelilla*.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) adultos (25-40g) e ratos (*Rattus norvegicus*) machos pesando entre 180 e 300 g. Os animais, provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém), foram alojados no Biotério Setorial do Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA). Estes foram alojados em gaiolas, mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo de claro/escuro de 12h: a fase clara iniciando-se às 6h e terminando às 18h, com livre acesso a água e ração tipo *ad libitum*. Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 horas. O manuseio e uso dos animais estão de acordo com as normas institucionais (Parecer MED010/2008).

4.3 Avaliação de toxicidade aguda (DL₅₀)

Avaliação da DL₅₀ - para determinação da DL₅₀ foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss albinos machos divididos em grupos de 10 animais, os quais pesavam entre 20-30 g. Cada grupo foi mantido em jejum de 12 h e, em seguida, receberam, através de cânula orogástrica, as doses 500, 600, 750 e 1000 mg/kg diluído em Tween 80 a 1%. Em seguida, os animais foram observados por um período de 4 h para avaliação de possíveis alterações comportamentais.

Segundo o teste descrito por Malone e Robichaud (1962) os parâmetros comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, estereotipia, agressividade, ataxia, sudorese, micção, diarreia e convulsão.

Após este período, os animais foram tratados com ração e água *ad libitum* e observados por um período adicional de 24, 48 e 72 h. Os casos de morte foram anotados para cada grupo e expresso em percentual do número total de animais tratados. A determinação da DL₅₀ foi feita através da conversão da porcentagem de mortalidade dos animais em probitos, traçando assim a equação da reta em função dos valores das doses em escala logarítmica.

4.4 Estudo da atividade antinociceptiva

4.4.1 Atividade analgésica periférica

As contorções abdominais, descritas de acordo com o método de Koster et al (1959), foram induzidas em camundongos através da administração de ácido acético 0.6% i.p. em volume de 0.1 mL a cada 10 g de peso do animal. A reação do animal a esse estímulo é o desenvolvimento de movimentos repetidos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Este conjunto de reações é denominado contorções abdominais e a intensidade da nocicepção é quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 minutos iniciando-se 10 minutos após a administração do ácido acético. Os animais, durante o tempo de observação, foram contidos em funis de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 centímetros. O 1-nitro-2-feniletano (15, 25, e 50 mg/kg; p.o.) foi administrado uma hora antes da administração do agente nociceptivo. Um grupo de

animais recebeu solução salina e Tween 80 a 1% (p.o., grupo controle). A droga padrão, indometacina (5 mg/kg, p.o.), foi administrada 60 minutos antes da administração do ácido acético. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

4.4.2 Atividade analgésica central

Foi utilizado o modelo estabelecido por MacDonald et al. (1946). Os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida a temperatura fixa ($55\pm 0.5^\circ\text{C}$) e anotado o tempo, em segundos, para que o animal manifeste alguma reação em resposta ao estímulo térmico. Esta reação é esterotípica e consiste em pular ou lambe as patas posteriores. Os experimentos foram iniciados 60 minutos após a administração 1-nitro-2-feniletano (50, 100 e 200 mg/kg, p.o.) e do grupo controle (salina 0.9% e Tween 80 a 1%). Um grupo foi tratado com morfina (10 mg/kg, s.c.) 45 minutos antes dos animais serem colocados na placa aquecida. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

4.4.3 Teste de Formalina

Para confirmação do efeito antinociceptivo do 1-nitro-2-feniletano, foi utilizado o teste de nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina.

Após administração intraplantar de formalina (20 μL de solução de formalina a 1%) o tempo que cada camundongo passou lambendo a pata traseira foi cronometrado em duas fases sendo a primeira de 0-5 minutos e a segunda de 15-30 minutos após a administração de formalina. O 1-nitro-2-feniletano (25 e 50 mg/kg, p.o.) foi administrado 60 minutos antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu apenas veículo (salina 0,9% e Tween 80 a 1%, p.o.) uma hora antes da administração de formalina e outro grupo de animal recebeu a droga padrão morfina (4mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1985).

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opióide no efeito do 1-nitro-2-feniletano foi realizada a co-administração do 1-nitro-2-feniletano (50 mg/kg, p.o., 60 minutos antes da formalina) e do antagonista opióide naloxona (1 mg/kg, i.p., 45 minutos antes da formalina). Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

4.5 Estudo da atividade antiinflamatória

4.5.1 Dermatite induzida pelo óleo de Croton

Foi utilizado o método descrito por Tubaro et al. (1985). A indução da dermatite ocorreu após aplicação de 20 μ L de uma solução de óleo de croton em acetona na superfície da orelha direita dos camundongos, pesando entre 20 e 30 g. Na orelha esquerda, foi aplicado o mesmo volume de acetona. Uma hora antes da aplicação, foi realizado o tratamento por via oral, sendo dois grupos tratados com nitrofeniletano (25 e 50mg/kg, v.o.). Outro com dexametasona (10 mg/kg, p.o), e o grupo controle tratado com solução salina e Tween 80 1%.

A avaliação da resposta inflamatória, feita em balança analítica, ocorreu após 6 horas da aplicação do estímulo. Os camundongos foram submetidos à eutanásia e uma amostra de 6 mm de diâmetro da orelha foi retirada com auxílio de punch de biópsia, e estabelecida a diferença do peso entre a amostra da orelha controle (esquerda) e orelha estimulada (direita), expressando os resultados obtidos em mg. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

4.5.2 Estudo da atividade anti-edematogênica

a) Edema de pata induzido por dextrana

O edema de pata baseia-se na variação do volume das patas traseiras dos ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, após a aplicação de algum estímulo inflamatório (CARVALHO et al., 1999). Os animais foram separados em grupos de cinco animais, e uma hora antes da aplicação do agente inflamatório (0,1ml de dextrana 1%) foram tratados, por via oral, com 1-nitro-2-feniletano 25 e 50 mg/kg, e ciproheptadina (5 mg/kg), em volume final de 0,1 mL/100 g de peso do animal. Na região intraplantar da pata direita foi administrado dextrana e igual volume de solução salina na pata esquerda (Figura 3). O desenvolvimento do edema, avaliado em milímetros com auxílio de paquímetro digital Mitutoyo, foi medido imediatamente após a administração de

dextrana e solução salina, em intervalos de 30 minutos, durante duas horas. Todos os grupos foram constituídos por 5 animais.

b) Edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata baseia-se na variação do volume das patas traseiras dos ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, após a aplicação de algum estímulo inflamatório (CARVALHO et al., 1999). Os animais foram separados em grupos de cinco animais e, uma hora antes da aplicação dos agentes inflamatórios (0,1mL de carragenina 1%), foram tratados, por via oral, com 1-nitro-2-feniletano 25 e 50 mg/kg e indometacina (10 mg/kg), em volume final de 0,1 mL/100 g de peso do animal. Na região intraplantar da pata direita foram administrados carragenina e igual volume de solução salina na pata esquerda (Figura 3). O desenvolvimento do edema, avaliado em milímetros com auxílio de paquímetro digital Mitutoyo, foi medido imediatamente após a administração de carragenina e solução salina, em intervalos regulares de uma hora, durante cinco horas. Todos os grupos foram constituídos por 5 animais.

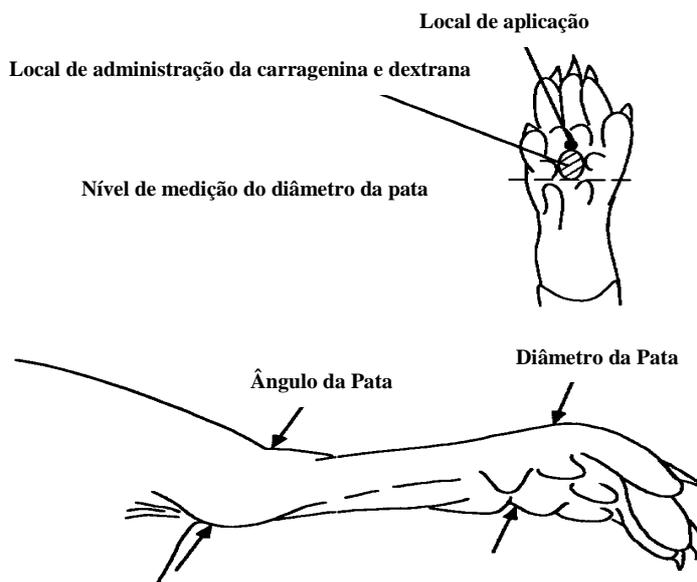


Figura 3: Local de administração da carragenina e dextrana na região intraplantar de ratos (BURITOVA et al, 1996).

4.5.3 Peritonite em ratos induzido por carragenina

Uma solução de carragenina em 300 µg/mL em salina estéril foi injetada na cavidade peritoneal de ratos. A migração celular foi analisada, 4 horas após a injeção do estímulo. Para tanto, os animais foram sacrificados e foram injetados 10 mL de PBS heparinizado (1 mL/1000 mL de PBS) na cavidade peritoneal e realizaram-se as contagens total e a diferencial das células contidas na mesma. Os resultados obtidos na contagem diferencial foram expressos como número de neutrófilos por mL do lavado peritoneal. Para realização da contagem total, 20 µL do lavado peritoneal foram diluídos em 0.4 mL da solução de Turk. A contagem foi realizada, em câmara de Neubauer. Parte do lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi resuspenso em 0.4 mL de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. O esfregaço celular foi feito em lâmina própria. As células foram coradas pelo corante pancrômico de Rosenfeld e contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (erro padrão da média) do número de células $\times 10^6$ /mL de fluido peritoneal (SOUZA & FERREIRA, 1985). Os animais foram tratados uma hora antes da administração da carragenina com 1-nitro-2-feniletano (25 e 50 mg/kg) e dexametasona (1mg/kg). Todos os grupos constituídos por 5 animais.

4.6 – Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. (erro padrão da média), onde n representa o número de animais. São considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). Para comparação das médias foram utilizados ANOVA (Análise de variância one-way) seguida de um método de múltiplas comparações (Teste de Student-Newman-Keuls e teste de Dunn's). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Sigma Stat.

4.7 Drogas, reagentes e soluções

As drogas utilizadas neste estudo foram:

Ácido acético P.A. glacial (VETEC, Rio de Janeiro).

Formaldeído P.A (VETEC, Rio de Janeiro).

Cloridrato de morfina (Laboratório Cristália, Itapira, São Paulo).

Hidrocloridrato de ciproheptadina, (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA), solubilizada em solução salina 0.9%.

Carragenina (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA) solubilizada em solução salina 0.9% e vigorosamente agitada no momento do uso.

Dextrana (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA) solubilizada em solução salina 0.9% e vigorosamente agitada no momento do uso.

Indometacina (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA).

Tween 80 (Merck Schuchardt).

Dexametasona fosfato dissódico (Laboratório Aché, Campinas, São Paulo).

Cloridrato de xilazina (Bayer).

Cloridrato de Ketamina (Laboratório König S.A. São Paulo).

Salina tamponada com fosfato (PBS)

Cloreto de Sódio P.A	8.0g
Cloreto de Potássio P.A.	0.2g
Fosfato de sódio dibásico P.A	1.15g
Fosfato de sódio monobásico P.A	0.2g
Água destilada q.s.p	1.0l
pH 7.4	

Solução de Turk

Ácido acético glacial P.A	20.0 mL
Azul de metileno	0.5 mL
Água destilada	1.0L

Corante pancrômico de Rosenfeld

Gienza-azul-eosina-azul de metileno	97.0mg
May-Grunwald-eosina-azul de metileno	53.0mg
Metanol P.A	1.0L

4.8 Aparelhagem e materiais usados

CENTRÍFUGA CLÍNICA

Centrífuga Fanen mod. 208 foi utilizada na centrifugação do lavado peritoneal no teste de migração celular.

MICROSCÓPIO

Para as análises microscópicas, foi utilizado MICROSCÓPIO TRILOCULAR JENAVAL GF-PA.

PAQUÍMETRO

Para as medições no edema de pata foi utilizado o PAQUÍMETRO DIGITAL MITUTOYO.

5 Resultados

5.1 Toxicidade aguda (DL₅₀)

Na determinação da DL₅₀ os camundongos que receberam por via oral doses de 500, 600, 750 e 1000 mg/kg, apresentaram, durante o período de observação de 72 horas, percentual de morte de 0, 20, 70 e 100%, respectivamente. O valor da DL₅₀ corresponde a $712 \pm 17,39$ mg/kg (Figura 4). Este valor classifica esta substância como pertencente aos agentes xenobióticos de classe 4 (pouco tóxica), (OECD, 2001).

As mudanças comportamentais, as quais poderiam ser observadas nos animais após receber o tratamento, foram registradas durante 4 horas ininterruptas e, observou-se, além do número de animais mortos, dificuldade de locomoção e agitação nos camundongos. Após esse período de tempo os animais foram observados em 24, 48 e 72 horas.

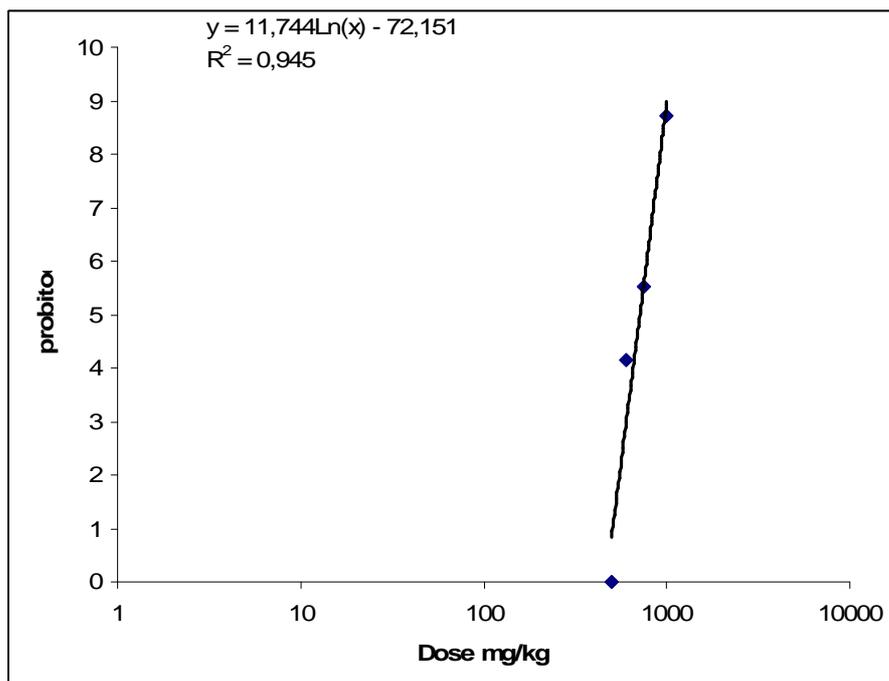


Figura 4: Determinação da DL_{50} em camundongos através da equação da reta. Eixo das ordenadas: valores dos probitos, correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abscissas, as doses de 1-nitro-2-feniletano em escala logarítmica. R^2 é o coeficiente de correlação.

5.2 Estudo da atividade antinociceptiva

5.2.1 Atividade analgésica periférica

Os resultados apresentados na Figura 4 e Tabela 1 (anexo) mostram o efeito dose-dependente do 1-nitro-2-feniletano sobre o número de contorções abdominais, induzido pelo ácido acético 0,6%. As doses de 15, 25 e 50mg/kg reduziram o número de contorções abdominais em 19,19%, 48,43% e 74,47%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. A indometacina (5 mg/kg), um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, utilizado como droga padrão neste teste, diminuiu em aproximadamente 60,38% o número de contorções abdominais quando comparada ao grupo controle.

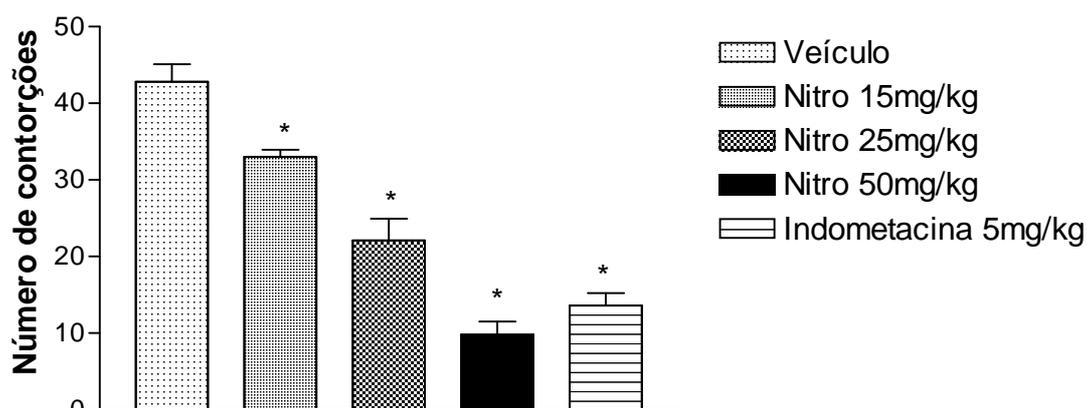


Figura 5: Efeito do 1-nitro-2-feniletano e Indometacina sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de Ácido Acético 0,6% em camundongos. Cada coluna representa média \pm e.p.m. de 10 animais. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; ANOVA, Teste de Student-Newman-Keuls.

5.2.2 Atividade analgésica central

O 1-nitro-2-feniletano nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg não mostrou atividade analgésica central quando comparado ao grupo controle (Figura 6). Entretanto a morfina (fármaco opióide) prolongou de maneira significativa a latência (tempo que os animais necessitam para manifestar uma reação estereotipada ao estímulo térmico) nos tempos 30, 60 e 90 segundos, no teste da placa quente.

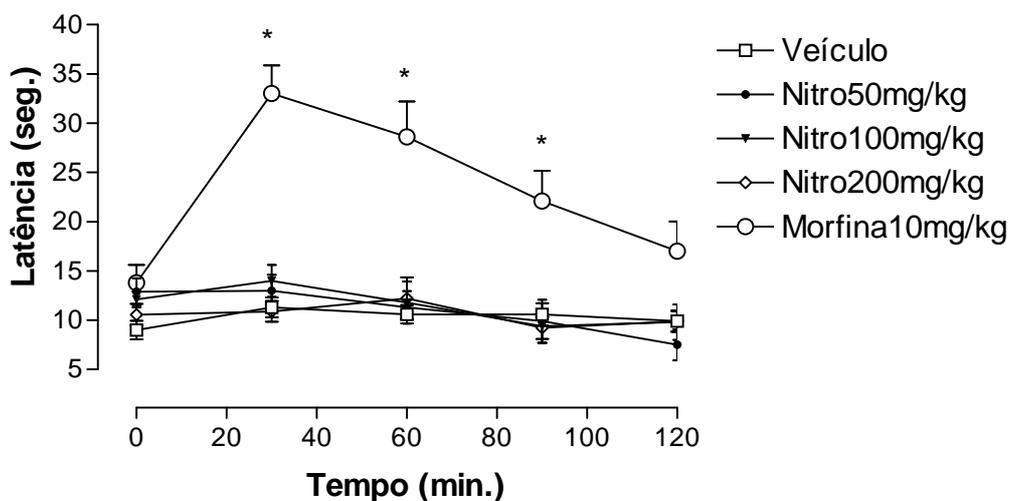


Figura 6: Efeitos do 1-nitro-2-feniletano nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e da morfina na dose de 10 mg/kg sobre o estímulo nociceptivo térmico ($55 \pm 0,1^\circ\text{C}$) induzido em camundongos. Cada ponto representa média \pm e.p.m. de 10 animais. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; ANOVA, método de Dunn's.

5.2.3 Teste de Formalina

O 1-nitro-2-feniletano nas doses de 25 e 50mg/kg reduziu de maneira significativa o tempo de lambida em relação ao grupo controle na 2ª fase do teste de formalina (fase inflamatória) em 51,11% e 79,16%, respectivamente (Figura 8). Entretanto, o 1-nitro-2-feniletano não foi eficaz na 1ª fase (fase neurogênica) deste teste. A morfina (4 mg/kg), analgésico opióide, reduziu de maneira significativa as duas fases em 79,08% e 73,16%, respectivamente (Tabela 2, anexo). Neste teste, a naloxona (1mg/kg) reverteu o efeito do 1-nitro-2-feniletano apenas na segunda fase. Ainda neste teste a naloxona foi capaz de reverter o efeito da morfina tanto na primeira fase quanto na segunda fase no teste da formalina.

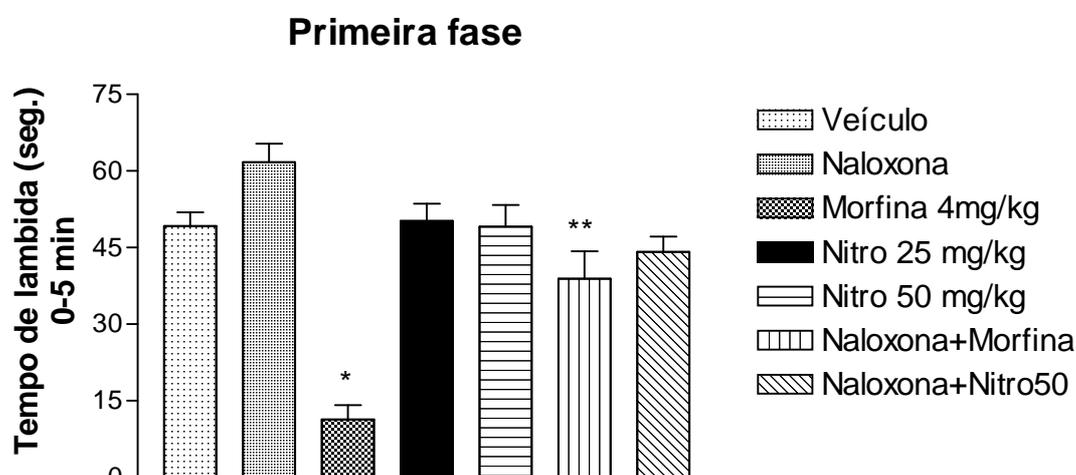


Figura 7: Cada grupo representa média \pm e.p.m. (erro padrão da média), de 10 animais.
 * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; ** $p < 0.05$ quando comparado ao agonista mais antagonista versus agonista sozinho (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels).

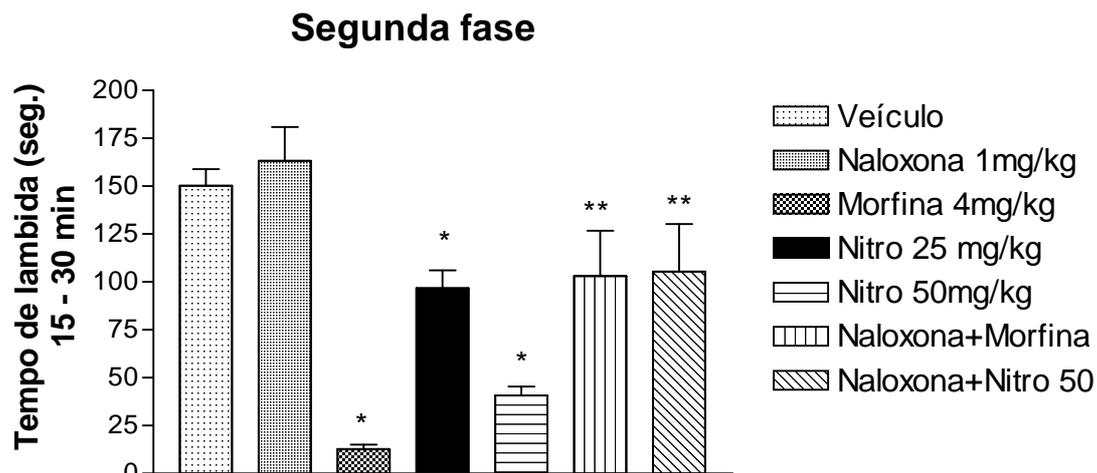


Figura 8: Cada grupo representa média \pm e.p.m. (erro padrão da média), de 10 animais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; ** $p < 0,05$ quando comparado ao agonista mais antagonista versus agonista sozinho (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels).

5.3 Estudo da atividade antiinflamatória

5.3.1 Dermatite induzida pelo óleo de croton

O 1-nitro-2-feniletano nas doses de 25 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir em 73,8 e 79,4% o eritema induzido pelo óleo de croton em relação ao grupo controle (Tabela 3, anexo).

A dexametasona (10 mg/kg), um antiinflamatório esteroideal, reduziu o eritema em 87,01%.

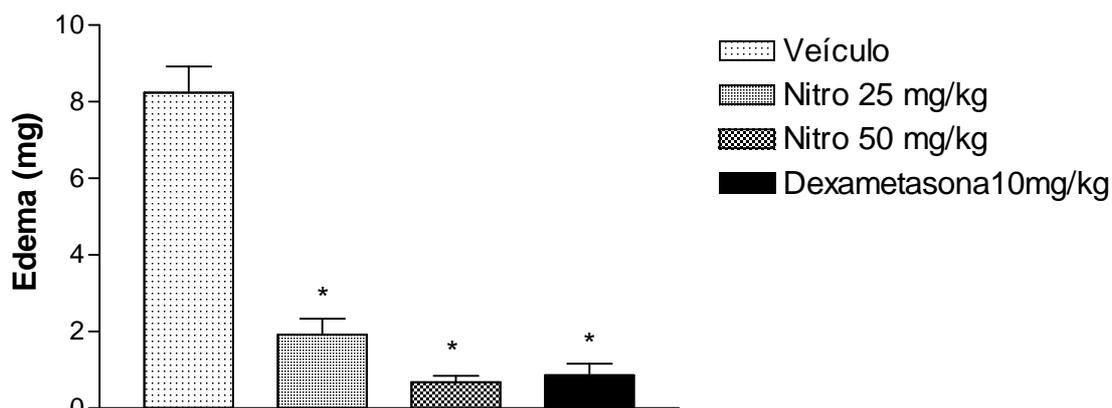


Figura 9: Efeito do 1-nitro-2-feniletano e dexametasona sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de croton em camundongos. Cada coluna representa média \pm e.p.m. de 10 animais. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls.

5.3.2 Edema de pata induzido por dextrana

O 1-nitro-2-feniletano, mostrou um efeito dose-dependente no edema de pata de rato induzido por dextrana. Na dose de 25 mg/kg, foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em 15,58%, 26,78%, 44,92% e 30,07% nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente. Na dose de 50 mg/kg houve uma inibição do desenvolvimento do edema em 38,1%, 61%, 69,09% e 73,65% nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente. A ciproheptadina foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em 71,94%, 67,29%, 71,18% e 52,25% nos tempos 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente (Figura 10).

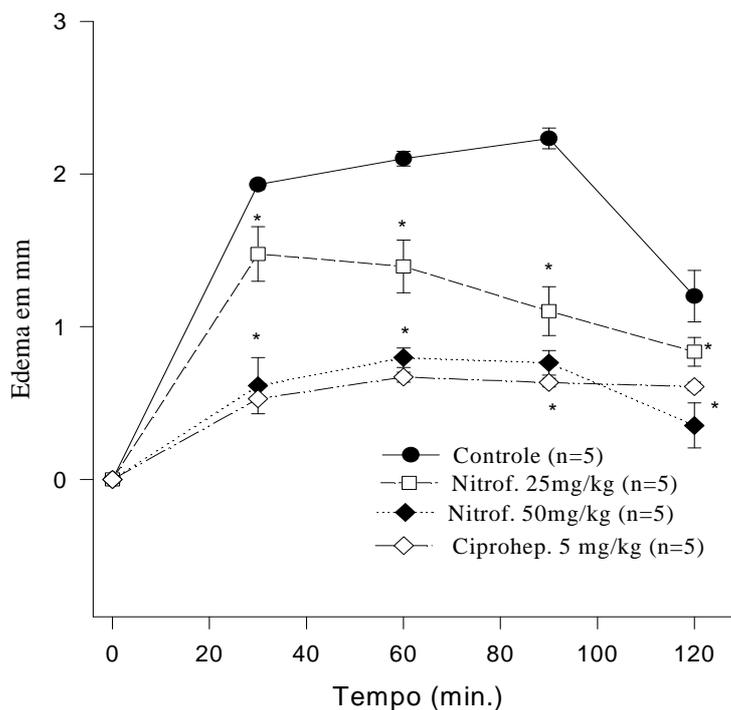


Figura 10: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) e ciproheptadina (5 mg/kg) administrado por via oral, em relação ao efeito antiedematogênico no teste de edema de pata induzido por dextrana em ratos (1000 µg/pata). Cada ponto representa média \pm e.p.m. de 5 animais.

* $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; ANOVA, Teste de Student-Newman-Keuls.

5.3.3 Edema de pata induzido por carragenina

No edema de pata de rato induzido por carragenina o 1-nitro-2-feniletano também mostrou um efeito dose-dependente. O 1-nitro-2-feniletano, na dose de 25 mg/kg, foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em 26,83%, 43,91%, 41,6% e 39,85% nos tempos de 2, 3, 4 e 5 h. Na dose de 50 mg/kg o 1-nitro-2-feniletano causou uma inibição do desenvolvimento do edema em 51,76%, 54,46%, 47,2% e 49% nos tempos de 2, 3, 4 e 5 h. A indometacina foi capaz de impedi o desenvolvimento do

edema em 41,07%, 66,95%, 61,73%, 50,07% e 64,99% nos tempos de nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 h, respectivamente (Figura 11).

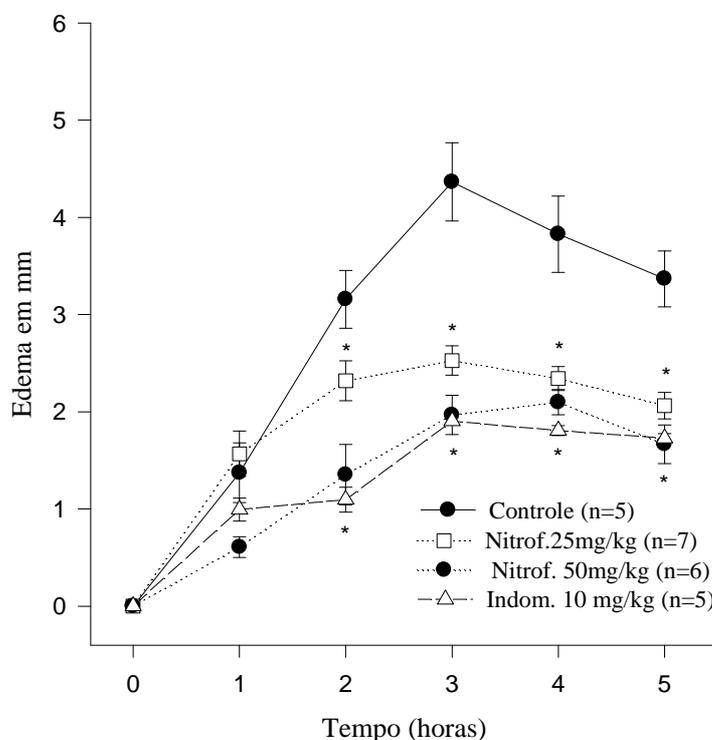


Figura 11: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (nas doses de 25 e 50 mg/kg) e indometacina administrado por via oral, em relação ao efeito anti-edematoso no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos (1000 µg/pata). Cada ponto representa média \pm e.p.m. de 5, 6 e 7 animais.

* $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; Teste de Student-Newman-Keuls.

5.3.4 Peritonite em ratos induzido por carragenina

No modelo de peritonite induzido por carragenina a concentração de leucócitos após 4 horas aumentou para $8,1 \times 10^6$ células/mL, o qual define como 100% de migração de leucócitos. Enquanto que a concentração de neutrófilos após 4 horas da administração da carragenina aumentou para $5,3 \times 10^6$ celular/mL, o qual define como 100% de migração de neutrófilos. Quando os animais foram tratados com 1-nitro-2-feniletano (25 mg/kg, p.o.) ou dexametasona (1 mg/kg, p.o.) houve uma diminuição significativa do número total de leucócitos (Figura 12) e do número de neutrófilos

(Figura 13) demonstrando inibição no processo inflamatório. A diminuição do número de leucócitos foi de 22,55% e 32,37%, respectivamente (Tabela 5). A diminuição do número de neutrófilos foi de 38,13% e 69,77%, respectivamente (Tabela 6). Entretanto, o 1-nitro-2-feniletano (50 mg/kg, p.o.) aumentou o número de leucócitos em 49,33% e de neutrófilos em 85,34%.

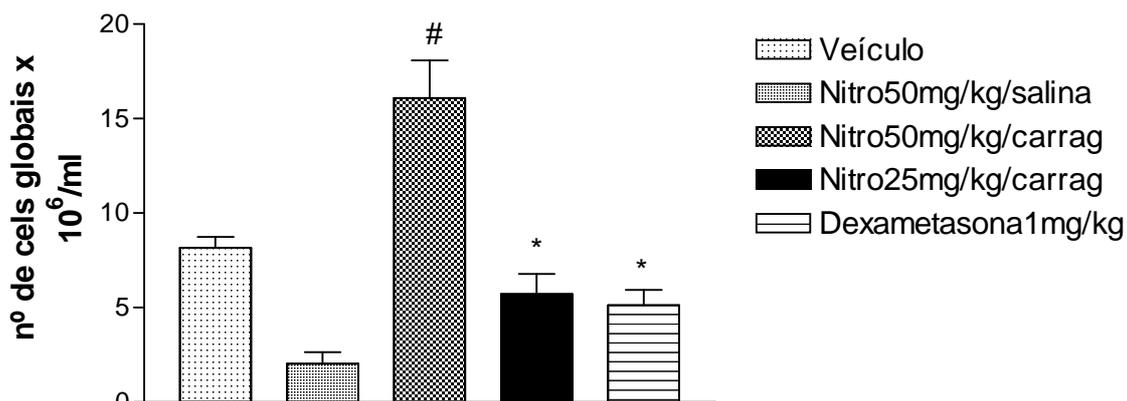


Figura 12: Efeito de administração de 1-nitro-2-feniletano (25 e 50 mg/kg, p.o.) ou dexametasona (1 mg/kg, p.o.) na inflamação aguda induzida por carragenina, medida pela concentração de leucócitos no fluido peritoneal (peritonite). Cada grupo representa média \pm e.p.m. (erro padrão da média), de 5 animais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels). # $p < 0,05$ quando comparado ao controle (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels).

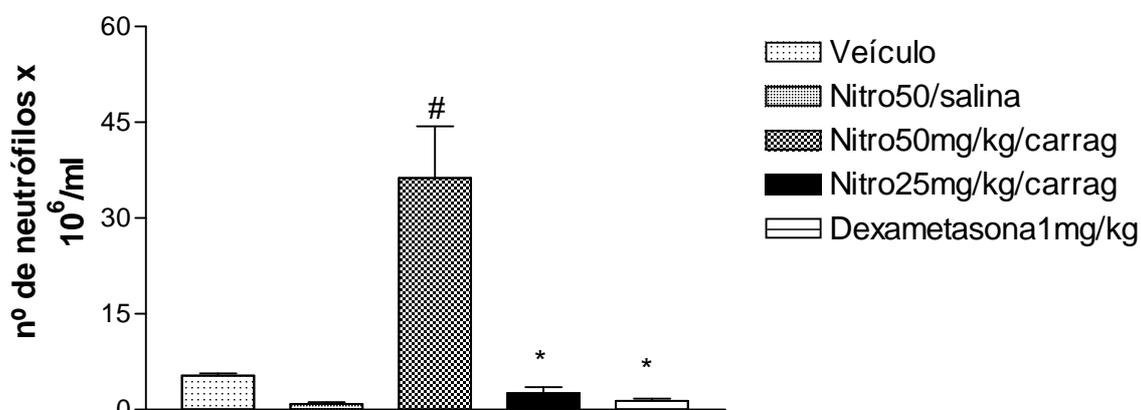


Figura 13: Efeito de administração de 1-nitro-2-feniletano (25 e 50 mg/kg, p.o.) ou dexametasona (1 mg/kg, p.o.) na inflamação aguda induzida por carragenina, medida pela concentração de neutrófilos no fluido peritoneal (peritonite). Cada grupo representa média \pm e.p.m. (erro padrão da média), de 5 animais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels). # $p < 0,05$ quando comparado ao controle (ANOVA, Teste de Student Newman Kuels).

6 Discussão

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as prováveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano uma vez que o óleo essencial de *Aniba canelilla* apresentou ambas as atividades e, também, por que muitos tipos de dor possuem um componente inflamatório envolvido. Para isso, utilizamos modelos clássicos de avaliação farmacológica envolvendo atividades antinociceptiva e antiinflamatória.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% é um modelo experimental usado, para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos periféricos de natureza antiinflamatória, uma vez que o ácido acético, na concentração usada, induz a dor indireta que ocorre em consequência de uma inflamação aguda no peritônio (IKEDA et al, 2001).

A inflamação ocasiona a liberação de prostaglandinas, o suficiente para provocar espasmos traduzidos em contorção (LAPA et al., 2003; CUNHA et al., 2003; MIRANDA et al., 2001). Acredita-se que o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da nocicepção, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas (WHITE, 1964; LEI GUO, 2008).

Além disso, nocicepção induzida pelo ácido acético, depende da liberação de citocinas como IL-1 β , TNF- α e a IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal e, em conjunto com outros mediadores podem induzir a nocicepção característica observada nesse modelo (RIBEIRO et al, 2000; IKEDA et al, 2001).

O 1-nitro-2-feniletano nas doses de 25 e 50 mg/kg foi capaz de reduzir de maneira significativa o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As doses de 25 e 50 mg/kg foram tão eficazes quanto à indometacina – antiinflamatório de natureza não-esteroidal – (AINES), em reduzir as contorções abdominais em camundongos.

O teste de placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais, pois o calor é frequentemente utilizado como um estímulo nódico, em modelos de dor aguda (ANTONIOLLI; VILLAR, 2003), mediado pela ativação dos nociceptores (fibras A δ e C), conduzindo o impulso ao corno dorsal pela medula espinhal, e posteriormente aos centros corticais (PIETROVSKI, 2004).

O 1-nitro-2-feniletano, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, não alterou os movimentos estereotipados (saltar ou lambida a pata) nos tempos avaliados. Entretanto, a morfina elevou o período de latência nos tempos 30', 60' e 90'. Este resultado exclui uma possível atividade analgésica de ação central. A morfina que atua sobre os receptores opióides promovendo a abertura dos canais de potássio, reduzindo, deste modo, tanto a excitabilidade neuronal, pois a condutância aumentada ao K⁺ causa hiperpolarização da membrana (HAESELER et al, 2006).

O teste de formalina talvez seja o modelo de dor clínica mais utilizado, no qual, a primeira fase parece ser devido a estimulação química direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase é dependente da inflamação periférica e modificações no processamento central (TJOLSEN et al, 1997, CAPONE & ALOISI, 2004).

O teste da formalina permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (nociceção de origem neurogênica) resulta de estímulo químico direto de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, principalmente a fibra C, a qual pode ser suprimido por drogas analgésicas opióides como a morfina (HUNSKAAR & HOLE, 1985, AMARAL et al. 2007; GONÇALVES et al. 2008). Resultados experimentais demonstram que a substância P e a bradicinina participam da primeira fase (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

A segunda fase ocorre entre 15 a 30 minutos após a formalina, mediadores inflamatórios formados nos tecidos periféricos, como as prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina, induzem mudanças funcionais nos neurônios, do corno dorsal que, ao longo do tempo promove a facilitação da transmissão em nível espinhal. Esta evidência sugere que o processo de inflamação periférica está envolvido na segunda fase (HUNSKAAR & HOLE, 1985; FRANÇA et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2008).

O 1-nitro-2-feniletano, nas doses de 25 e 50 mg/kg, reduziu de maneira significativa o tempo de lambidas na 2ª fase em relação ao grupo controle. A morfina reduziu o tempo de lambida na 1ª e na 2ª fase em relação ao grupo controle.

A naloxona, um antagonista opióide, mostra a influência antinociceptiva do 1-nitro-2-feniletano (50 mg/kg, p.o.). Isso sugere a participação do sistema opióide na modulação da dor inibida pelo 1-nitro-2-feniletano.

O teste de eritema em orelha de camundongos induzido por óleo de croton é um dos modelos utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória de drogas. O óleo de croton é irritante vascular, causando infiltração leucocitária de polimorfonucleares, edema intracelular e dermatite tópica. Na fase inicial há degranulação de mastócitos. Em roedores esses grânulos contêm mediadores inflamatórios com predominância de serotonina (MONTELLO, 2002). A vantagem do modelo de inflamação em orelha induzido pelo óleo de croton é o bom prognóstico para a triagem a atividade antiinflamatória tópica e a sensibilidade por drogas esteroidais (TUBARO, 1985; SINGH et al, 2008), o que foi demonstrado no nosso modelo experimental, no qual a dexametasona foi usada como controle padrão inibindo 87,01%. Os grupos tratados com 25 e 50 mg/kg de 1-nitro-2-feniletano apresentaram inibição de 73,8 e 79,4%, respectivamente, demonstrando, deste modo, que este constituinte possa inibir fosfolipase A₂, o que indiretamente interfere com o processo de geração de prostaglandinas (BATE et al, 2004), gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico quando aplicado o óleo de croton (INOUE et al., 1989; YONG & DE YOUNG, 1989).

A dextrana é um agente inflamatório conhecido por induzir edema mediado por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) (TAMURA et al., 2002; ESTEVES et al., 2005), conseqüente à degranulação de mastócitos (LO et al., 1982). A histamina interage com receptores H₁, H₂, H₃ e H₄, sendo que os receptores H₁ estão localizados, entre outros locais, nos vasos sanguíneos, enquanto os receptores H₂ localizam-se predominantemente na mucosa gástrica, outros receptores. Os receptores H₃ são frequentemente expressos no SNC. Os receptores H₄ são encontrados em células hematopoiéticas periféricas como eosinófilos, neutrófilos e células T CD⁺4.

O 1-nitro-2-feniletano inibiu o desenvolvimento do edema induzido por dextrana de maneira dose-dependente. Este dado sugere que 1-nitro-2-feniletano interfere com a ação edematogênica da histamina por mecanismo ainda não elucidado. A ciproheptadina – droga antagonista de receptores H₁ e 5-HT₂ (CHINUCK et al, 2007) – reduziu em todos os tempos o edema induzido pela dextrana.

Outro agente flogístico utilizado foi a carragenina, a qual induz exsudato rico em proteínas que contém grande número de neutrófilos e metabolismo do ácido araquidônico pelas vias da ciclooxigenase e lipoxigenase (LO et al., 1982, ZHANG, B.

et al., 2007). Apresenta três fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira fase (0-90 min) relaciona-se à liberação de histamina e serotonina, a segunda fase (90-150 min) envolve a liberação de cininas, enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na terceira fase (150-360 min) (DI ROSA et al., 1971, GARCIA et al., 2004). O 1-nitro-2-feniletano, no edema de pata induzido por carragenina, apresentou atividade anti-edematogênica, nas doses de 25 e 50mg/kg, sendo esta atividade dose-dependente. A indometacina – fármaco antiinflamatório que atua inibindo COX-1 inibiu o desenvolvimento do edema em todos os tempos.

Durante a peritonite há um aumento no transporte de pequenos e grandes solutos entre o plasma e a membrana porosa, além da produção paralela de migração celular. Essas mudanças podem ser explicadas pela vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e pela abertura dos poros nos microvasos, causados por mediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e prostaglandina E2, respectivamente (PAULINO et al, 2008).

Os experimentos com carragenina demonstraram que o 1-nitro-2-feniletano inibe a mobilização de leucócitos e neutrófilos na cavidade peritoneal. Entretanto, com a dose maior, o 1-nitro-2-feniletano aumentou a migração celular. Do mesmo modo que foi observado por Niederberger et al (2001), no qual, foi demonstrada expressão maior de COX-2 observado em doses altas de celecoxib. Isto foi mediado pelo aumento na ativação do NF- κ B, cuja função está envolvida na transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, proliferação celular e adesão de células.

Os resultados obtidos no teste de contorção abdominal, a ação seletiva na 2ª fase do teste da formalina, a inibição do desenvolvimento do edema induzido por carragenina e dextrana, a inibição do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de croton em orelhas de camundongos, e ainda a inibição de leucócitos e neutrófilos sugerem que 1-nitro-2-feniletano possui atividades antinociceptiva e antiinflamatória.

7 Conclusão

- Através dos testes de contorção abdominal e formalina, sugerem que o 1-nitro-2-feniletano possui atividade antinociceptiva, provavelmente, de origem periférica.
- Os resultados sugerem que os receptores opóides estão envolvidos no efeito antinociceptivo do 1-nitro-2-feniletano.
- O 1-nitro-2-feniletano apresentou atividade anti-edematogênica e antiinflamatória nos modelos de edema de pata, dermatite em orelha de camundongos, e migração celular. Deste modo, sugere-se que a ação antiinflamatória desse composto possa ocorrer através de uma interferência na síntese e/ou liberação das cininas, prostaglandinas, histamina e serotonina, ou por agir sobre esses receptores envolvidos na resposta inflamatória; entretanto são necessários outros estudos para elucidar estas hipóteses.

8 REFERÊNCIAS

AMARAL J. F., SILVA M. I. G., NETO M. R. A., NETO P. F. T., MOURA B. A., MELO C. T. V., ARAÚJO F. L. O., DE SOUSA D. P., VASCONCELOS P. F., VASCONCELOS S. M., SOUSA F. C. F., **Biol. Pharm. Bull.**, 30, 1217—1220, 2007.

Aniba canelilla. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo10.htm>. Acesso em: Fevereiro de 2008.

ANTONIOLLI, A. R.; VILLAR, J. C. **Atividade antinociceptiva e toxicidade aguda do extrato aquoso de *Vitex agnus-castus* L.** Anais do seminário de Pesquisa FAP-SE, 2003.

[BÄCK M.](#) Leukotrienes: potential therapeutic targets in cardiovascular diseases **Bull Acad Natl Med.** 190(7):1511– 1518, 2006.

BAKKER, R. A., TIMMERMAN, H. & LEURS, R. Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction. **Clin. Allergy Immunol.** 17, 27–64, 2002.

BATE, C.; REID, S., & WILLIAMS, A. Phospholipase A₂ inhibitors or platelet-activating factor antagonists prevent prion replication. **The Journal of Biological Chemistry**, 279, 36405-36411, 2004.

BRUNE, K. & HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scand J Rheumatol.**, 33:1-6, 2004.

BURITOVA, J.; HONORÉ, P., CHAPMAN, V. & BESSON, JEAN-MARIE. Enhance effects of co-administered dexamethasone and diclofenac on inflammatory pain processing and associated spinal c-Fos expression in rat. **Pain**, 64, 559-568, 1996.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Bio. Res.**, 33, 179 – 189, 2000.

CALIXTO, J. B., OTUKI, M. F. & SANTOS, A. R. Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, 69, 1-12, 2003.

CAPONE F. & ALOISI, A. M., Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Ann Ist Super Sanità**, 40 (2): 223:229, 2004.

CAPONE, M.L.; TACONELLI, S.; SCIULLI, M.G.; PATRIGNANI, P.. Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. **International Journal of Immunophatology & Pharmacology**, 16 (2): 49-58, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIE, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRICIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. R. & BASTOS, J. K. Antiinflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology** 64, 127–133, 1999.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; & SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci USA** 99, 13926–13931, 2002.

CHIMONA, T. N., PANAYIOTIDES., PAPADAKIS C. E., HELIDONIS E. S. & VELEGRAKIS G. A. Antihistamine effects on experimental middle ear inflammatory model. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 2008.

CHINUCK, R. S.; H. FORTNUM, H. & D. R. BALDWIN, D. R. Appetite stimulants in cystic fibrosis: a systematic review. **J. Hum Nutr Diet**, 20, 526–537, 2007.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C. C. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, v. 84, n. 2, p. 47-79, 2003.

D'ARCY, P.D., HOWARD, E.M. MUGGLETON, P.W. The anti-inflammatory action of grisefulvin in experimental animals. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology** 12, 659, 1960.

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. **The Journal of Pathology**, England, v. 104, p. 15-28, 1971.

ESTEVEZ, I.; SOUSA, I. R.; MARCELO, R.; CARDOSO, L. G. F.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FOGEL, W.A.; LEWINSKI, A. & JOCHEM, J. Histamine in idiopathic inflammatory bowel diseases--not a standby player. **Folia Media Cracov**, 46(3-4):107-18, 2005.

FRANÇA D. S., SOUZA A. L. S., ALMEIDA K. R., DOLABELLA S. S., MARTINELLI C., COELHO M. M. **Eur. J. Pharmacol.**, 421, 157-164, 2001.

GALEY, G. I.; ZIBOH, V. A.; MARCELO, C. I.; VOORHEES, J. J.. Modulation phospholipid metabolism in murine keratinocytes by tumor promoter, 12-O-tetradecanoyl-13-acetate. **Journal of Investigation in Dermatology**. 85, 319-323, 1985.

GARCIA, M.A.; FERNANDEZ, A. ALVARE and SAENZ, M.T.. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extracts from leaves of *Pimenta racemosa varozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69-73, 2004.

GERSHON, M. D. Review article: serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. **Aliment Pharmacol Ther** 20: 3–14, 2004.

GONÇALVES, J. C. R., OLIVEIRA, F. S., BENEDITO, R. B., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. & ARAÚJO, D. A. M. A. D. Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biol Phar. Bull.** 31 (5), 1017–1020, 2008.

GOTTLIEB, O. R. & MAGALHÃES, M. T. Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. **II Perfumer & Essential Oil Record** 51: 18–21, 1960.

GOTTLIEB, O. R. & MORS, W. B. Fitoquímica amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência** 3 (4): 252-263, 1978.

GRONERT, K. Lipid autacoids in inflammation and injury responses: a matter of privilege. **Mol Interv.** (8), 28–35, 2008.

GYRES, K.; KNOLL, J. Inflammation and writhing syndrome inducing effect of PGE1, PGE2 and inhibition of these action. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**. 27, 257-264, 1975.

HAESELER, G.; FOADI, N.A.; AHRENS, J. A.; DENGLER, R. B.; HECKER, H. C. & LEUWER, M. D. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltage-operated sodium channels, **Pain**. 126, 234–244, 2006.

HARPER, K. A. & TYSON-CAPPER, A. J., Complexity of COX-2 gene regulation. **Biochem Soc Trans.**, v. 36, 543-545, 2008.

HAYDEN, M. S., AND S. GHOSH. Signaling to NF- κ B. **Genes Dev.** 18, 2195–2224, 2004.

[HILÁRIO M.O.](#); [TERRERI M. T.](#); [LEN C. A.](#) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. (8) 2206–212, 2006.

[HICKS A](#), [MONKARSH S. P.](#); [HOFFMAN A. F.](#); [GOODNOW R. JR.](#) Leukotriene B4 receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. **Expert Opin Investig Drugs**. (12):1909-20, 2007.

HU, YA-QIN; FERGUSON, D.K.; LI, CHENG-SEN; XIAO, YA-PING & WANG, YU-FEI. *Alseodaphne* (Lauraceae) from the Pliocene of China and its paleoclimatic significance. **Review of Palaeobotany and Palynology**.146, 277–285, 2007.

HUANG, J.F. & THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. **Curr Allergy Asthma Rep**, (1):21-7, 2008.

HUNSKAAR S, BERGE OG, HOLE K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76,1985.

HUTTI, J. E.; TURK, B. E.; ASARA, J. M.; AVERIL M.A., CANTLEY, L. C. & ABBOTT, D. W. I κ B Kinase β Phosphorylates the K63 Deubiquitinase A20 To Cause Feedback Inhibition of the NF- κ B Pathway. **Molecular and cellular biology**, 7451–7461, 2007.

IKEDA Y, UENO A, NARABA H, OH-ISHI S, 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci** 69, 2911–2919, 2001.

INOUE, H.; MORI, T.; SHIBATA, Y.. Modulation by glyceric acid derivatives of TPA-induced mouse ear edema. **British Journal of Pharmacology**, 96, 204-210, 1989.

JULIUS, DAVID & BASBAUM, ALLAN I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, 203-210, 2001.

LAHLOU, S. MAGALHÃES, P.J.C., SIQUEIRA, R.J.B. de, FIGUEIREDO, A.F., INTERAMINENSE, L.F.L., MAIA, J.G.S., SOUSA, P.J.C.. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, 46 (4): 412-421, 2005.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. de A.; LIMA, T. C. M. de. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Gráfica Metrópole, 119 p. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2003.

LEFRANC, F., YEATON, P.; BROTTI, J. & KISS R. Cimetidine, an unexpected anti-tumor agent, and its potential for the treatment of glioblastoma, **Int J Oncol.**, 5, 1021-30, 2006.

LEI GUO, CAIYING YE, WENYING CHEN, HUA YE, RU ZHENG, JUAN LI, HUIFEN YANG, XIAOLI YU, DECHANG ZHANG. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2008.

LEURS, R., BAKKER, R. A., TIMMERMAN, H. & DE ESCH, I. J. P. The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. **Nature Rev. Drug Discov.** 4, 107–120 2005.

LO, T. N; ALMEIDA, A. P; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, United States, v. 221, p. 261-267, 1982.

KATZ, L. B; THEOBALD, H. D; BOOKSTAFF, R. C. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, United States, v. 230, p. 670-677, 1984.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY G. N.; MCCLOUD T. G.; TUCKER K. D.; & SHOEMAKER, R. H. A Novel Antimicrobial Indolizinium Alkaloid from *Aniba panurensis* **J. Nat. Prod.** 67, 1732–1735, 2004.

KIM D-Y, CAMILLERI M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. **Am J Gastroenterol** 95: 2698–709, 2000.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18. p.412, 1959.

MACDONALD, A.D. et al. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British Journal of Pharmacology**, 1, 4-14, 1946.

MAIA, J.G.S., ZOGHBI, M.G.B. & ANDRADE, E.H.A.. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Série Adolpho Dulcke. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2001.

MALONE, M.H. Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia** 25: 320-332, 1962.

MAINTZ, L. & NOVAK N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, 85, 1185-1196, 2007.

MARQUES, C.A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente** 8 (1): 195-206, 2001.

MAYER, S.; IZYDORCZYK, I.; REEH, P. W. & GRUBB, B. D. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. **Pain**, 130, 14–24, 2007.

MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.; LIMA, V.T.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, F.M.M.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, B.G.S. & SOUSA, F.C. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull.** 29, 451–454, 2006.

MILLAN, M. J. Descending Control of Pain. **Prog. Neurobiol.**, v.57, 355–474, 2002.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; CAVALCANTI, S. C.H.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, England, v. 1, n. 6, 2001.

MONTELLO, M. S. A.G. & MARTINS, R. A. B.. **Efeito da terapia com laser de baixa potência na dermatite induzida por óleo de croton em orelha de camundongo.** São José dos Campos: UNIVAP. 67p. localização: 539. 12.04-m781e, 2002.

MONTUSHI PAOLO, ANGELO SALA, SVEN-ERIK DAHLÉN & GIANCARLO FOLCO. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug discover today**, 404-412, 2007.

NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; VETTER, G.; SCHMIDTKO, A.; SCHMIDT, H.; EUCHENHOFER, C.; BRÄUTIGAM, L.; GRÖSCH, S. & GEISSLINGER, G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF- κ B. **The FASEB Journal**, 2001.

NORTHOVER, B. J. The permeability to plasma proteins of the peritoneal blood vessels of the mouse, and the effect of substances that alter permeability. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, England, v. 85, p. 361-370, 1963.

OECD – Organization of Economic Co-operation and development. In: **The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals**. NIH Publication. N° 02-4501, p. I-4, 2001 CD-ROM 1-2.

OLIVEIRA, F.S., SOUSA, D.P., ALMEIDA, R.N. Antinociceptive. Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biol. Pharm. Bull.**, 31 (4), 588—591, 2008.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. **Neurosci.**, 102(4), 937-944, 2001.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA D.; NAGASAWA H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A. & BRETZ W. A. Anti inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**. 1 – 6, 2008.

PERKINS, N. M. & TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**. 101,745–757, 2000.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart.** Curitiba. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PINTO, A. C. O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, 1995.

QUINN, R. J.; CARROLL, A. R.; PHAM, N. B.; BARON, P.; PALFRAMAN, M. E.; SURAWEEERA, L.; PIERENS, G. K. & MURESAN, S. Developing a Drug-like Natural Product Library. **J. Nat. Prod.** 71, 464–468, 2008.

RABER, J.; Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, 735-741, 2007.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal Pharmacology**, Netherlands, v. 387, 111-118, 2000.

RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H. & STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **Journal of Leukocyte Biology**, 78, 1215 – 1222, 2005.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S. & SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Rev Bras Anesthesiol.**; 57: 1: 94-105, 2007.

SANJITA, D.; DINAKAR, S. & SAUMYA, P. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of arbortrioside-A. **Journal of Ethnopharmacology**, 116, 198–203, 2008.

SAYERS, R. D., Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 84, 239-246, 2002.

SCHOLISH, K. & GEISLINGER. G.. Is mPEGS-1 a promising target for pain therapy?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27 (8), 399-401, 2006.

SERHAN, C. N. & CHIANG N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. **Rheum Dis Clin North Am.** (30), 69–95, 2004.

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

[SIMIĆ A.](#); [SOKOVIĆ M. D.](#); [RISTIĆ M.](#); [GRUJIĆ-JOVANOVIĆ S.](#); [VUKOJEVIĆ J.](#) & [MARIN P. D.](#) The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. [Phytother Res.](#) (9) 713-7, 2004.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA S.C.; JOHRI, R.K.; SINGH, J.; QAZI, G.N. Boswellic acids: A leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. **Phytomedicine**, 2008.

SOUZA, G.E. & FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, 17:97–103, 1985.

SOUSA, P.J.C., MAIA, J.G.S., FONTES JUNIOR, E.A., SANTOS A.M.S. **Volatile compounds and antispasmodic activity of the stem bark oil of *Aniba canelilla***. XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina, Rio de Janeiro, 2003.

TAMURA, T., SHIRAI, T., KOSAKA, N., OHMORI, K., TAKAFUMI, N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. **European Journal of Pharmacology** 448, 81–87, 2002.

TASHIRO, M. & YANAI, K. Molecular imaging of histamine receptors in the human brain
[Brain Nerve](#), 59, 221-31, 2007.

TAVEIRA, F.S.N., W.N. de LIMA, ANDRADE E.H.A & MAIA, J.G.S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31, 69-75, 2003.

THURMOND, R.L.; GELFAND, E.W. & DUNFORD, P.J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews Drug Discovery**, 1, 41-53, 2008.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Netherlands, 51, 5-17, 1992.

TUBARO A, DRI P. DELBELLO G. ZILLI C. DELLA LOGGIA R. (1985). The croton oil ear test revisited. **Agents Actions** 17, 347-349, 1985.

VANEGAS, H. & SCHAIBLE, HANS-GEORG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?. **Brain Research Reviews** 46, 295-309, 2004.

VAN HECKEN A, SCHWARTZ JI, DEPRÉ M, DE LEPELEIRE I, DALLOB A, TANAKA W. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen and naproxen on Cox-2 versus Cox-1 in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol.**; 40, 1109-20, 2000.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterol Motil**, 20, 73–80, 2008.

WAN, K.S. & WU, W.F. Eicosanoids in asthma. **Acta Paediatr Taiwan**. 48(6), 299-304, 2007.

WANG, MAN-TZU; HONN, K. V. & NIE D.. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, 26, 525-534, 2007.

WHITE, B. A. The use of changes in capillary in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, England, v. 22, 246-253, 1964.

WIENECKE, T.; OLESEN J.; PETER S.; OTURAI B. & ASHINA; M. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, 2008.

WOUTERS, M. M.; FARRUGIA, G. & SCHEMANN, M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. **Neurogastroenterol Motil**, 19, 5–12, 2007.

YUNJONG LEE, CHANG-HUN LEE & UHTAEK HO. Painful channels in sensory neurons. **Molecular and Cells**, vol. 20, N° 3, p. 315-324, 2005.

YOUNG, J. M. & DE YOUNG, L. M.. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agnates. **In Pharmacological Methods in the control of inflammation**, Alan R. Liss, New York, 215-231, 1989.

ZEILHOFER, HANNES ULRICH. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical of pharmacology**, 165-174, 2007.

ZHANG, B.; LI, JIAN-BEI; ZHANG, DONG-MING; DING, Y. & DU, GUAN-HUA. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biol. Pharm. Bull.** 30, 465—469, 2007.

ZHANG, C.; WELLER, R. L.; THORSON, J. S. & RAJSKI, S. R. Natural Product Diversification Using a Non-natural Cofactor Analogue of S-Adenosyl-L-methionine. **J. Nat. Prod.** 128, 2760-2761, 2006.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; GAO, X. & WU, G. The role of 5-hydroxytryptamine 1A and 5-hydroxytryptamine 1B receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. **Pain**, 92(1-2), 201-211, 2001.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S. & KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, 572, 239-248, 2007.

ZHU, J.X.; WU, X.Y.; OWYANG, C. & LI Y. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J Physiol (Lond)* 530: 431–42, 2001.

ZUO, Y.; PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. & GECZY, C. L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain** 105, 467–479, 2003.

[ZWEIFEL B. S.](#); [HARDY M. M.](#); [ANDERSON G. D.](#); [DUFIELD D. R.](#); [PUFAHL R. A.](#) & [MASFERRER J. L.](#) A rat air pouch model for evaluating the efficacy and selectivity of 5-lipoxygenase inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, 584, 166-174, 2008.

Anexo

Tabela 1: Efeito do 1-nitro-2-feniletano nas contorções induzidas por Ácido Acético 0,6%.

Grupo (V.O)	Dose (mg/kg)	Número de contorções (por 20 minutos)	% de inibição
Controle	-	42,80±2,28	-
1-nitro-2-feniletano	15	32,20±4,23	19,19*
1-nitro-2-feniletano	25	19,11±3,35	48,43*
1-nitro-2-feniletano	50	9,80±1,71	74,47*
Indometacina	5	17,86±1,63	60,38*

* $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; Teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 2: Efeito do 1-nitro-2-feniletano no teste de placa quente em camundongos.

GRUPO (V.O)	Dose (mg/kg)	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120
Controle	-	12,08±0,78	10,16±1,27	11,56±0,77	12,03±1,20
1-nitro-2-feniletano	50	10,09±0,76	12,26±0,94	10,38±0,50	11,46±1,08
1-nitro-2-feniletano	100	10,94±1,60	11,26±1,34	12,06±0,86	10,15±1,17
1-nitro-2-feniletano	200	10,88±1,04	12,22±2,11	9,22±1,11	9,88±1,01
Morfina	10	33±2,87*	33,27±2,83*	28,90±3,53*	17,45±2,94

Cada grupo representa média \pm e.p.m de 10 animais. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; Teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 3: Efeito do 1-nitro-2-feniletano e morfina sobre a nocicepção induzida por Formalina 1% em camundongos. Resultados expressos como média do tempo (segundos) que o animal passou lambendo a pata.

Grupo	Dose (mg/kg)	Nº de Lambidas (1º fase)	% de inibição	Nº de Lambidas (2º fase)	% de inibição
Controle	-	49,2±2,73	-	175,25±20,48	-
Naloxona	1	61,7±3,64	-	163,25±17,7	-
1-nitro-2-feniletano	25	49,1±4,24	-	96,8±9,38	51,11*
1-nitro-2-feniletano	50	38,93±5,33	-	40,07±4,69	79,16*
Morfina	4	11,33±2,85	74,62*	12,77±2,38	73,08*
Naloxona x Nitro	1 x 50	44,14±3,03	-	105,42±24,83	-
Naloxona x Morfina	1 x 4	45±3,4	-	99,4±23,78	-

* ($P < 0,05$) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA; Teste Student-Newman-Keuls).

Tabela 4: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na dermatite induzida pelo óleo de croton.

Grupo (V.O)	Dose (mg/kg)	Peso das orelhas em mg	% de inibição
Controle	-	8,24±0,69	-
1-nitro-2-feniletano	25	1,92±0,42	73,8*
1-nitro-2-feniletano	50	0,68±1,16	79,4*
Dexametasona	10	0,86±0,30	87,01*

* ($P < 0,05$) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA; Teste Student-Newman-Keuls).

Tabela 5: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na migração de leucócitos induzidas por carragenina.

Grupo (V.O)	Dose (mg/kg)	Número de células globais x 10 ⁶	% de inibição
Controle	-	8,15±0,59	-
Nitro/salina	50	2,02±0,61	-
1-nitro-2-feniletano	25	5,7±1,07	22,55%*
1-nitro-2-feniletano	50	16,08±1,99	-
Dexametasona	1	5,11±0,80	32,37%*

* $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; Teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 6: Efeito do 1-nitro-2-feniletano na migração de neutrófilos induzidas por carragenina.

Grupo (V.O)	Dose (mg/kg)	Número de neutrófilos x 10 ⁶	% de inibição
Controle	-	5,31±0,38	-
Nitro/salina	50	0,87±0,30	-
Nitro/carragenina	25	2,59±0,93	38,13%*
Nitro/carragenina	50	36,26±8,11	-
Dexametasona	1	1,35±0,37	69,77%*

* $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle; Teste de Student-Newman-Keuls.