



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Composição química e efeitos antinociceptivo e
antiinflamatório em roedores do óleo essencial de *Peperomia
serpens* (Sw) Loud.**

BRUNO GONÇALVES PINHEIRO

BELÉM
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

BRUNO GONÇALVES PINHEIRO

**Composição química e efeitos antinociceptivo e
antiinflamatório em roedores do óleo essencial de *Peperomia
serpens* (Sw) Loud**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito de avaliação 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
2011**

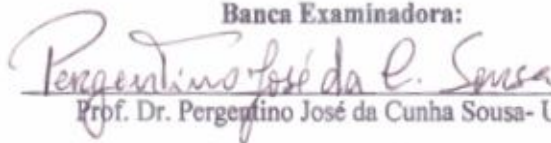
FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Gonçalves Pinheiro

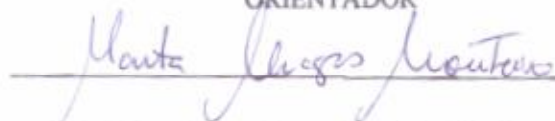
Composição química e efeitos antinociceptivo e antiinflamatório em roedores do óleo essencial de *Peperomia serpens* (Sw) Loud

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

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa- UFPA

ORIENTADOR


Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro-UFPA



Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou- UECE

Aprovado em 20/06/2011

DEDICATÓRIA

Apresento agora de maneira muito carinhosa minha dedicatória aos que de alguma forma contribuíram para a feitura deste trabalho científico, principalmente a minha família: a minha linda esposa (Karen), a minha filhinha Maria Luisa, aos meus pais (Álvaro e Conceição) e minha irmã (Ariele). Vocês me incentivaram e deram força para continuar vivendo, aprendendo e estudando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amor Karen e aos meus pais, Álvaro Américo Piedade Pinheiro e Maria da Conceição Gonçalves Pinheiro e minha irmã Ariele Gonçalves Pinheiro e por todo o amor, apoio e incentivo.

Agradeço a minha família por sempre acreditarem nos meus estudos.

Agradeço ao meu Tio João, que infelizmente não pode ver este sonho virar realidade.

Agradeço a minha amiga Andressa que me agüentou tanto na graduação como na Pós-graduação e também pela ajuda nos testes.

Agradeço a minha turma de mestrado do PPGCF 2009/2011, pelo convívio, risos, palhaçadas e festas.

Agradeço ao Professor Pergentino pelos ensinamentos acadêmicos e companheirismo durante a graduação e Pós-graduação.

Agradeço ao Professor Maia e a Dra Joyce Kelly pelas orientações em relação aos estudos fitoquímicos e colaboração nos congressos.

Agradeço ao Professor Wagner por disponibilizar as passagens aéreas para Ribeirão Preto

Agradeço a Professora Glória Petto e ao Professor Cunha por disponibilizar seus Laboratórios em Ribeirão Preto.

Agradeço a Jozi Godoy Figueiredo pelos ensinamentos e auxílio nas realizações dos testes.

Agradeço a Miriam pelo auxílio na realizações dos testes em Ribeirão Preto.

Agradeço ao Sir John pela força nos testes no Laboratório e limpeza de Biotério e também das gaiolas.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Agradeço a faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará

Agradeço ao Instituto Evandro Chagas e aos Biotérios da Faculdade de Medicina e Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por disponibilizar os animais.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante a Pós-graduação.

Obrigado!

"Perseverança é o trabalho duro
que você faz depois de ter se cansado de fazer
o trabalho duro que você já fez."

Newt Gingrich

RESUMO

A *Peperomia serpens* (Piperaceae) é uma liana herbácea e epífita popularmente chamada de “carrapatinho”. Esta planta cresce na Floresta Amazônica de maneira selvagem em diferentes árvores. As folhas são usadas na medicina tradicional brasileira para dor, inflamação e asma. Neste estudo investigaram-se os efeitos do óleo essencial de *P.serpens* (OEPs) em roedores através de testes para dor e inflamação. A atividade antinociceptiva foi avaliada usando-se modelos nociceptivos químicos (ácido acético e formalina) e térmicos (placa quente) em camundongos, enquanto a atividade antiinflamatória foi avaliada por testes de edema de pata induzidos por carragenina (Cg) e dextrana em ratos, edema de orelha induzido por óleo de cróton, bem como migração celular, rolamento, e adesão induzida por Cg em camundongos. Além disso, a análise fitoquímica do OEPs foi realizada. A composição química do OEPs foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. 25 constituintes, representando 89,51% do total do óleo, foram identificados. (*E*)-Nerolidol (38.0%), ledol (27.1%), α -humulene (11.5%), (*E*)-caryophyllene (4.0%) and α -eudesmol (2.7%) foram encontrados como principais constituintes. O pré-tratamento oral com o OEPs (62,5-500mg/kg) reduziu de maneira significativa o número de contorções, com um valor de DE50 de 188,8mg/kg que foi utilizado em todos os testes. Não houve efeito no teste da placa quente mas reduziu o tempo de lambida em ambas as fases do teste de formalina, efeito que não foi significativamente alterado pela naloxona (0,4 mg/kg). OEPs impediu o desenvolvimento do edema induzido por Cg e dextrana em ratos. Em camundongos, o OEPs inibiu o edema induzido por óleo de cróton bem como a migração de leucócitos e neutrófilos, e rolamento e adesão. Estes resultados sugerem que o OEPs possui atividade antinociceptiva periférica sem interação com receptores opióides e atividade antiinflamatória em diferentes modelos de inflamação aguda.

Palavras-chaves: *Peperomia serpens*; óleo essencial; atividades antinociceptiva e antiinflamatória; roedores

ABSTRACT

The Peperomia serpens (Piperaceae), popularly known as “carrapatinho”, is an epiphyte and herbaceous liana grown wild on different host trees in the Amazon rainforest. Its leaves are largely used in Brazilian folk medicine to treat inflammation, pain and asthma. This study investigated the effects of essential oil of *P. serpens* (EOPs) in standard rodent models of pain and inflammation. The antinociceptive activity was evaluated using chemical (acetic acid and formalin) and thermal (hot plate) models of nociception in mice whereas the anti-inflammatory activity was evaluated by carrageenan (Cg) - and dextran-induced paw edema tests in rats croton oil-induced ear edema, as well as cell migration, rolling and adhesion induced by Cg in mice. Additionally, phytochemical analysis of the EOPs has been also performed. Chemical composition of the EOPs was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). Twenty five compounds, representing 89.6% of total oil, were identified. (*E*)-Nerolidol (38.0%), ledol (27.1%), α -humulene (11.5%), (*E*)-caryophyllene (4.0%) and α -eudesmol (2.7%) were found to be the major constituents of the oil. Oral pretreatment with EOPs (62.5-500 mg/kg) significantly reduced the writhing number, with an ED₅₀ value of 188.8 mg/kg that was used thereafter in all tests. EOPs had no significant effect on hot plate test but reduced the licking time in both phases of the formalin test, an effect that was not significantly altered by naloxone (0.4 mg/kg, s.c.). EOPs inhibited the edema formation induced by Cg and dextran in rats. In mice, EOPs inhibited the edema formation by croton oil as well as the leukocyte and neutrophil migration, the rolling and the adhesion of leukocytes. These data show for the first time that EOPs has a peripheral antinociceptive effect that seems unrelated to interaction with the opioid system and a significant anti-inflammatory effect in acute inflammation models

Keywords: *Peperomia serpens*; essential oil; antinociceptive and anti-inflammatory activities; rodents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição Geográfica do Gênero <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> (Piperaceae)	21
Figura 2- Espécie de <i>Peperomia serpens</i>	24
Figura 3- Mecanismo de transmissão da dor e envolvimento de fibras nociceptivas.....	28
Figura 4- Múltiplas etapas do processo de migração celular, (1) rolamento, (2) aderência, (3) transmigração, (4) quimiotaxia, (5) fagocitose e (6) apoptose.....	33
Figura 5- Cascata dos Eicosanóides.....	37
Figura 6- Efeito do pré-tratamento oral com o óleo essencial de <i>Peperomia serpens</i> (OEPs; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 mg/kg) ou indometacina (Ind; 10 mg/kg) no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético em camundongos.....	67
Figura 7- Determinação de DE ₅₀ de OEPs.....	69
Figura 8- Efeito do óleo essencial de <i>P.serpens</i> (OEPs 188,8 mg/kg, v.o) ou morfina (10 mg/kg, s.c) sobre o estímulo nociceptivo térmico nas temperaturas de 50 ± 0,5°C e 55 ± 0,5°C.....	70
Figura 9- Influência do pré-tratamento de naloxona (Nal, s.c) na ação antinociceptiva de morfina (Mor, s.c) e do óleo essencial de <i>P.serpens</i> (OEPs, v.o) na 1ª (dor neurogênica, 0-5 min) e 2ª fase (dor inflamatória, 15-30 min) na nocicepção induzida por formalina.....	71

Figura 10- Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg) no edema de pata induzido por Cg em ratos.....73

Figura 11- Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou pizotifeno (0,5 mg/kg) no teste de edema de pata induzido por dextrana em ratos.....75

Figura 12- Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou dexametasona (Dex, 10 mg/kg) no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....77

Figura 13- Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou dexametasona (Dex, 10 mg/kg) na migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos.....80

Figura 14- Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) no rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos.....81

TABELA

Tabela 1- Constituintes voláteis (%) do óleo de *Peperomia serpens*.....61

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AINEs	Antiinflmatório não-esteroidais
AIES	Antiinflamatório esteroidal
ANOVA	Análise de variância
Bk	Bradicinina
COX	Ciclooxigenase
CG	Cromatografia Gasosa
Cg	Carragenina
DE₅₀	Dose Efetiva mediana
DL₅₀	Dose letal mediana
δ	Delta
E	Epsilon
EPM	Erro padrão da média
EM	Espectrometria de massa
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
HPETE	Hidroperoxieicosatetraenóicos
HIS	Histamina
h	horas
IC	Ionização de chama
i.p.	Intraperitoneal
I.pl	Intraplantar
IR	Índice de retenção
IL	Interleucina
K	Kappa
LTs	Leucotrienos
LOXs	Lipooxigenases
LXs	Lipoxinas
LPS	Lipopolissacarídio

ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular
μ	Mu
NK	Neurocinina
OEPs	Óleo essencial de <i>Peperomia serpens</i>
OE	Óleo essencial
OE_s	Óleos essenciais
NO	Óxido Nítrico
PG_s	Prostaglandinas
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
5-HT	Serotonina
SP	Substância P
s.c.	Via subcutânea
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA₂	Tromboxanos
ATP	Trifosfato de Adenosina
v.o	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Óleos essenciais	19-20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1.Família Piperaceae	21-23
2.2.Gênero <i>Peperomia</i>	23
2.3.Espécie <i>Peperomia serpens</i> e descrição botânica	23-24
3.FISIOPATOLOGIA DA DOR	24
3.1. Dor	24-25
3.2. Nocicepção e fibras nociceptivas	25-26
3.3. Mecanismo de transmissão da dor	26-29
3.4. Teoria do controle do portão (modulação da dor)	29
3.5. Dor inflamatória	30
4.FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO	30
4.1. Resposta inflamatória e classificação	30-32
4.2 Alterações vasculares	32-33
4.3. Alterações celulares	33-35
4.4. Mediadores químicos envolvidos na dor e inflamação	36
4.4.1 EICOSANÓIDES	36-37
4.4.2. HISTAMINA	38
4.4.3. SEROTONINA	38
4.4.4. CININAS	39
4.4.5. CITOCINAS	39-41
4.4.6 SISTEMA COMPLEMENTO	41-42
4.4.7. SUBSTÂNCIA P E OUTROS NEUROPEPTÍDIOS	42-43

5. FÁRMACOS QUE ATUAM NA DOR E INFLAMAÇÃO	43
5.1 Antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs)	43-45
5.3 Antiinflamatórios esteroidais (AIES)	45
5.4. Opióides	46-47
6. JUSTIFICATIVA	48
7. OBJETIVOS	49
7.1 Objetivo geral	49
7.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
8. MATERIAL E MÉTODOS	50
8.1. Materiais utilizados	50
8.1.1.EQUIPAMENTOS	50
8.1.2.REAGENTES E SUBSTÂNCIAS	51
8.2. Material botânico	51
8.3. Processamento do material botânico e obtenção do óleo essencial	52
8.4.Caracterização do óleo essencial	52
8.4.1.DENSIDADE, CÁLCULO DO RENDIMENTO E TEOR DE UMIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO	52
8.4.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	53
8.6.Experimentos	53-54
8.6.1.ANIMAIS	53
8.7.Avaliação da toxicidade oral aguda	54
8.8.Determinação da dose efetiva mediana (DE₅₀)	54-55
8.9.Estudo da atividade antinociceptiva	55
8.9.1 TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS	55

8.9.2. TESTE DA PLACA QUENTE	56
8.9.3. TESTE DE FORMALINA A 1%	56-57
8.10. Estudos antiinflamatórios	57-60
8.10.1. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	57
8.10.2. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA.....	57-58
8.10.3. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON.....	58
8.10.4. MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADE PERITONEAL EM CAMUNDONGOS.....	58-59
8.10.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA EM TEMPO REAL <i>IN SITU</i> PARA OS EVENTOS DE ROLAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS NA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA DE CAMUNDONGOS	59-60
8.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
9.1. Caracterização do óleo essencial	61
9.2. Análise da composição química do OEPs	61-65
9.3. Toxicidade oral aguda e estimativa de DL ₅₀	65-66
9.4. Teste de contorções abdominais	66-68
9.5. Determinação de DE ₅₀	69
9.6. Teste da placa quente	69-70
9.7. Teste de formalina a 1%	71-73
9.8. Edema de pata induzido por carragenina	73-75
9.9. Edema de pata induzido por dextrana	75-77
9.10. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	77-79
9.11. Migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.....	79-80

9.12. Análise microscópica em tempo real <i>in situ</i> para os eventos de rolamento e adesão de neutrófilos na microcirculação mesentérica de camundongos.....	81-83
10.CONCLUSÃO84
11. REFERÊNCIAS85-103
Anexo A- Comitê de ética104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óleos essenciais

O termo óleo essencial (OE) foi utilizado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus Von Hohenhein, quando nomeou os componentes efetivos de uma droga como "quinta essência" (GUENTHER, 1950). Esta analogia refere-se a um dos usos históricos destes produtos naturais principalmente no tratamento de enfermidades, como plantas aromáticas. Porém, os óleos essenciais (OEs) também eram usados como flavorizantes, no tratamento de alimentos, empiricamente como conservantes, aromáticos devido ao forte odor permitindo a atração entre indivíduos ou ainda em problemas de controle sanitário, influenciando por um longo período as tradições sócio-cultural e sócio-econômica da humanidade (FRANZ, 2010).

Os OEs constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas e assim são denominados devido à composição lipofílica que apresentam quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras. Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores. Na prática médica popular, os OEs possuem uma larga tradição de uso. De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando esse órgão representa um substrato renovável (ex: resina, folha, flor, fruto, semente), é possível extrair a essência sem eliminar a planta (SIANI et al. 2000), como a extração de OEs, a partir de destilação sob baixa e elevadas pressões, empregando-se vapor d'água (BURT, 2004).

Os OEs são designados simplesmente como essências, pois são de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies, só definíveis por um conjunto de propriedades dentre as quais, destacam-se cheiro, sabor já revelados nas plantas e constituintes químicos complexos (COSTA, 2002). Portanto, são voláteis, naturais, caracterizados por odor forte, e formados

principalmente a partir de plantas aromáticas em decorrência de processos metabólicos secundários (BAKKALI et al. 2008).

Os constituintes químicos oriundos metabolicamente destas plantas aromáticas, variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na composição do óleo, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, sendo um deles o componente majoritário; outros aparecem com teores menores e alguns, em baixíssimas quantidades, apenas traços (SIMÕES e SPITZER, 2004).

Economicamente, os OEs mais importantes são negociados como matéria-prima para a produção de aromas e fragrâncias, no caso do Brasil destaca-se a sua posição entre os 4 grandes produtores mundiais que são a Guatemala, Índia, China e Turquia. Além disso, os OEs Apresentam valor comercial relativamente estável há muitos anos, e sua produção é muito explorada em regiões pouco desenvolvidas em virtude da agricultura primária, sendo considerados tradicionais exportadores. Portanto, como produtos de comercialização os OEs apresentam uma série de aplicabilidades como na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e são comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al. 2009). Entre as espécies vegetais possuidoras de OEs encontramos a *Peperomia serpens*, pertencente à família Piperaceae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família Piperaceae

Conhecida como a família das pimenteiras, as Piperaceae se constituem uma das mais numerosas das angiospermas basais, pertencente à superordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales (DAHLGREN, 1980), englobando cerca de 2500 espécies representado por 5 gêneros de distribuição tropical e subtropical (GUIMARÃES e MONTEIRO, 2006). De acordo com a classificação sistemática proposta por Yuncker (1972, 1973, 1974), estes gêneros são *Ottonia*, *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe* e *Sarcorrhachis*. Sendo que, *Piper* e *Peperomia* são os dois gêneros mais representativos em espécies, 700 e 600, respectivamente (DOS SANTOS et al. 2001). Além disso, o principal centro de diversidade desta família ocorre no continente americano, especificamente nas Américas Central e do Sul, e no Velho Mundo; a Ásia e Malásia possuem o maior número de espécies (YUNCKER, 1958; HEYWOOD, 1979; JARAMILLO e MANOS, 2001; NEE et al. 2004). Ademais, Yuncker (1958) menciona que os gêneros *Piper* e *Peperomia*, são possuidores de uma distribuição, ocupações similares e co-iguais geograficamente. Ver **figura 1**

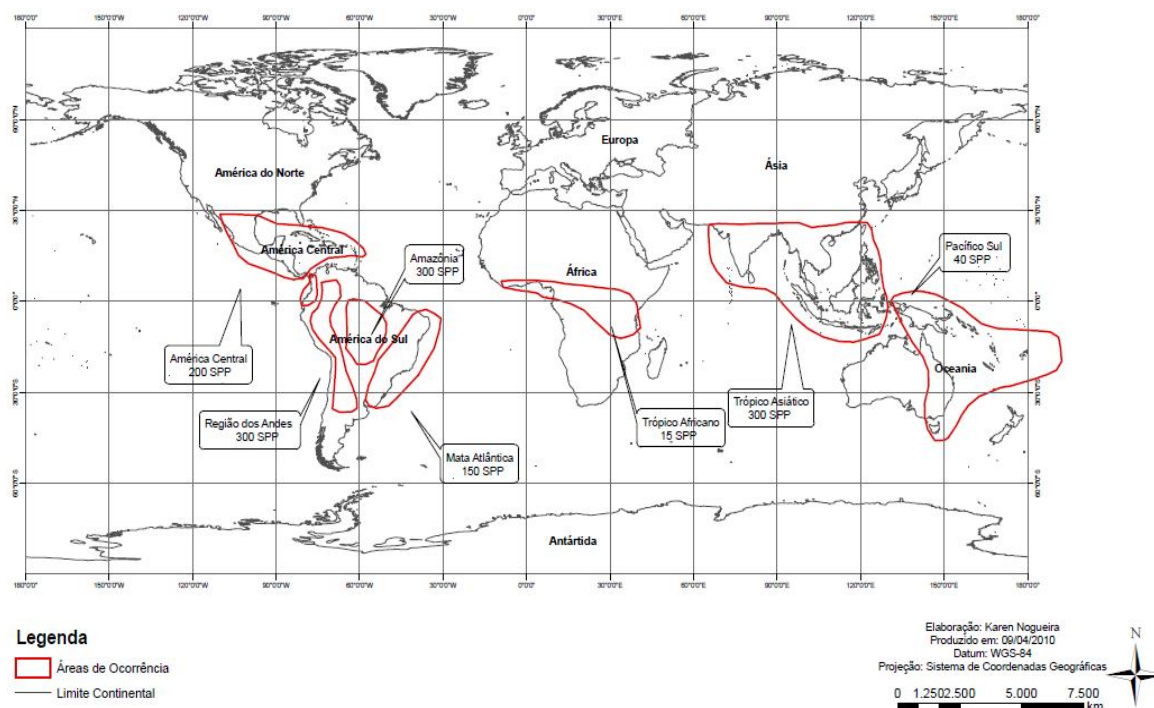


Fig.1- Distribuição Geográfica do gênero *Piper* e *Peperomia* (Piperaceae)
Fonte: Figura adaptada de JARAMILLO e MANOS, 2001

No Brasil, esta família distribui-se em quatro gêneros e cerca de 500 espécies (YUNCKER, 1972, 1973 e 1974) como observado, também, por Giordano e Guimarães (2004) no nordeste brasileiro: *Ottonia*, *Peperomia*, *Piper* e *Pothomorphe* não tendo sido assinalado o gênero *Sarchorhachis* exclusivo das regiões sudeste e sul do Brasil. Incluso a esta distribuição, a família Piperaceae, também ocorre nas florestas atlânticas e amazônicas (MONTEIRO e GUIMARÃES, 2008).

Na região Amazônica, segundo Maia e Andrade (2009), a família Piperaceae, dentre as 12 famílias de ocorrência de plantas aromáticas, apresentou maior predominância nesta região. Portanto, demonstrando possuir uma grande potencial para estudos relacionados à etnobotânica, etnofarmacologia, georeferenciamento, análises de composição química, aspectos ecológicos e até econômicos.

Diante destes fatos, esta família apresenta importâncias econômicas e medicinais. Algumas espécies fazem parte do mercado mundial, como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), comercializada desde o século XV, cujos frutos de sabor picante, são utilizados como condimento. Seus frutos maduros produzem a pimenta branca, enquanto os frutos colhidos verdes, secos, produzem a pimenta preta do comércio (JOLY, 1984).

No Brasil, a população rural sempre fez uso de plantas medicinais, dentre elas destaca-se a família Piperaceae, muitas vezes, as plantas medicinais que representam esta família são vendidas em feiras e no comércio local, com expressiva importância econômica e, não raro, pelo baixo custo, representam a única alternativa possível para esta parcela da população, onde já foi relatado o uso de erva-de-jabutí (*Peperomia pellucida*) em diabetes, tosse, hipertensão, dor de garganta, resfriados e gripes; também o elixir parigórico (*Piper callosum*) em diarreia, eliminação de gases, febre, problemas de estômago. A *Piper marginatum* conhecida como, pimenta-do-mato usada em problemas no fígado e gonorréia (PEREIRA et al. 2007). *Peperomia rotundifolia* para diarreia (LANS, 2007), *Peperomia elongata* conhecida como erva-de-soldado, utilizando folhas e inflorescências para o tratamento de leucorréia (VAN DEN BERG, 1982), *Pothomorphe umbellata* conhecida como, pariparoba usada em furúnculos (LORENZI e MATOS, 2002) e o potencial

medicinal de *Piper nigrum* utilizado por muitos povos como soluções para problemas estomacais, diurese e falta de apetite (PIO CORREA, 1984).

2.2. O gênero *Peperomia*

O gênero *Peperomia*, constitui um dos núcleos da família Piperaceae, agrupadas na subfamília Piperioideae (SAMAIN et al.2008) e na ordem Piperales (APG, 2003). Dentro desta ordem, todos os tipos de crescimento e de formas de vida ocorrem, como geófitas, ervas, plantas, suculentas, parasitas, cipós, arbustos, árvores e epífitas (SAMAIN et al. 2009). Além disso, este gênero apresenta distribuição pantropical, contendo aproximadamente 1600 espécies, e está entre os 10 mais importantes gêneros entre os 57 existentes nas Angiospermas (FRODIN, 2004).

Ressalta-se ainda, a importância do gênero *Peperomia* onde muitas espécies são cultivadas como ornamentais, por exemplo: *P. caperata*, *P. clusiaefolia*, *P. obtusifolia*, *P. scandens*, *P. sandersii* e *P.serpens* cuja beleza reside, principalmente, em sua folhagem, enquanto outras são utilizadas na alimentação e como medicinais (LORENZI e SOUZA, 1999).

No tratamento medicinal, algumas espécies demonstraram atividade antimicrobiana como *P. tetraphylla* (WHITE, OSHIMA e LESWARA, 2007), efeito depressor (KHAN, RAHMAM e ISLAM, 2008), analgésica e antiinflamatória (ARRIGONI-BLANK et al. 2004).

2.3. Espécie *Peperomia serpens* e descrição botânica

A espécie *P.serpens* (Sw) Loud. (sinonímias: *A. guildingianum*, *A. scandens*, *P. scandens*, *P. scandens* e *V. serpens*) é uma liana, herbácea com folhas pecioladas, cordatas e suculentas. Além disso, é conhecida popularmente como carrapatinho ou carapitinha, cresce de maneira selvagem e em diferentes árvores da floresta Amazônica (DA SILVA, ANDRADE e CARREIRA, 2006). Ver **figura 2**



Fig.2: Espécie de *Peperomia serpens*
Fonte: www.mobot.org

Esta planta apresenta ainda, indicações pela medicina popular, onde as folhas desta espécie são usadas na forma de decoctos como antigripais, antiasmáticos, analgésicos e juntamente com o mel como antitussígeno. A seiva extraída das folhas pulverizadas é usada para otalgia (GRENAND, MORETTI e JACQUEMIN, 1987). As folhas aromáticas e o caule, ainda são utilizados topicamente, após a picada de uma formiga Kofans para alívio da irritação (SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

O gênero *Peperomia*, foi descrito botanicamente por Ruiz e Pavon (1974) como ervas anuais ou perenes, terrestres, epífitas ou rupícolas, frequentemente carnosas, inflorescências em racemos ou espigas terminais, axilares ou opostas às folhas com flores diminutas, protegidas por uma bractéola, ovário unicarpelar e dois estames, dispostos lateralmente, na base do pistilo e frutos com ápice pontuado, mamiliforme, rostrado ou com escudo oblíquo, por vezes com pseudo-cúpula na base. De acordo com as possíveis indicações etnofarmacológicas, decidimos avaliar um possível envolvimento em mecanismos terapêuticos desta espécie tanto na dor como em processos inflamatórios.

3. FISIOPATOLOGIA DA DOR

3.1. Dor

A dor foi conceituada pela primeira vez em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência sensorial e

emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais (KLAUMANN, WOUK e SILAS, 2008). O termo “dor” refere-se à experiência desagradável, quando associada com a lesão tecidual real ou potencial causada por um estímulo nocivo. A dor como experiência emocional inclui não somente a percepção sensorial de um estímulo, mas também a análise cognitiva e a resposta emocional a eles associadas (WATKINS e MAIER, 2003). A dor é extensivamente influenciada por ansiedade, depressão, expectativa e outras variáveis psicológicas que são identificadas como componentes emocionais da dor - percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo, que é seguido pela tomada de consciência e pela reação a dor, caracterizando como resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN e BANSINATH, 1996).

No Brasil e em outros países, 10% a 50% dos indivíduos procuram clínicas gerais por causa da dor. A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos, enfatizando a importância da busca de elementos que permitem outros tipos de terapêuticas para a dor aguda e crônica (TURK e MELZACK, 1992; JAMES, LARGE e BUSHNELL, 1991)

A dor pode ser classificada de várias maneiras, uma delas é de acordo com a sua duração. A dor aguda se dá pela ativação direta de nociceptores (estruturas especializadas na detecção de estímulos nocivos) após um estímulo nocivo capaz ou não de causar alguma lesão. Quando a dor persiste por semanas ou meses, é classificada como dor crônica. A dor crônica muitas vezes permanece mesmo após a recuperação da lesão. Além disso, ela se caracteriza também pela incapacidade do organismo restabelecer suas funções fisiológicas (LOESER e MELZACK, 1999).

3.2. Nocicepção e fibras nociceptivas

A nocicepção consiste em uma sensação fisiológica da dor que resulta da ativação de vias nociceptivas por diferentes estímulos de intensidade suficiente para causar ameaça ou dano tecidual (estímulos nocivos) (WOLF e MA, 2007). Na nocicepção ocorre a detecção destes estímulos que para o organismo resulta em um processo de ajuda, proteção e prevenção de

ferimentos, gerando reflexo como de retirada e sensação desagradável perante o estímulo nódico. Estas estratégias fisiológicas acabam por resultar em medidas comportamentais para evitar um novo contato com tais estímulos. Além disso, a nociceção é um fenômeno importante, pois reforça ainda mais a função protetora mediante a ativação do sistema nociceptivo que ocorre por estímulos nocivos repetidos ou particularmente intensos com o intuito de transduzir, transmitir e modular os sinais neurais da periferia à nível central (ALBAN e WOLF, 2009). A informação nociceptiva de forma geral chega ao sistema nervoso central, através de uma cadeia de três neurônios: neurônio de 1ª ordem (projeção da periferia ao corno dorsal da medula espinhal), 2ª ordem (ascende pela medula espinhal) e 3ª ordem (projeta-se até o córtex cerebral) (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

Segundo PISERA (2005), o primeiro processo da nociceção é a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados denominados nociceptores. Os nociceptores por sua vez, em sua maioria estão presentes em fibras aferentes sensitivas chamadas de fibras nociceptivas (KIDD e URBAN, 2001). Estas são classificadas de acordo com o diâmetro, mielinização e velocidade de condução, as fibras do tipo C que são delgadas (0,4 a 1,2 μm de diâmetro), não-mielinizadas e de baixa velocidade de condução (0,5 a 2 m/s); fibras A δ que são de médio diâmetro (2 a 6 μm), pouco mielinizadas e possuem velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s); fibras do tipo A β que são de grande diâmetro (mais de 10 μm), mielinizadas e de rápida condução (30 a 100 m/s) (ALMEIDA et al. 2006). As fibras A δ e C estão envolvidas, exclusivamente, com a transmissão da informação nociceptiva. As fibras do tipo A, promovem uma resposta mais rápida que resulta na dor aguda ou de primeira fase que freqüentemente desencadeia um reflexo de retirada, enquanto as fibras do tipo C são responsáveis por uma dor mais difusa, geralmente, persistente à dor aguda (JULIUS e BASBAUM, 2001).

3.3. Mecanismo de transmissão da dor e vias nociceptivas

A atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias algôgenicas liberadas e/ou sintetizadas em elevada concentração, no ambiente

tecidual, na decorrência de processos inflamatórios (COTRAN, KUMAR e ROBBINS, 1994). Substâncias endógenas, como prostaglandinas (PGs), neuropeptídeos, cininas, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado e estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios. Além disso, segundo Björkman (1995) os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibiliza o nociceptor, a estimulação dos nociceptores aferentes primários produz um reflexo espinhal local, resultando na liberação de neuropeptídios, particularmente, substância P (SP), neurocinina A (NKA) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A SP liberada induz degranulação de mastócitos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma.

A informação nociceptiva é então integrada através das fibras aferentes nociceptivas, representadas principalmente pelas fibras A δ e C, fibras sensoriais de elevado limiar, projetadas da periferia para o corno dorsal da medula onde ativam grande número de neurônios internunciais de segunda ordem e neurônios de projeção da medula, alguns dos quais são ativados exclusivamente por estímulos nócicos, através de células nociceptivas específicas e outros por estímulos de baixa intensidade (neurônios de larga faixa dinâmica ou multirreceptivos). As fibras C não-mielinizadas terminam nas lâminas I, II e V do corno dorsal, enquanto as fibras mielinizadas A δ terminam nas lâminas I e II e também penetram mais profundamente nas lâminas V (BONICA, YAKSH e LIEBESKIND, 1990).

Os terminais centrais de fibras aferentes primárias apresentam projeções para o corno dorsal da medula espinhal, que está organizada em diferentes lâminas. Na superfície destas lâminas, principalmente I e II, são encontradas nociceptores específicos (NE) que realizam sinapses exclusivamente com fibras A δ e C, também existem células que recebem somente inervação de fibras A β (propioceptivas) respondem ao toque. Outras células, chamadas de neurônios de amplas faixas dinâmicas (AFD), também são capazes de receber a inervação das três fibras nociceptivas, processando e decodificando qualquer estímulo.

Os neurônios juntamente com os neuropeptídeos facilitam o fenômeno de amplificação e transmissão da dor, que ativam receptores glutamatérgicos e interneurônios inibitórios GABAérgicos (que podem inibir o impulso nervoso) (D`MELLO e DICKENSON, 2008). Os neurônios inibitórios estão presentes na substância gelatinosa da medula espinhal, onde predomina as fibras de segunda ordem que cruzam o corno dorsal para ascender ao trato espinotalâmico (via ascendente), projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo, os neurônios de terceira ordem emitem axônios á matriz da dor (principalmente ao córtex somatosensor), neste ocorre a somatização do estímulo nocivo. Por conseguinte, há projeções axônais ao giro cingulador anterior (componente do sistema límbico), neste existe o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998) como demonstrado pela figura 3.

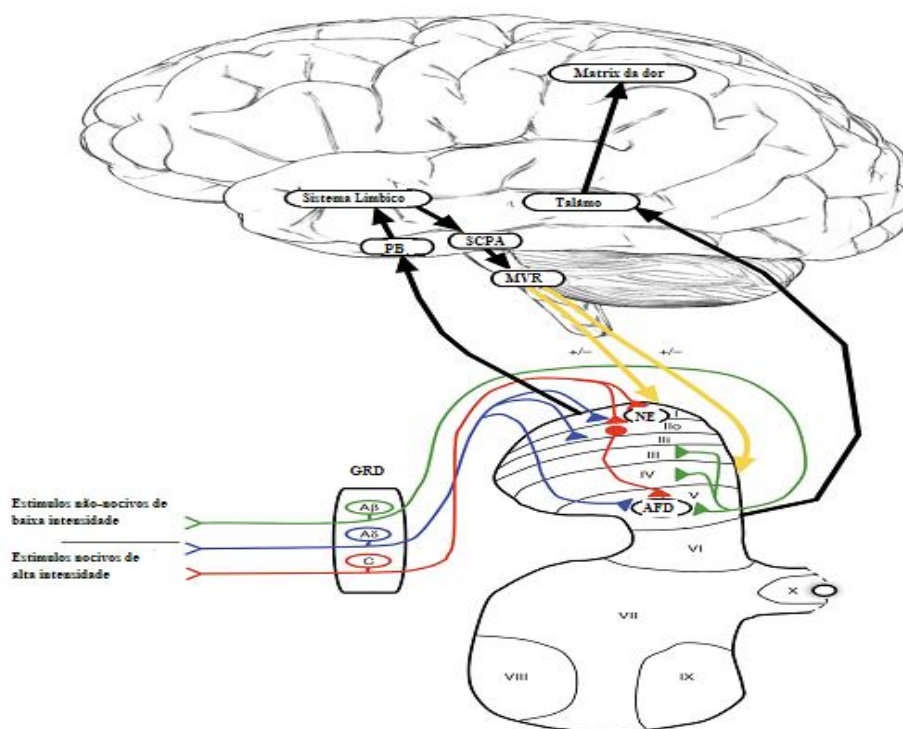


Figura 3: Mecanismo de transmissão da dor e envolvimento de fibras nociceptivas
Fonte: Adaptado de MELLO e DICKENSON, 2008

A outra via ascendente é verificada a partir das fibras de segunda ordem, que também podem ascender da lâmina I até a área parabraquial (PB) que emitem projeções axônicas até o sistema límbico (MELLER et al. 1994) .

A via descendente inicia-se a partir do sistema límbico, que apresenta projeções a substância cizenta periaquedutal (SCPA), através da via mesolímbica. A medula ventromedial rostral (MVR), irá modular a via inibitória da dor no corno dorsal da medula espinhal, através de mediadores como encefalinas, serotonina (5-HT) (produzidos através do núcleo magno da rafe) e noradrenalina (através do *Locus coeruleus*). Estes mediadores atuam nas lâminas I e IV, ativando os neurônios inibitórios, e posteriormente estes neurônios ativam os receptores GABAérgicos freando o estímulo nociceptivo (D`MELLO e DICKENSON, 2008).

3.4. Teoria do controle do portão (modulação da dor).

Melzack e Wall (1965) apresentaram uma teoria da dor, que denominaram teoria do controle do portão, estes autores se fundamentaram em um trabalho anterior de Mendell e Wall (1964), em que foi demonstrado que a estimulação de pequenas fibras nervosas aferentes resultou em um potencial positivo nos gânglios da raiz dorsal, enquanto que a estimulação de mesma intensidade de grandes fibras resultou em um potencial negativo na raiz dorsal. Essas observações foram interpretadas como indícios de facilitação pré-sináptica e inibição pré-sináptica.

Segundo a teoria do controle do portão, as primeiras células de transmissão central no corno dorsal posterior, dependem do equilíbrio entre as atividades das fibras de grande e pequeno diâmetro. Ou seja, caso a atividade das fibras de pequenos diâmetros predomine, ocorre à facilitação pré-sináptica e aumento da atividade de células centrais, resultando em fenômenos da dor (portão aberto). O inverso se aplica a atividade de fibras de grandes diâmetros, dificultando a transmissão pré-sináptica e diminuindo a atividade de células centrais resultando no fenômeno chamado de portão fechado. As implicações desta teoria salientam que a constante excitação de fibras aferentes causará uma redução da transmissão do impulso nervoso para medula espinhal, e assim a dor será reduzida ou freada, levando-se em consideração o limiar da dor e ação de interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa (NATHAN e RUDGE, 1974)

3.5. Dor inflamatória

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório que possuem um denominador comum que é a capacidade de sensibilizar ou ativar nociceptores. Esta sensibilização causa hiperalgesia ou alodinia em humanos, fenômeno que envolve a percepção da dor (componente emocional + sensação nociceptiva). Nos modelos que utilizam os animais, estes não são capazes de discriminar o componente emocional, apenas a sensação nociceptiva (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; JÚNIOR, 2006). Esta sensação ocorre mediante á uma lesão tecidual que induz a formação de mediadores químicos envolvidos na dor inflamatória de maneira localizada causando danos celulares, os mediadores são histamina (HIS), bradicinina (Bk), serotonina (5-HT), NO (óxido nítrico), trifosfato de adenosina (ATP), ativação da via de ácido aracdônico (AA) produzindo prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), íons (K^+ e H^+), recrutamento de células imunes que liberam mediadores como citocinas e fatores de crescimento. Alguns destes mediadores são capazes de atuar periféricamente de maneira direta induzido a dor espontânea e outros agem indiretamente via células inflamatórias estimulando a liberação de agentes algogênicos, podendo modificar a propriedade da resposta de neurônios nociceptivos periféricos, amplificando a dor (KIDD e URBAN, 2001).

4. FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

4.1. Resposta inflamatória e classificação.

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, que é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, apresentando como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e alteração funcional. Diante da lesão tecidual os sinais da inflamação são oriundos de alterações na microcirculação sanguínea, mediante a dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios como, PGs, LTs, HIS, cininas, 5-HT e etc. Há o aumento do fluxo sanguíneo na

área lesada produzindo calor e eritema (devido ao aumento de número de eritrócitos na área lesionada). Com aumento da temperatura, as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional, conseguintemente o edema surge com aumento da permeabilidade (VERGNOLLE, 2008).

A finalidade do processo inflamatório é remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual local. Durante a inflamação vários sistemas bioquímicos, como o sistema do complemento e da coagulação, são ativados auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo. Adicionalmente, várias substâncias solúveis de meia vida curta são liberadas, e exercem sua ação e são degradadas no sítio inflamatório. Em geral, o sucesso na remoção do estímulo lesivo leva à conclusão do processo e término da resposta aguda, ensejando o processo de reparo tecidual completo (JÚNIOR et al. 2011).

Os principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos são os anticorpos (defesa humoral) e os leucócitos (defesa celular). Estes são encontrados normalmente na corrente sanguínea, o que justifica a importância atribuída, na inflamação aguda, aos fenômenos vasculares. Em situações de homeostase, normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos movimentando-se no sentido do fluxo sanguíneo. Diante de um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem várias alterações, com o objetivo de facilitar a passagem de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR et al. 2005).

A inflamação pode levar a graves lesões teciduais causando descompensações fisiológicas, disfunções orgânicas e até mesmo à morte. Por estes motivos, o processo inflamatório foi dividido em dois tipos, agudo e crônico, divisão baseada na duração e características patológicas da reação. Artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, asma, silicose e aterosclerose são exemplos de doenças inflamatórias crônicas. Estas desordens são caracterizadas por longa duração (semanas, meses ou anos) com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo, ocorrendo simultaneamente. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas

típicas de inflamação crônica. A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas (plasma), migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Processos patológicos causados pela exacerbação de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepses, traumas severos e grandes cirurgias são exemplos de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

4.2. Alterações vasculares (vasodilatação e exsudação de líquidos)

Uma lesão significativa produz resposta vasomotora local inicial de vasoconstrição, que é um contribuinte primário para a restauração da homeostase. A vasoconstrição inicial é revertida 10 a 15 min após a lesão promove a transição de constrição para dilatação e é mediada por diversos fatores, como produtos endoteliais, mediadores derivados de mastócitos como HIS e 5-HT, derivados do AA, como PGs, LTs e NO contribuem para a vasodilatação (ALLER et al. 2006). O edema, uma característica fundamental da inflamação aguda, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de líquido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício (ALLER et al. 2006). Resultado das ações de mediadores como HIS, BK, LTs, componentes do complemento, SP e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas. Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Segundo Demling (1982) *apud* Jonkam (2007) para ocorrer a vasodilatação de vasos sanguíneos, a pressão hidrostática é aumentada no local da lesão tecidual durante a inflamação aguda resultando na vasodilatação local. Além disso, o extravasamento de exsudato juntamente com o aumento de fluxo

sanguíneo promove elevação de concentração de hemácias em pequenos vasos durante a vasodilatação promovendo aumento da viscosidade sanguínea

4.3. Alterações celulares (fenômenos da migração celular)

A vasodilatação e a exsudação de fluídos são acompanhadas de rolamento leucocitário, adesão e transmigração. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos e mais abundantes no local da inflamação ou infecção. O processo de migração celular para o espaço intravascular (interstício inflamado) ocorre principalmente em vênulas pós-capilares na circulação sistêmica (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os polimorfonucleares e monócitos são recrutados do sangue para os locais de infecção por ligação a moléculas de adesão em células endoteliais e por fatores quimioatraentes produzidos em resposta à infecção (FUHLBRIGGE e WEISHAUP, 2007).

O fenômeno de migração é dividido em múltiplas etapas (figura 4): rolamento, adesão, transmigração e quimiotaxia. A marginação é o processo de movimento dos neutrófilos da corrente sanguínea para a periferia das veias, isto é facilitado pela estase, seguida de extravasamento de fluido no sítio inflamatório e interação entre eritrócitos e neutrófilos (PERRY e GRANGER, 1991)

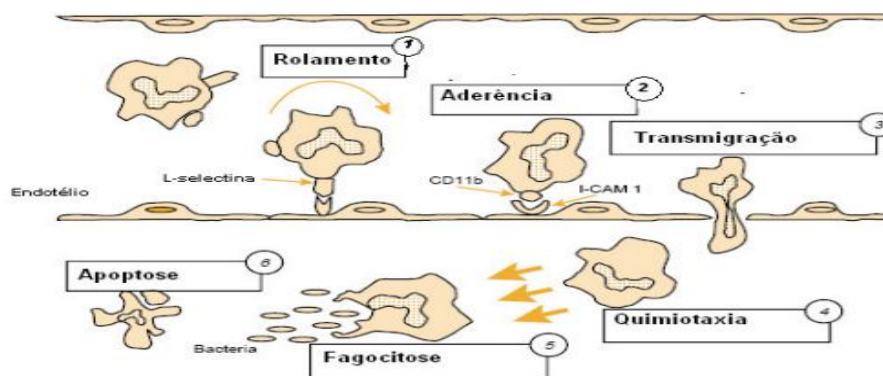


Fig. 4: Múltiplas etapas do processo de migração celular, (1) rolamento, (2) aderência, (3) transmigração, (4) quimiotaxia, (5) fagocitose e (6) apoptose

Fonte: Figura adaptada de SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004

Tanto o endotélio como as moléculas de adesão presentes neste, participam da desaceleração de leucócitos quando estes entram nas vênulas pós-capilares, neste local ocorrem às principais interações leucócito-endotélio. Estas interações dependem de diferentes famílias das moléculas de adesão, incluindo selectinas, β -integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (PANÉS, PERRY e GRANGER, 1999).

O rolamento é caracterizado como um processo de adesão instável, envolvendo principalmente as selectinas E e P (no endotélio) e selectina L (no leucócito) que interagem com ligantes carboidratos (ligação sialil-lewis) (MAYADAS e CULLERE, 2005). A selectina L, liga-se a diferentes moléculas de adesão celular no endotélio, incluindo selectina P, E e glicoproteínas semelhantes a mucina (GlyCAM) (TEDDER et al, 1995). A selectina P é expressa no endotélio e nas plaquetas a partir da estimulação das células endoteliais por mediadores, como trombina ou HIS. Além disso, esta selectina é expressa em resposta a endotoxinas ou citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PAN, 1998). A selectina E é sintetizada nas células endoteliais induzida por citocinas pró-inflamatórias TNF- α e interleucina-1(IL-1) ou endotoxinas (FRIES et al. 1993).

A aderência consiste em um processo celular de adesão caracterizado por ser estável (estático) em relação ao rolamento, este fenômeno ocorre devido à interação de integrinas e as moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, as integrinas são proteínas heterodiméricas consistindo em duas subunidades α e β . Estas glicoproteínas são expressas na superfície de leucócitos, sendo responsáveis por mediar à adesão de leucócito-endotélio em poucos minutos após o estímulo inflamatório. As integrinas são classificadas de acordo com a estrutura molecular: subfamílias β -1, β -2 e β -7, a subfamília β -2 contém quatro cadeias α diferenciadas designadas de CD11a, CD11b, CD11c e CD11d que são acoplados a uma cadeia β comum CD18. O heterodímero CD11a/CD18 é expresso na superfície de leucócitos e interagem com moléculas de adesão intercelular (ICAM) ICAM-1 e ICAM-2, causando adesão firme e promovendo alterações conformacionais nos leucócitos, os heterodímeros CD11b/CD18 e CD11c/CD18 são expressos por granulócitos e monócitos, está expressão aumenta durante a inflamação mediante a ação de

mediadores como o PAF e citocinas como TNF- α (PANÉS, PERRY e GRANGER, 1999).

As integrinas dependem de seu estado de afinidade para promover a adesão, a ligação destas moléculas presente na superfície dos leucócitos é mediado por quimiocinas, que são produzidas em resposta a produtos microbianos, IL-1 e TNF- α , cuja função é estimular quimiotaxia de células. Os leucócitos expressam as integrinas as quais estão em estado de baixa afinidade nas células não-ativadas (neste estado não há interação leucócito-endotélio). A sinalização dos receptores a quimiocinas promove aumento na afinidade das integrinas pelos seus ligantes e agregação dessas moléculas de adesão na membrana, resultando em maior ligação dos leucócitos à superfície endotelial (D'AMBROSIO, PANINABORDIGNON e SINIGAGLIA, 2003; TIZARD, 2008).

Paralelamente à ativação das integrinas e sua conversão ao estado de alta afinidade, TNF- α e IL-1 também promovem aumento da expressão endotelial de ligantes das integrinas, principalmente de moléculas de adesão vascular (VCAM) tipo VCAM-1, ligante para integrina do 4-antígeno muito tardio (VLA-4), e ICAM-1 (SERHAN e SAVIL, 2005; FUHLBRIGGE e WEISHAUP, 2007). As quimiocinas então atuam sobre os leucócitos aderentes e estimulam as células a migrar através dos espaços interendoteliais na direção do local de infecção, caracterizando a transmigração endotelial. Outras proteínas expressas nos leucócitos e nas células endoteliais, como CD31, desempenham papel importante nessa migração. Além disso, os leucócitos produzem enzimas que os capacitam a passar através da parede vascular, e acumulam-se no tecido extravascular em torno dos patógenos, onde realizam o processo de fagocitose (JÚNIOR e ARAÚJO, 2011).

Neutrófilos e outros leucócitos também precisam de fatores quimioatraentes para facilitar a migração no local da infecção ou inflamação como algumas moléculas de produtos bacterianos, componentes do complemento e citocinas quimioatraentes. Estas quimiocinas são produtos de leucócitos onde as principais são as quimiocinas α e β , sendo a IL-8 pertencentes à quimiocinas $-\alpha$ mais potente para neutrófilos, enquanto a β atrai para o local da inflamação uma variedade de leucócitos (basófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos) (LUSTER, 1998).

4.4. Mediadores químicos envolvidos na inflamação e dor

4.4.1. EICOSANÓIDES (PROSTANÓIDES, LTs e LIPOXINAS)

O AA , um ácido graxo poliinsaturado derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial ácido linolêico, é clivado dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da fosfolipase C (PLC) (RICHARDSON e VASKO, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). O AA é formado principalmente em resposta a uma variedade de ativação de estímulos não específicos (físico, químico, hormonal e citocinas e etc.). Duas classes principais de enzimas são responsáveis pela síntese dos metabólitos do AA, também chamados de eicosanóides: as ciclooxigenases (COXs) sintetizam as PGs e os Tromboxanos (TXs); e as lipoxigenases (LOXs) produzem os LTs e as lipoxinas (LXs) (ALWANI et al. 2006; WAGNER e ROTH, 2000).

A enzima COX possui duas isoformas identificadas: COX-1 e COX-2. A primeira apresenta-se de forma constitutiva na maioria dos tecidos corpóreos, enquanto a segunda, embora também se manifeste constitutivamente, é produzida com maior intensidade em estados patológicos como na inflamação (BURIAN e GEISLINGER, 2005; PACHER et al. 2007). As COXs transformam o AA em Prostaglandina G₂ (PGG₂) e esta em Prostaglandina H₂ (PGH₂), posteriormente ocorre a conversão em PGs biologicamente ativos, incluindo Prostaglandina E₂ (PGE₂), Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), Prostaglandina D₂ (PGD₂), Prostaglandina I₂ (PGI₂) e Tromboxano A₂ (TXA₂), conhecido coletivamente como prostanóides (ROCCA e FITZGERALD, 2002). As PGs e os TXs medeiam importantes ações da resposta inflamatória, como a vasoconstrição inicial, que se dá pela ação do TXA₂, dentre outros mediadores (ALLER et al.2006; PACHER et al. 2007); a transição da vasoconstrição para a vasodilatação tem a participação das PGs vasodilatadoras PGI₂ (prostaciclina), PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α} ; TXA₂ é também potente agregador plaquetário, podendo levar à trombose tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004); as PGs são potentes agentes sensibilizantes, capazes de modular múltiplos sítios da via nociceptiva (BURIAN e GEISLINGER, 2005): PGE₂ e PGI₂ aumentam a liberação de peptídeos como SP e CGRP tipos de células, esses

metabólitos são denominados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Assim as plaquetas possuem apenas a 12-LOX e sintetizam o 12-HPETE, e os leucócitos têm tanto a 12-LOX, como a 5-LOX, e sintetizam o 12-HPETE e o 5-HPETE, que é quimiotático para neutrófilos. Os HPETE, semelhante às PGG₂ e PGH₂, são intermediários instáveis que sofrem metabolização enzimática (MORROW e ROBERTS II, 2003). Ver **figura 5**.

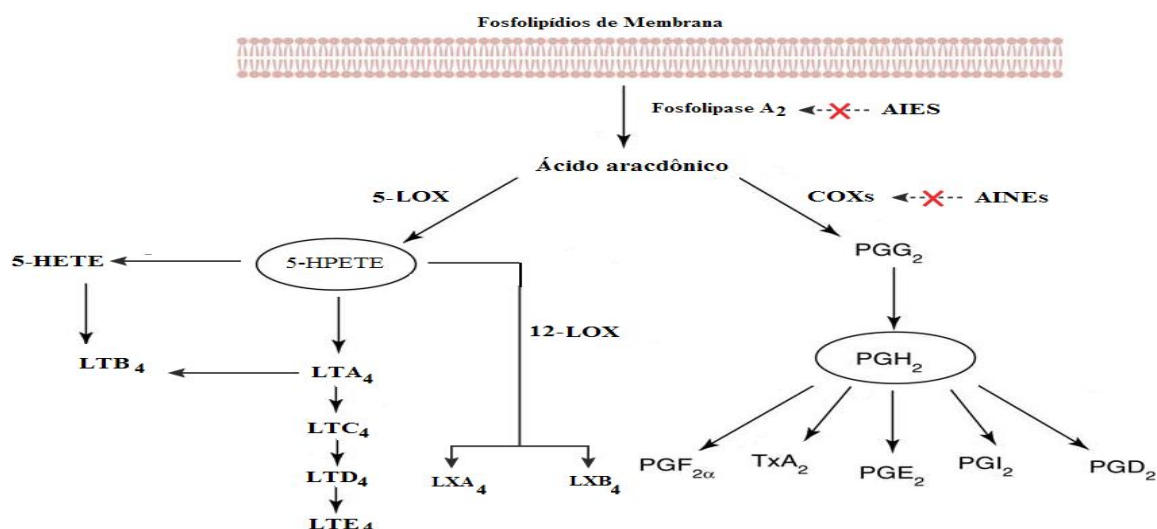


FIG.5. Cascata dos Eicosanóides

Fonte: Figura adaptada de SCHOLICH e GEISLINGER, 2006

A síntese a partir de reações do metabolismo do AA e LOXs, principalmente a 5-LOX determinam à formação dos LTs A₄, B₄, C₄, D₄ e E₄. Estes vários LTs estão envolvidos em funções como, quimioatração de neutrófilos e estimulação do processo de adesão de leucócitos com as células endoteliais (GOLDEN e BROCK, 2001), bem como extravasamento plasmático e aumento da permeabilidade vascular (FUNK, 2001).

As ações pró-inflamatórias de inúmeras PG e LT são contidas/reguladas, por uma classe de moléculas chamadas lipoxinas (LXs). As LXs são uma classe de eicosanóides oxidados que se ligam a receptores celulares e bloqueiam o influxo de neutrófilos (NATHAN, 2002). Estas moléculas são geradas pela ação combinada de leucócitos, principalmente neutrófilos, e plaquetas (DYKE e SERHAN, 2003; GILROY et al. 2004).

4.4.2. HISTAMINA

A síntese foi realizada em 1907 e a caracterização por Barger e Dale (1910), observando-se o envolvimento deste mediador em reações anafiláticas. A HIS está armazenada em mastócitos, que estão distribuídos pelo corpo, e também podem ser encontradas em humanos nos basófilos, células gástricas enterocromafinas e em nervos histaminérgicos. Além disso, a histamina como um mediador pode atuar em 4 sub-tipos de receptores H_1 , H_2 , H_3 e H_4 . O receptor H_1 é caracterizado por estar envolvido em eventos intracelulares como aumento de níveis de cálcio livre no citosol de células. O mediador histamina quando ativa o receptor H_2 , intracelularmente, ocorre elevação adenosina monofosfato cíclico enquanto, H_3 e H_4 elevam os níveis de adenosina monofosfato cíclico e liberação de cálcio (MACGLASHAN, 2003). A HIS tem participação importante em fenômenos inflamatórios. Na rinite alérgica e na asma, a administração de bloqueadores dos receptores H_1 reduz a sintomatologia inflamatória. A HIS induz síntese de PGI_2 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, LEWINSKI e JOCHEM, 2005; CHIMONA et al. 2008).

4.4.3. SEROTONINA

A 5-HT, como outros neurotransmissores, também é liberada em resposta ao dano tecidual e inflamação, sendo proveniente principalmente de plaquetas, mastócitos e células endoteliais, bem como de terminais serotoninérgicos centrais (PIERCE et al. 1997) e ajuda na sensibilização e ativação dos neurônios nociceptivos. 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 ($5-HT_1$ – $5-HT_7$) (WOUTERS, FARRUGIA e SCHEMANN, 2007). A 5-HT, assim como a HIS, é uma amina vasoativa que realiza efeitos fisiológicos como aumento da permeabilidade

vascular durante a fase inicial da resposta inflamatória (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999).

4.4.4. CININAS

Os peptídeos cininas, qual o membro mais conhecido é a Bk são conhecidos como importantes mediadores inflamatórios. Além disso, as cininas são sintetizadas nos locais da lesão tecidual, periféricamente e no sistema nervoso central, onde participam do processo inflamatório agudo, na resposta microvascular e na reparação de tecidos. A maioria das ações das cininas são mediadas pelas interações com receptores da Bk. A existência de dois subtipos de receptores de Bk foi descrita por Regoli e Barrabé (1980) receptores B₁ e B₂. Os receptores B₁ são originalmente descritos em tecidos isolados, incluindo aorta de coelho, bem como nos sistemas cardiovascular, renal, intestinal, em cultura de células vasculares, endotélio e fibroblastos com propriedades hiperálgicas, extravasamento de plasma e na regulação da pressão sanguínea. Enquanto os receptores B₂ são descritos nos mesmos tecidos em que estão envolvidos os receptores B₁, incluindo respiratório, ocular e neuronal com propriedades fisiológicas como broncoconstrição, hipotensão, reações inflamatórias agudas, dor e hiperalgesia (HALL, 1997).

4.4.5. CITOCINAS

As citocinas são definidas como polipeptídeos produzidos e liberados por células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios como viroses, parasitas, bactéria e outros produtos. Em geral são liberadas sequencialmente de maneira controlada por vários tipos de células e são responsáveis por produzirem mediadores finais como PGs envolvidos na indução de sinais e sintomas inflamatórios. As citocinas podem atuar em receptores da mesma célula onde são produzidas (efeito autócrino) ou em receptores de outras células (efeito parácrino), e podem ser circulantes agindo em tecidos distantes (efeito hormonal). Esta ação como mediadores pró-inflamatórios induzindo a dor inflamatória, ocorre mediante a uma liberação de cascata de citocinas por células residentes, incluindo células dendríticas,

macrófagos, linfócitos, mastócitos e componentes teciduais envolvidos nos sinais da inflamação e outros eventos inflamatórios. As primeiras citocinas participantes dos sinais e sintomas da inflamação foram as interleucinas (IL): IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6, quimiocinas IL-8, 1-quimiocina indutora de neutrófilos quimioatraentes (CINC-1) e quimiocina derivado de queratinócitos (KC). E recentemente foi demonstrado que a IL-18 e IL-12 são indutoras da hipernocicepção inflamatória (JÚNIOR et al. 2006).

A IL-1 β é produzida em diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, monócitos e células da glia, esta citocina é envolvida na inflamação desempenhando efeitos sobre o recrutamento de leucócitos, febre, liberação de proteínas da fase aguda e aumento da permeabilidade vascular (DINARELLO, 1998 e 1984). A IL-1 β estimula a expressão de COX-2 e subsequentemente a liberação de PGs, sensibilizando os nociceptores (CROFFORD et al. 1994; FERREIRA e NAKAMURA, 1979). Sendo que este efeito é inibido pelos antagonistas de receptores IL-1ra (periféricamente e centralmente) e fator liberador de corticotropina (JÚNIOR et al. 2006). Além disso, esta citocina é capaz de induzir a hipernocicepção inflamatória mediada por agentes inflamatórios como a Cg e o lipopolissacarídeo (LPS) (CUNHA et al. 1992; CUNHA et al. 2005).

O TNF- α é reconhecido como uma citocina pró-inflamatória potente que é rapidamente produzida em larga quantidade por macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios como na infecção bacteriana (WARE, 2005; BAZZONI e BEUTLER, 1996). Além disso, foi demonstrado que esta citocina induz hipernocicepção mecânica no modelo de edema de pata em ratos induzido por carragenina (Cg) e este efeito foi inibido por indometacina (inibidor de COX) e atenolol (antagonista de receptor β adrenérgico), e o co-tratamento com ambas sugerem uma hipernocicepção induzida por TNF- α mediada por prostanóides e aminas simpáticas, estas vias são paralelas: (1) TNF- α induz IL-1 β e consequentemente os prostanóides e (2) TNF- α induz IL-8 e consequentemente aminas simpáticas (CUNHA et al. 2005). Além disso, esta citocina é capaz de aumentar a expressão de ICAM-1 na adesão e recrutamento celular (SCHAFERS et al. 2002).

A IL-6 é uma citocina que atua em vários alvos celulares atuando principalmente na regulação da resposta imune e inflamatória (NAKA et al.

2002). As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 são produzidas de maneira dose-tempo dependente mediante a hipernocicepção mecânica em ratos onde anti-inflamatórios não esteroidais como a indometacina, além de anticorpos anti-IL- β ou IL-1ra são capazes de atuar sobre estes mediadores (CUNHA et al. 2000).

Além destas citocinas pró-inflamatórias existem as anti-inflamatórias que determinam um verdadeiro balanço na resposta inflamatória, este balanço ocorre mediante a produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β que liberam em seguida as citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra. Estas citocinas modulam eventos imunes e inflamatórios inibindo a produção e ação das citocinas pró-inflamatórias (NIIRO et al. 1995; FALLON et al. 2002).

4.4.6. O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento constitui-se de uma série de proteínas que são ativadas por microorganismos e servem para promover a inflamação e destruição destes microorganismos. Anticorpos imunoglobulinas G ou M, que se encontra fixados a superfície dos microorganismos ou outras estruturas ativam a via clássica do complemento, assim chamada pois foi a primeira a ser definida, através da fixação ao componente C3 (CLEMENZA et al. 2003). A via alternativa é ativada por moléculas da superfície de microorganismos que se ligam ao componente C3 do complemento e serve como plataforma para a ativação de outras proteínas complementares. Já a via da lectina é ativada por ligação da manose a lectina que interage com glicoproteínas e glicolipídeos microbianos (SHERWOOD e TOLIVERKINSKY, 2004).

O fator C3a funciona como um quimioatraente, enquanto o fator C3b se gruda a superfície dos microorganismos facilita seu reconhecimento pelos fagócitos e promove fagocitose (FISHELSON, 1991). Esse fator forma um complexo proteolítico que cliva o fator C5 em C5a e C5b (PANGBURN e RAWAL, 2002). O componente C5a desempenha funções como quimiotaxia para neutrófilo e altera a permeabilidade vascular no local da inflamação. Posteriormente, o componente C5b se fixa a superfície da membrana dos microorganismos formando um complexo de membrana de ataque (formado

por C6, C7, C8 e C9) rompendo a célula e promovendo a sua destruição (COLE e MORGAN, 2003).

4.4.7. SUBSTÂNCIA P E OUTROS NEUROPEPTÍDEOS SENSORIAIS

A SP é um dos principais neurotransmissores e neuromoduladores do sistema nervoso periférico e central. A presença da SP em fibras C no corno dorsal da medula espinhal, especificamente na substância gelatinosa, leva a crer um importante papel deste mediador no processamento da resposta nociceptiva. Este mediador é sintetizado no gânglio espinhal, de onde é transportado centralmente para a substância gelatinosa e periféricamente para as terminações nervosas de muitos tecidos do organismo. O efeito da SP na nocicepção é dependente de concentração, a administração (i.p) ou i.p de baixas concentrações de SP induzem efeito analgésico, onde altas concentrações induzem hiperalgesia por uma suposta ação pré ou pós-sináptica (ZUBRZYCKA e JANECKA, 2000; STEWART et al. 1976; FREDERICKSON et al. 1978). Apesar de SP ser um peptídeo neural há relatos que este mediador é capaz de induzir a inflamação neurogênica, onde este peptídeo é capaz de induzir a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, radicais de oxigênio, derivados do AA e HIS que potencializam a lesão tecidual e estimulam o recrutamento de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória (HOLZER e HOLZER-PETSCHE, 1997). Além disso, este peptídeo é capaz de aumentar o extravasamento vascular, alterar a permeabilidade vascular (vasodilatação), promover quimiotaxia, acúmulo de leucócitos e induzir a aderência nas células endoteliais (HAINES et al.1993; KAHLER et al. 1993) e também induzem a degranulação de mastócitos e eosinófilos liberando HIS e 5-HT, liberam radicais livres de O₂ e tromboxano B₂ (KROEGEL et al. 1990).

Numerosos neuromoduladores e neurotransmissores estão envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva, entre estes vários compostos biológicos podemos encontrar a liberação periférica de outros peptídeos como a neurocinina A (NKA) e B (NKB), CGRP e somatostatina. A NKA exerce efeito excitatório similar a SP nos neurônios espinhais, a somatostatinina exerce efeito inibitório em neurônios espinhais e liberam SP e o

CGRP aumenta a liberação de SP para as fibras aferentes sensoriais (ZUBRZYCKA e JANECKA, 2000).

5. FÁRMACOS QUE ATUAM NA DOR E INFLAMAÇÃO

5.1. Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

Sabemos que as PGs são produtos originados do AA, que é obtido da dieta ou do ácido linoléico, encontrando-se presentes em todos os tecidos animais e exercendo várias funções. Quimicamente, são partes de um grupo denominado eicosanóides, derivados do AA e liberados de fosfolipídeos de membrana de células lesadas, por ação catalítica da PLA₂. As COX-1 e COX-2 e a hidroxiperoxidase catalisam as etapas seqüenciais de síntese dos prostanóides (PGs clássicas e tromboxanos) e as LOXs transformam o AA em LTs e outros compostos (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2007; BRENOL, XAVIER e MARASCA . 2000). O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre por meio da inibição específica da COX e conseqüente redução da conversão do AA em PGs (figura 5). Existem pelo menos duas isoformas de COX, que apresentam diferenças na sua regulação e expressão. A atividade de ambas as isoformas são inibidas por todos os AINEs em graus variáveis. A COX-1 e COX-2 possuem 60% de homologia na sua seqüência de aminoácidos, expressa em muitos tecidos. A COX-1, dita como constitutiva, auxilia na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal. A COX-2 é uma enzima indutível, geralmente indetectável na maioria dos tecidos, e sua expressão é aumentada em processos inflamatórios (SCHUMACHER, KLIPPEL e KOOPMAN. 2001).

Entre os principais AINEs a aspirina é capaz de acetilar as isoenzimas (COX-1 e COX-2) covalentemente, inativando-as de forma irreversível e não-seletiva. A maioria dos AINEs tradicionais age de forma reversível e não-seletiva sobre as mesmas enzimas. No entanto, convém salientar que tanto a aspirina quanto os outros AINEs não bloqueiam a via da LOX, não inibindo, dessa forma, a produção de LTs. Portanto, os AINEs reduzem, mas não eliminam completamente os sinais e sintomas inflamatórios (CHAHADE,

GIORGI, SZAJUBOK, 2008). A inibição de PGs é responsável por seus principais efeitos colaterais: gastrite, disfunção plaquetária, comprometimento renal e broncoespasmo. O efeito antitrombótico ocorre pelo bloqueio da COX-1, ao inibir a produção do TX, ocasionando o predomínio da atividade de PG endotelial (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2007).

Os AINEs tradicionais existentes podem causar graves efeitos colaterais que limitam suas utilizações, principalmente a médio e em longo prazo, enfermidades reumáticas crônicas, promovendo transtornos gástrico, intestinais e renais. Nos rins estas complicações eram tão graves que foram denominadas de nefropatias analgésicas, caracterizadas por necrose papilar, hipertensão arterial e, finalmente, insuficiência renal. Essas complicações, freqüentemente observadas na primeira metade do século passado, provocaram uma busca incessante de novos medicamentos que fossem eficazes e tivessem maior margem de segurança, com respeito aos inconvenientes mencionados (HORL, 2010).

O primeiro antiinflamatório lançado para comercialização a partir desse conceito foi o meloxicam, desenvolvido a partir de uma molécula que apresentava atuação, inibindo, preferencialmente, a COX-2, mantendo um bloqueio parcial da COX-1. Outros AINEs já em uso, como o etodolaco e a nimesulida, também se mostraram inibidores preferenciais ou seletivos para COX-2. Esse grupo de medicamentos carece de um grupo carboxílico presente na maioria dos AINEs e, por isso, são capazes de, seletivamente, se dirigirem à enzima COX-2, diferindo dos outros antiinflamatórios tradicionais. Eles apresentam baixa hidrossolubilidade, o que dificulta a sua administração parenteral (CHAHADE, GIORGI, SZAJUBOK, 2008).

Todos AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrintestinais, que podem variar de dispepsia à sangramentos de estômago e duodeno, ativar doenças inflamatórias intestinais quiescentes e causar dano tecidual (como úlceras) no trato GI baixo, geralmente, após um longo período de uso (MIZUSHIMA, 2010). Por inibirem a COX-1, os AINEs impedem a síntese de PGs gástricas, especialmente PGI₂ e PGE₂, que servem como agentes citoprotetores da mucosa gástrica. A maioria dos AINEs inibe a COX-1 e a COX-2 de forma não-seletiva e assim diminuem a produção de PGs gástricas. Os inibidores seletivos da COX-2 preservam a proteção mediada por

PGs gástricas. Entretanto, os inibidores seletivos da COX-2, em altas doses, podem perder sua especificidade e também bloquear a COX-1 no estômago e duodeno causando danos (BLOT e MCLAUGHLIN, 2005). Os inibidores seletivos da COX-2, conhecidos como coxibes (celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe e lumiracoxibe), vieram ao mercado com o objetivo de aliviar os sinais-sintomas inflamatórios e diminuir com maior segurança o risco de eventos gastrintestinais indesejáveis. No entanto, alguns estudos clínicos evidenciaram ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e tromboembólicos, em usuários crônicos destes novos medicamentos (SARAIVA, 2007), os inibidores da COX-2, reduzindo a produção de PG vascular, poderiam afetar o equilíbrio entre TXA₂ e PGI₂, levando a um aumento de eventos trombóticos e cardiovasculares. Além disso, Os AINEs podem induzir insuficiência renal aguda (IRA) de duas diferentes maneiras: hemodinamicamente mediada ou por nefrite intersticial (freqüentemente acompanhada de síndrome nefrótica). Esses efeitos estão diretamente relacionados à redução da síntese de PGs induzida pelos AINEs (HORL, 2010).

5.2. ANTIINFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS (AIEs)

Os glicocorticóides são drogas amplamente usadas em função de seus efeitos imunossupressivos e anti-inflamatórios no tratamento de muitas doenças reumáticas, além de outras doenças inflamatórias. Os principais são dexametasona, prednisona, hidrocortisona, prednisolona e etc (ANTI, GIORGI e CHARADE, 2008). Atribui-se a ação antiinflamatória dos glicocorticóides à ação inibitória da atividade da PLA₂, enzima responsável pela liberação de AA e conseqüentemente da ativação da produção de PGs, TX e LTs. Os AIEs inibem a PLA₂ indiretamente através da indução da liberação de uma proteína inibitória da PLA₂ identificada como lipocortina 1 (também conhecida como anexina 1). Outro mecanismo de ação dos corticosteróides é através da ativação de receptores citoplasmáticos para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam uma cicloxigenase induzível (COX-2) e o óxido nítrico sintetase (BARNES e ADCOK, 1993).

5.3. OPIÓIDES

Após a descoberta e caracterização anatômica e bioquímica do sistema endógeno de modulação da dor, surgiram inúmeras investigações na tentativa de esclarecer a farmacologia deste importante sistema de modulação, visando principalmente o emprego de novos fármacos de maior seletividade e potencialidade analgésicas. Os opióides são os principais representantes deste grupo, com grande expansão até os dias atuais (BOVIL, 1993).

Embora de uso bastante antigo, somente a partir de 1973 ficou elucidado o mecanismo de ação destes fármacos, através de evidências bioquímicas da existência dos receptores opióides no sistema nervoso central. Até o momento, já foram descritos os seguintes receptores opióides: mu (μ), kappa (κ), sigma (σ), delta (δ) e epsilon (ϵ). Ademais, já foram descritos subtipos dos receptores μ e κ . Admite-se que o receptor μ_1 seja o mediador das ações analgésicas supraespinhais e da liberação de prolactina. O μ_2 é caracterizado pela depressão respiratória, liberação de hormônio do crescimento, queda da dopamina cerebral, trânsito no trato gastrointestinal, euforia e dependência física dos opióides, além de ser alvo primário da morfina que é um exemplo de agonista de receptores opióides que consiste no fármaco de escolha no tratamento da dor crônica, de moderada a grave, e é importante devido ser considerado como padrão e por pertencer a lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (RIPAMONTI e BANDIERI, 2009).. O receptor κ é responsável pela analgesia medular, miose, sedação e inibição da liberação do hormônio antidiurético. O receptor σ é responsável pela disforia, alucinações, estimulação respiratória e vasomotora e o receptor δ pela analgesia medular e queda da dopamina cerebral. Acredita-se, que os receptor δ , por sua localização nas regiões límbicas, estejam relacionado com as alterações do comportamento afetivo (CARVALHO e VIANA, 1994).

Sabe-se, atualmente que em nível molecular a ativação dos receptores μ e δ encontra-se associada à elevação na condutância ao potássio (abertura dos canais de K^+), hiperpolarizando a célula. O receptor μ está funcionalmente acoplado à adenilciclase, um sistema efetor da proteína G. Além disso, a ativação do receptor κ induz redução na condutância do cálcio. Este efeito é devido ao fechamento dos canais de cálcio tipo N, também associados à

proteína G. Acredita-se, que o receptor σ esteja associado aos canais iônicos ativados pelo glutamato e pode contribuir para a disforia produzida por alguns dos opióides (SIMON, 1991).

Os opióides agonista (morfina, fentanil, alfentanil e sufentanil) e agonista parciais (butofanol, nalbufina, pentazocina, dezocina, e buprenorfina) podem apresentar seus efeitos revertidos por antagonista puro, sendo o principal a naloxona. Este não produz nenhum efeito quando administrado a um paciente que não recebeu o tratamento com fármacos opióides, porém é capaz de reverter o efeito depressor respiratório promovido por elevadas doses ou intoxicação de fármacos como a morfina (GOZZANI, 1994).

Os opióides, também, possuem ação analgésica na dor inflamatória mediante mecanismos celulares e bioquímicos que desencadeiam a ativação de receptores μ , δ e κ . Esta ativação promove abertura de canais k^+ promovendo periféricamente hiperpolarização de fibras nociceptivas, com isso após a lesão tecidual que libera mediadores inflamatórios, entre os quais a PGE2 que possuem a capacidade de ativar segundos mensageiros como a adenilciclase via proteína G estimulatória, fármacos opióides impedem a sensibilização e/ou ativação de nociceptores (GOZZANI, 1994).

6. JUSTIFICATIVA

Os OEs de plantas aromáticas da região amazônica constituem-se em matérias primas utilizadas na indústria brasileira de perfumes, fragrâncias e cosméticos, produtos fitoterapêuticos ou como inseticida, fungicida e bactericida. Por outro lado, muitas das espécies aromáticas que ocorrem nos ecossistemas amazônicos estão sob pressão ambiental, seja pela má exploração dos recursos florestais, seja pelos desmatamentos e queimadas exigidos no próprio desenvolvimento da região. A taxa de extinção das espécies aromáticas que ocorrem em áreas de pressão ambiental precisa ser conhecida. Portanto, é urgente resgatar e promover o conhecimento científico e tecnológico destas espécies. Entre as várias alternativas econômicas indicadas pela Base de Dados das Plantas Aromáticas da Amazônia, as espécies/espécimes promissores são da família Piperaceae, a qual pertence a espécie *Peperomia serpens* Sw. (Loud), conhecida popularmente como carrapatinho. Uma vez que esta é utilizada em tratamentos contra a dor e processos inflamatórios, decidiu-se realizar a investigação farmacológica e química, através de modelos de toxicidade, nocicepção e inflamação em camundongos e ratos, bem como em técnicas analíticas fitoquímicas.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo geral

- Analisar a composição química, estimar a toxicidade aguda e avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *Peperomia serpens*

7.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição do OEPs
- Determinar a toxicidade aguda com base na dose letal para 50% dos animais
- Determinar a dose efetiva mediana (DE₅₀)
- Avaliar a atividade antinociceptiva utilizando os testes de contorção abdominal, placa quente e formalina
- Avaliar a atividade antiinflamatória através dos testes de dermatite, edema de pata e peritonite.

8. MATERIAIS E METÓDOS

8.1. Materiais utilizados

.8.1.1. EQUIPAMENTOS

- Ampolas
- Balança analítica CHYO, modelo JL-200
- Balança semi-analítica GEHAKA, modelo BG-8000
- Banho criostático de circulação HAAKE
- Beckers
- Cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas (modelo DSQII)
- Cromatógrafo a gás acoplado à detector de ionização de chama (modelo CG Focus)
- Centrífuga FANEM, modelo 206
- Condensadores
- Coletor de vidro tipo Dean & Stark
- Clevenger
- Estufa de Ventilação
- Funis de vidro (d=22cm)
- Laminas e lamínulas
- Microscópio óptico de alta resolução (Nikon Tec DNS 550 HS)
- Pipetas automáticas GILSON, EPPENDORF e DIGIPET (volumes de 10-100 μ L, 20-200 μ L , 100-1000 μ L)
- Picnômetro (v =1ml)
- Pletismômetro (modelo 7140 Ugo Basile[®])
- Placa quente/fria (modelo 35100 Ugo Basile[®])
- Tubos de ensaio

8.1.2. REAGENTES E SUBSTÂNCIAS

- Ácido Acético P.A (Glacial)- Vetec Química Fina[®]
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA-Merck)[®]
- Acetona P.A- Vetec Química Fina[®]
- Carragenina lambda tipo IV-Sigma[®]
- Corantes: hematoxilina – eosina (Reagen[®])
- Cloridrato de Naloxona-Narcan[®]
- Cloridrato de Morfina- Dimorf[®]
- Cetamina-Bayer[®]
- Dexametasona-Schering-plough[®]
- Dextrana -Sigma[®]
- Formaldeído P.A-Vetec Química Fina[®]
- Indometacina- Sigma[®]
- Óleo de cróton-Sigma[®]
- Polioxietilensorbitanmonoleato (Tween 80)-Merck-schuchart[®]
- Pizotifeno-Novartis[®]
- Solução de Turk (violeta de genciana e ácido acético- Isofar[®])
- Soro fisiológico 0,9%
- Tribromoetanol-Sigma[®]
- Xilazina-Bayer[®]

8.2. Material botânico

A amostra de *Peperomia serpens* foi coletada (1,6 Kg) no Município de Santa Izabel-PA na comunidade de Flechal, durante o período de 11 a 14 de Julho do ano de 2009. A espécie foi identificada por comparação com a exsicata de MG^o157255 e posteriormente armazenada no Herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi.

8.3. Processamento do material botânico e obtenção do óleo essencial

A planta inteira foi seca por ventilação em estufa a temperatura ambiente, durante o período de 4 dias. O óleo essencial de *Peperomia serpens* (OEPs) foi obtido através de destilação por arraste à vapor em processo contínuo por um período de 3 h, usando-se sistemas de vidro do tipo Clevenger, acoplado a sistema de refrigeração, com temperatura de água de condensação em torno de 15°C. O equipamento (caldeira, conectores e cilindro contendo o material vegetal), todo em aço inoxidável, operou em uma temperatura de 90-120°C. O procedimento consistiu em carregar cerca de 987g de material vegetal, no cilindro conectado inferiormente por uma caldeira contendo água e superiormente no sistema de destilação. Seguindo-se da admissão gradual de vapor, até alcançar a pressão de trabalho, o condensado foi recolhido em um separador de óleo, separando-se a fase aquosa da fase orgânica. Após separação óleo foi centrifugado por 10 min e seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, armazenados em ampolas de vidro âmbar, na ausência de oxigênio e, conservados em ambiente refrigerado a 5-10°C

8.4. Caracterização do OEPs

8.4.1. DENSIDADE, CÁLCULO DO RENDIMENTO E TEOR DE UMIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO

A densidade foi determinada, através de picnômetro (volume 1mL) devidamente seco, relacionando-se a massa de óleo essencial e o volume de água. O cálculo do rendimento bruto em óleo foi realizado através da relação do volume de óleo obtido, com a massa do material vegetal utilizado na destilação por arraste à vapor. O teor de umidade foi determinado através de destilação azeotrópica com tolueno (solvente de arraste), utilizando o coletor de vidro do tipo Dean & Stark, calculando-se assim, a quantidade de água após a separação de fases por decantação.

8.5. Análise da Composição Química do OEPs

A análise da composição química foi obtida através de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) em sistema Thermo, modelo DSQII, equipado com coluna capilar de sílica DB-5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm de espessura de filme) nas seguintes condições operacionais tais como programação de temperatura (60°C-240°C), com gradiente de 3°C/min; temperatura do injetor: 240°C; gás de arraste hélio, em velocidade linear de 32cm/s (medido a 100°C); tipo de injeção splitless (0,1µL de uma solução na proporção de 2µL de óleo para 1mL de n-Hexano); espectrômetro de massas de impacto eletrônico, energia do elétron a 70 eV; temperatura da fonte de íons à 200°C.

Os componentes químicos foram identificados através das comparações dos seus EM e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão, existentes na biblioteca e, com dados da literatura (ADAMS, 2007).

A análise quantitativa de óleo essencial foi feita por cromatografia de gás/ionização de chama (CG/IC) usando-se um CG Focus com coluna capilar de sílica DB5-MS (30m x 0,25mm; 0,25µm de espessura de filme), nitrogênio como gás de arraste e temperatura programada de 60-240°C com gradiente de 3°C/min.

8.6. Experimentos.

8.6.1. ANIMAIS

Foram utilizados 246 camundongos machos (*Mus musculus*) adultos pesando de 25 a 35g e 49 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar pesando entre 180 e 300 g. Sendo que para a avaliação nociceptiva cada grupo foi constituído de 10 camundongos, e nos modelos antiinflamatórios os grupos foram constituídos de 5 a 11 animais. Os animais, provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém), Biotérios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – São Paulo (FMRP-USP) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – São Paulo (FCFRP-USP), Foram

devidamente 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. Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum por um período de 12h. O manuseio e uso dos animais estão de acordo com as normas institucionais do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFGPA: parecer FAR001-10) e pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL).

8.7. Avaliação de toxicidade oral aguda (estimativa de DL₅₀.)

Para se estimar a DL₅₀, foram realizados testes similares as diretrizes de guias de substâncias químicas da Organização Econômica para Co-operação e Desenvolvimento (OECD) número 425, pois foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss albinos machos divididos em grupos de 10 animais, pesando entre 20 e 25 g. Os animais receberam, através de cânula orogástrica, doses crescentes de OEPs 2000 e 5000 mg/kg e soro fisiológico 0,9% (n = 10/grupo). Posteriormente os animais foram observados por um período de 4h para avaliação de possíveis alterações comportamentais, tais como: 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 (MALONE e ROBICHAUD, 1962). Após este período, os animais foram tratados com ração e água *ad libitum* e observados diariamente durante 14 dias. Em casos de óbito, o número de animais mortos será representado por dados estatísticos que expressarão a percentagem do número de animais mortos para cada dose administrada.

8.8. Determinação da dose efetiva mediana (DE₅₀).

A determinação da DE₅₀ terá como base o teste das contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos com intuito de fundamentar-se no principio

do 3Rs (substituição, redução e refinamento) para diminuição do uso e amenizar o sofrimento dos animais de experimentação (Russel e Burch, 1959). A DE_{50} foi determinada através da interpolação semi-logaritmica da plotagem direta das doses utilizadas e as respectivas percentagens de inibição, mediante o teste de regressão linear com o objetivo de se determinar a dose eficaz média, a equação da reta (representada pela fórmula: $y = a + b.x$) e coeficiente de correlação (r^2). Para determinamos a DE_{50} utilizamos o programa estatístico Prisma versão 5.0[®].

8.9. Estudo da atividade antinociceptiva

8.9.1. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO 0,6%.

As contorções induzidas por injeção i.p de ácido acético (0,6%) foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos previamente por Koster et al (1959). Os camundongos foram randomicamente divididos em 7 grupos ($n = 10$). Uma solução aquosa de ácido acético (0,6% v/v) foi injetada por via i.p (0,1 mL/10g de peso dos animais) em camundongos pré-tratados 60 min antes por v.o com o veículo (salina 0,9% e Tween 80 a 1%; 0,1 mL/10g; grupo controle), o controle positivo indometacina (10 mg/kg) ou OEPs (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 mg/kg). Após a indução do estímulo nociceptivo, os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro com diâmetro de 22 cm. O número total de contorções abdominais, que consiste na contração e rotação do abdômen seguido de extensão de uma ou ambas as patas traseiras, foram quantificadas cumulativamente após 10 min de estímulo durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada como a diferença no número de contorções entre o grupo controle e cada grupo tratado, e foi expresso como porcentagem de inibição das contorções. As doses utilizadas no teste de contorções abdominais partiram da dose de 5000 mg/kg (toxicidade aguda) e submúltiplos desta mediante a 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. A DE_{50} determinada foi de 188,8 mg/kg.

8.9.2. TESTE DA PLACA QUENTE (MACDONALD et al. 1946).

Os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida em temperaturas fixas diferentes ($50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) com o intuito de se avaliar a influência de uma possível ação central de fraca a forte do OEPs (Ankier, 1974). Um dia antes do teste realizou-se o pré-selecionamento dos animais submetendo-os à placa quente e descartando aqueles que apresentaram o tempo de reação na placa superior a 20s. O tempo de corte de latência na placa adotado foi de 40s. O tempo em segundos para que o animal manifeste alguma reação é denominada latência. Esta reação é esterotípica e consiste em pular e lambe as patas posteriores, bem como sapatear sobre a placa. Os experimentos foram realizados durante 2 h, em intervalos de 30 min (0, 30, 60, 90 e 120 min). Os animais foram pré-tratados por v.o com o veículo (salina 0.9% e Tween 80 a 1%; grupo controle), OEPs (188,8 mg/kg) e o controle positivo usado foi a morfina (10 mg/kg, s.c.). Os animais foram submetidos imediatamente ao estímulo térmico após os pré-tratamentos com as substâncias. Todos os grupos pré-tratados obedecem à relação de volume final de 0,1 mL/10g e foram constituídos de 10 animais.

8.9.3. TESTE DA FORMALINA A 1%

A nocicepção induzida por formalina em camundongos foi realizada de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Os animais foram randomicamente divididos em 6 grupos ($n = 10$ por grupo). Um volume de 20 μL de formalina (formaldeído 1% solubilizado em salina a 0,9%) foi aplicado no coxim plantar posterior direito dos camundongos pré-tratados 60 min antes com o veículo (salina 0,9% e Tween 80 a 1%; grupo controle) ou OEPs (188,8 mg/kg; v.o), ou pré-tratados 30 min antes com morfina (4 mg/kg, subcutaneamente). Após a injeção de formalina, os camundongos foram individualmente colocados sobre funis de vidro (diâmetro de 22 cm) e foram observados de 0-5 min (fase neurogênica) e 15-30 min (fase inflamatória). O tempo gasto lambendo a pata injetada foi cronometrado em ambas as fases e considerado como indicativo de nocicepção. Para se avaliar o possível envolvimento de sistema opióide no efeito nociceptivo de OEPs, três grupos de camundongos foram pré-tratados

com o antagonista de receptor opióide naloxona (0,4 mg/kg, s.c) 15 min antes de receberem OEPs (188, 8 mg/kg; v.o), morfina (4 mg/kg, s.c) ou veículo. Os pré-tratamentos obedecem à relação de volume final de 0,1 mL /10g de peso dos animais.

8.10. Estudos antiinflamatórios

8.10.1. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR Cg EM RATOS

O edema de pata foi induzido de acordo com Winter et al. (1962). Ratos foram randomicamente divididos em 3 grupos (n = 8 – 11 por grupo). Estes foram pré-tratados oralmente com OEPs (188,8 mg/kg; N=10), veículo (salina 0,9% e Tween 80 a 1%; grupo controle; N=11), indometacina (5 mg/kg; N=8). Após sessenta minutos, o edema foi induzido com a injeção de 0,1 mL de carragenina (Cg; 100 µg/pata) solubilizado em salina na pata direita do animal. A pata esquerda, usada como controle, recebeu o veículo salina (0,1 mL). A inflamação foi quantificada mensurando-se o volume (mL) deslocado pela pata de cada animal através de um plestimômetro digital (modelo 7140 Ugo Basile®) nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a injeção de Cg. Os resultados foram expressos como a variação em volume (mL) entre as patas direita e esquerda em cada tempo. Todos os grupos foram pré-tratados na relação de volume final de 0,1 mL/100 g de peso do animal.

8.10.2. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANA EM RATOS

O edema de pata foi induzido de acordo com Carvalho et al. (1962). Ratos foram randomicamente divididos em 3 grupos (n = 5 por grupo). Estes foram pré-tratados oralmente com OEPs (188,8 mg/kg), veículo (salina 0,9% e Tween 80 a 1%; grupo controle) e Pizotifeno (0,5 mg/kg). Após sessenta minutos, o edema foi induzido com a injeção de 0,1 mL de dextrana (100 µg/pata) solubilizado em salina na pata direita do animal. A pata esquerda, usada como controle, recebeu o veículo salina (0,1 mL). A resposta inflamatória foi quantificada mensurando-se o volume (mL) deslocado pela pata de cada

animal através de um plestímometro digital (modelo 7140 Ugo Basile®) nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de dextrana. Os resultados foram expressos como a variação em volume (mL) entre as patas direita e esquerda em cada tempo. Todos os grupos foram pré-tratados na relação de volume final de 0,1 mL/100 g de peso do animal

8.10.1. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON EM CAMUNDONGOS.

O edema de orelha foi induzido de acordo com os procedimentos descrito previamente por Tubaro et al (1985). 3 grupos de 10 camundongos foram utilizados. Estes animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (3:1, i.p) e posteriormente a inflamação cutânea foi induzida por aplicação de 20 µL de uma solução de acetona contendo o agente irritante (2,5% de óleo de cróton) na superfície da orelha direita de cada camundongo (superfície aproximada de 1 cm²). A orelha esquerda, usada como controle, recebeu o veículo acetona (20 µL). 60 min antes da aplicação do agente irritante, os animais foram pré-tratados com o veículo (salina 0,9% e 1% de Tween 80; grupo controle; v.o), OEPs (188,8 mg/kg; v.o) ou o AIEs dexametasona (10 mg/kg; v.o). Após 6 h, os animais foram sacrificados e retirados discos (diâmetro = 6 mm) de ambas as orelhas contendo o agente irritante e acetona. O edema foi mensurado como a diferença entre os pesos dos discos da orelha direita e esquerda. Todos os grupos de animais foram tratados na relação de volume final de 0,1 mL/10g. A atividade antiinflamatória foi expressa como a porcentagem da redução do edema no pré-tratamento dos camundongos com o OEPs ou dexametasona comparado ao grupo controle.

8.10.4. MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADE PERITONEAL EM CAMUNDONGOS.

A determinação de migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal foi realizada de acordo com Souza e Ferreira (1985). Camundongos (n = 5 por grupo) foram pré-tratados com o OEPs (188,8 mg/kg; v.o) ou veículo (0,1 mL/10g; p.o) 60 min antes da injeção de Cg (500 µg/cavidade, i.p, 0.5 mL)

ou salina esteril (0,5 mL) na cavidade peritoneal. Dexametasona (10 mg/kg, v.o) foi utilizado como controle positivo. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 3 h da injeção i.p de Cg. Posteriormente, injetou-se i.p um volume de 3 mL de tampão salina – fosfato, contendo ácido tetracético etilenodiamina na concentração de 1mM. Em seguida na cavidade peritoneal, retirou-se o lavado peritoneal realizando-se a contagem total de leucócitos e a diferencial de neutrófilos. 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 e os resultados obtidos expressos em número de leucócitos/mL. Parte do lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi resuspendido, para a realização do esfregaço celular em lâminas. As células foram coradas pelo corante Hematoxilina-Eosina e contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em neutrófilos. O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células e os resultados foram expressos em número de neutrófilos/mL.

8.10.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA EM TEMPO REAL *IN SITU* PARA OS EVENTOS DE ROLAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS NA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA DE CAMUNDONGOS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Fortes et al.(1991). Para análise microscópica realizou-se a indução de migração celular mediante a administração i.p de Cg na relação de 500 µg/cavidade diluída em salina estéril. Após 3 h, os camundongos foram anestesiados por via i.p com tribromoetanol 2,5% (250mg/kg) e através da incisão lateral na parede abdominal, exteriorizou-se o mesentério para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37°C) dotada de uma área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução fisiológica 0,9%. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular ao qual estão acoplados um fototubo, com um sistema de lentes ampliadoras superpostas, uma câmera de televisão e um monitor de vídeo que permite a

projeção e gravação de imagens. As imagens foram visualizadas com lentes objetivas a longa distância (x 40) e abertura numérica de 0,65. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas de terceira ordem definidas de acordo com a ordem de localização de ramos finais da rede microvascular. Estes vasos correspondem a vênulas pós-capilares, com diâmetro variando entre 10-18 μ m. O rolamento de leucócitos foi definido como, os glóbulos brancos que se moviam a uma velocidade menor quando comparado aos eritrócitos no mesmo vaso e foram determinados em intervalos de 5 min, após as 3 h da administração i.p de Cg. O rolamento foi expresso como rolamento leucocitário por min. Para a aderência leucocitária foram considerados os glóbulos brancos que permaneciam estáticos no endotélio venular e foram determinados no fim do período de observação de 5 min, após as 3 h da administração i.p de Cg. A área venular no processo de adesão foi determinada mediante a uma variação de área entre 350 a 450 μ m², e os resultados foram expressos como, o número de leucócitos aderidos por 100 μ m² de vênula. Esta área foi definida na tela do monitor: 10 μ m no tecido correspondem a 3,4cm na tela. 3 grupos de camundongos foram usados, um tratado oralmente com OEPs (188,8 mg/kg; v.o), outro com o veículo 0,1 mL/10g (grupo controle), 60 min antes da injeção de Cg (500 μ g/cavidade, i.p; 0.5 mL). Um terceiro grupo de camundongos foi tratado somente com salina estéril (0,5 mL) na cavidade peritoneal.

8.11. Análise Estatística.

Os resultados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média), onde n representa o número de animais. Os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes. Para análise de variância foram utilizados ANOVA um critério e dois critérios, seguido de um método de múltiplas comparações (Teste Bonferroni) e também teste t não-pareado quando necessário. A análise estatística e a formação dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prisma[®] versão 5.0 (software, San Diego, CA, USA).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Caracterização do OEPs

O OEPs apresentou coloração branca com aspecto leitoso, apresentando uma densidade de 0,8g/ml, rendimento de 0,4% [partindo-se de 987g de material vegetal para 4mL (3,8g) de óleo obtido] e o teor de umidade azeotrópico foi menor que 5%

9.2. Análise da composição química do OEPs

Foram identificados 25 constituintes no OEPs (Tabela 1) totalizando 89,51%. Cada componente químico foi identificado por comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção com aqueles da literatura (ADAMS,2007; WILLEY, NIST, 2005).

Tabela 1: Constituintes voláteis (%) do óleo de *Peperomia serpens*

Constituintes	Índice de retenção (IR)	% Óleo
α -copaeno	1374	0,24
trans-cariofileno	1417	4,00
β -gurjuneno	1431	0,11
α -humuleno	1452	11,48
Trans-cadina-1,4-dieno	1475	0,04
γ -muuroleno	1478	0,03
α -amorfenos	1483	0,20
β -selineno	1489	0,21
Δ -zengibereno	1493	0,06

Viridifloreno	1496	0,90
α -muuruleno	1500	0,38
β -bisaboleno	1505	0,60
γ - bisaboleno	1514	0,26
δ -amorfenno	1511	0,95
trans-calameneno	1521	0,23
E-nerolidol	1561	37,97
Oxido de cariofileno	1582	0,17
Ledol	1602	27,13
epóxido de humuleno II	1608	0,06
Dilapiol	1620	0,24
1-epi-cubenol	1627	0,12
Eremoligenol	1629	0,45
α -muurolol	1644	0,70
α -eudesmol	1652	2,7
2Z,6Z-farnesol	1698	0,28
Identificação total		89,51

O OEPs apresentou como principais constituintes E-nerolidol (37.97%), ledol (27.13%), α -humuleno (11.48%), trans-cariofileno (4%) e α -eudesmol (2.7%). Observou-se a predominância de sesquiterpenos no OEPs. Segundo

Verpoorte e Maraschin (2001) os terpenos representam a maior classe química de constituintes ativos de plantas, havendo mais de 30.000 substâncias descritas. A classificação básica dos vários terpenos decorre do número de unidades isoprênica (u.i.): monoterpenos (C10, duas u.i.), sesquiterpenos (C15, três u.i.), diterpenos (C20, quatro u.i.), triterpenos (C30, seis u.i.) (DE GENHARDT, KOLLNER e GERSHENZON, 2009).

A produção e variabilidade de metabólitos especiais em plantas podem ser demonstradas sob diferentes condições de luz, temperatura, níveis de nutrição e água. Os monoterpenóides e sesquiterpenóides produzidos por diversos grupos vegetais são metabólitos freqüentemente sujeitos a esses fatores abióticos. A baixa intensidade de luz geralmente diminui a produção de monoterpenos. Pequenas variações diárias de temperaturas estimulam a produção de terpenóides, enquanto que valores extremos causam sua redução. Os índices de precipitação não seguem um padrão, variando entre as espécies estudadas. O aumento do teor de nitrogênio e fósforo no solo favorece um maior rendimento no conteúdo de óleo essencial (LIMA, KAPLAN e CRUZ, 2003).

Partindo deste pressuposto, segundo Da Silva e colaboradores (2006), foi observado que, na mesma espécie as concentrações de componentes majoritários alguns sofrem alterações mediante a utilização de técnicas de obtenção como na hidrodestilação e micro-extração em fase sólida de folhas frescas e submetidas à secagem. Segundo esses autores, na hidrodestilação das folhas frescas os principais foram (Z)-acetato de nerolidol (42.9%) e (E)-nerolidol (31.3%), α -humuleno (5.6%), α -eudesmol (2.4%) e trans-cariofileno (1.9%). Já nas folhas secas submetidas à hidrodestilação, a ocorrência foi de (Z)-acetato de nerolidol (36.6%) e (E)-nerolidol (29.1%), α -humuleno (8.7%), α -eudesmol (2.2%) e trans-cariofileno (3.1%). Em micro-extração em fase sólida, os principais constituintes foram α -humuleno (49.1%) e trans-cariofileno (35.1%). Portanto, comparando-se aos resultados obtidos por esses pesquisadores com os nossos, observou-se que o teor de (E)-nerolidol, α -humuleno e trans-cariofileno se elevou em decorrência do uso de arraste á vapor. Já o teor elevado dos majoritários obtidos por micro-extração em fase sólida, é devido a um processo de pré-concentração (DÓREA, GAUJAC e NAVICKIENE, 2008). Estas comparações de resultados indicam que os

constituintes químicos presentes na composição do OEPs podem sofrer elevações nas concentrações de acordo com a técnica utilizada, bem como a partir da elevação da temperatura. Além disso, alguns constituintes diferiram deste trabalho em relação ao estudo mencionado, no caso, a presença de (Z)-acetato de nerolidol, δ -cadineno, germacreno A, biciclogermacreno, trans- α -bergamoteno, β -felandreno, α e β -pineno.

Os compostos majoritários presentes neste trabalho, alguns já apresentam atividades biológicas comprovadas, como o (E)-nerolidol que apresentou atividade antifúngica em modelos de animais infectados com *Microsporum gypseum* (LEE et al. 2007). Além disso, estudos realizados por Martins e Veiga (2002), comprovaram a capacidade do (E)-nerolidol, por ser um composto terpênico (lipofílico), em promover o efeito de permeação para liberação transdérmica de fármacos. Este composto apresenta atividades leishmanicida (ARRUDA et al. 2005) e antimalarial (GOULART et al. 2004).

O ledol, já foi identificado e isolado em outras plantas como *Cephalozia recurvifolia* (WU, HUANG e CHEN, 1996), e também já foi encontrado na família Piperaceae, na espécie *Piper clusii*. (KOUL, TANEJA e MALHOTRA, 1993).

Apesar de não haver citações acerca das atividades antinociceptiva e antiinflamatória do E-nerolidol e ledol, faz-se necessário testar tais substâncias em modelos clássicos de nocicepção e inflamação, uma vez que estes constituintes foram os principais encontrados na composição do OEPs.

O isolamento bio-guiado a partir do óleo essencial de erva baleeira (*Cordia verbanaceae*) (PASSOS et al. 2007) levou à identificação de dois compostos ativos responsáveis por atividade antiinflamatória, o α -humuleno e trans-cariofileno. Os mecanismos de ação dos compostos foram determinados por métodos in vivo sendo caracterizado a inibição de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β , redução da expressão de COX-2, iNOS e PGE₂ (FERNANDES et al. 2007). Além disso, o óleo de *Cordia Verbanacea* é comercializado como produto antiinflamatório tópico denominado Acheflan[®] (QUEIROZ, FARO e MELO, 2009). E também, o trans-cariofileno segundo Bakir e colaboradores (2008), apresentou forte atividade antiinflamatória e nenhuma atividade analgésica.

O α -eudesmol, segundo Asakura e colaboradores (2000a), está associado à inflamação neurogênica, devido ter inibido de maneira dependente de concentração a despolarização mediada pela liberação de SP e CGRP dos nervos sensoriais no corno espinhal, e inibição da vasodilatação e extravasamento oriundo do processo neurogênico, indicando que este constituinte apresenta ação na inflamação neurogênica. Além disso, este constituinte apresentou capacidade de proteção de lesão cerebral, após isquemia focal em ratos (ASAKURA et al. 2000b).

Portanto, com os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se o envolvimento desses principais constituintes com as possíveis atividades antinociceptivas e antiinflamatórias do OEPs, uma vez que de acordo com referencial teórico, estes compostos apresentam atividades biológicas comprovadas. Estes fatos ressaltam a importância deste trabalho, pois de acordo com a composição química do OEPs pode-se viabilizar o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico, e alternativa terapêutica para o tratamento da dor e processos inflamatórios.

9.3. Toxicidade aguda oral e estimativa de DL₅₀

Os camundongos que receberam as doses de 2000 e 5000 mg/kg de OEPs v.o, não apresentaram óbitos, após os 14 dias de observação. Este resultado classifica a substância como pertencente aos agentes xenobióticos de baixa toxicidade (OECD, 2001). No teste hipocrático, houve alterações comportamentais como, sonolência, ptose palpebral e piloereção.

Segundo Almeida e Oliveira (2006) o teste para avaliar a toxicidade aguda compreende uma etapa que antecede os ensaios farmacológicos, sendo desenvolvido com o objetivo de obter dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância e seus efeitos adversos num organismo submetido a tratamento de curta duração. Além disso, a estimativa da DL₅₀ possibilita investigar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias, determinando a dose responsável pela morte de 50% dos animais em estudo (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949), permitindo a realização dos testes farmacológicos utilizando doses seguras. (GRACIOSO et al. 1998).

Em relação à toxicidade oral aguda do OEPs, dos constituintes principais que compõem o óleo, provavelmente o trans-cariofileno e α -humuleno foram testados em relação à toxicidade, por serem já comercializados compondo o óleo essencial de *Cordia verbenaceae*. O (E)-nerolidol foi avaliado em estudos realizados pela RIFM (Instituto de Pesquisa para Materiais de Fragrância) em 1973, que avaliou este constituinte mediante a administração v.o. da dose 5000mg/kg; os resultados mostraram baixa toxicidade e ausência de óbito. Além disso, a RIFM também avaliou a toxicidade dérmica em coelhos na mesma dose, onde os resultados encontrados foram de ausência de irritação e óbito, permitindo que esta substância isolada esteja presente nos cosméticos (perfumes, Xampu, sabonete) e não-cosméticos (produtos de limpeza e detergente). Kligman e Epstein (1975), realizaram testes de sensibilização dérmica em humanos, utilizando cerca de 4% de (E)-nerolidol (2760 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dissolvidos em petrolato; os resultados foram ausência de irritação cutânea. Porém, em coelhos através do método de Draize observou-se eritema e formação de edema (LAPCZYNSKI, BHATIA e LETIZIA, 2008).

De acordo com estes resultados, pode se observar que o OEPs apresenta boa margem de segurança, uma vez que não foi observada letalidade imediata ou durante os 14 dias. Já em relação às alterações comportamentais fazem-se necessários estudos detalhados, para elucidação dos parâmetros observados.

9.4. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%

Os resultados apresentados demonstram que o OEPs, nas doses de 62,5; 125; 250 e 500 mg/kg, reduziu de forma significativa e dependente de dose em 33,10; 50,52; 67,84 e 87,47% respectivamente, o número de contorções abdominais em camundongos (**Figura 6**). O fármaco padrão Indometacina (10 mg/kg), um fármaco antiinflamatório não-esteroidal promoveu redução do número de contorções aproximadamente em 73.28% quando comparado ao grupo controle.

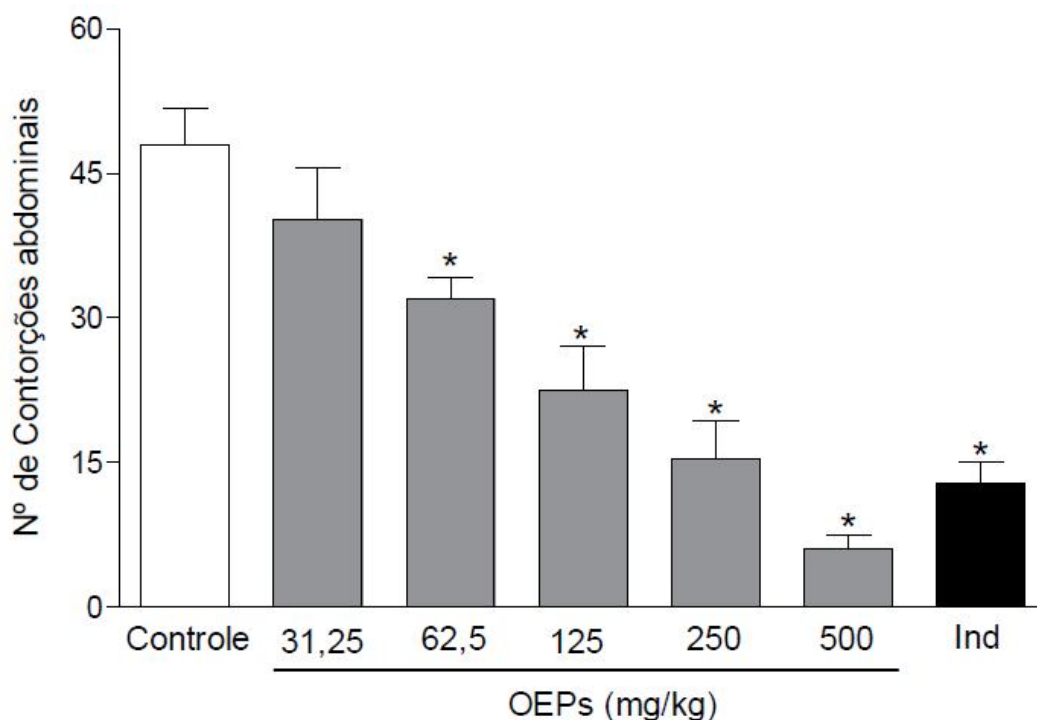


Fig.6: Efeito do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *Peperomia serpens* (OEPs; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 mg/kg, colunas cinzas) ou indometacina (Ind; 10 mg/kg, coluna preta) no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético em camundongos. Cada valor representa média \pm EPM (n = 10 por grupo). * $P < 0.05$, ANOVA seguido por teste de Bonferroni quando comparado ao grupo controle (pré-tratamento oral com salina 0,9% e Tween 80 a 1%, coluna branca).

Neste teste observou-se que o OEPs em doses crescentes foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais, assim como a indometacina na dose de 10mg/kg v.o sugerindo um mecanismo resultante de um efeito periférico, uma vez que este método consiste na avaliação antinociceptiva periférica de inúmeros fármacos analgésicos como os AINEs que são sensíveis neste modelo experimental como aspirina e diclofenaco (VANE, 1972). Além disso, neste modelo estão envolvidos vários mediadores inflamatórios como Bk (CORRÊA et al.1996), SP (GOETTL e LARSON, 1998), PGs (MONCADA et al. 1975) e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-8 produzidos por macrófagos e mastócitos no peritônio;estes mediadores de uma forma geral contribuem para o desenvolvimento da dor inflamatória característica deste modelo, indicando portanto que o OEPs possa apresentar ação sobre este tipo de dor.

Neste mesmo modelo já foram realizados estudos com outra espécie *Peperomia pellucida* na forma de extrato aquoso onde a dose de 400 mg/kg

(v.o) reduziu o número de contorções em 50,1% (ARRIGONI-BLANK et al. 2004); quando utilizado o extrato metanólico somente a dose 210 mg/kg (v.o) reduziu em 78,3% as contorções abdominais em camundongos (AZIBA et al. 2001) enquanto o OEPs a partir da dose de 62,5 mg/kg foi capaz de reduzir o número de contorções indicando que o tratamento com o OEPs apresenta melhor atividade que o extrato de outras espécies do mesmo gênero.

O teste de contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6% também, é um modelo experimental relativamente simples e com pouca especificidade (CALIXTO et al. 2000). Além disso, é de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias drogas analgésicas e AINEs, bem como a drogas semelhantes à morfina que atuam centralmente (PIETROVSKI, 2004), assim como anti-histamínicos e anticolinérgicos que atuam tanto em nível central quanto periférico (PERAZA et al. 2007). Portanto é necessária a utilização de modelos mais específicos e que ajudem a elucidar o mecanismo de ação da atividade antinociceptiva do OEPs.

9.5. Determinação de DE₅₀

Foi possível determinar a DE₅₀, através da plotagem direta das doses utilizadas e as respectivas percentagens de inibição do teste de contorções, cujo valor foi de 188,8 mg/kg, equação da reta $y = 24,075 + 0,139x$ e coeficiente de correlação $r^2 = 0,88$ (**Figura 7**).

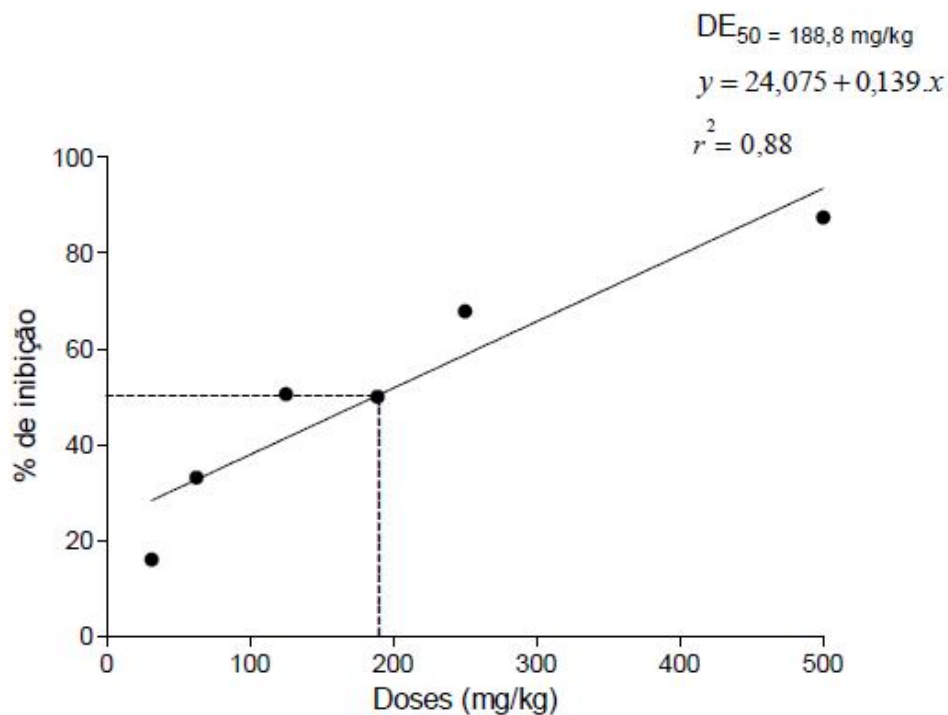


Fig.7: Determinação de DE₅₀ do OEPs, através de plotagem direta das doses no eixo das abscissas (31,25; 62,5; 125, 250 e 500 mg/kg) e percentagens de inibição no eixo das ordenadas

9.6. Teste da Placa Quente

O pré-tratamento oral com o OEPs na dose de 188,8 mg/kg não foi capaz de prolongar o tempo de latência significativamente quando comparado ao grupo controle (**Figura 8**). Entretanto a morfina (fármaco opióide) prolongou de maneira significativa a latência (tempo que os animais necessitam para manifestar uma reação estereotipada ao estímulo térmico) em todos os tempos (30, 60, 90 e 120min) na temperatura de 50°C e nos tempos 30, 60 e 90min na temperatura de 55°C (**Figura 8**).

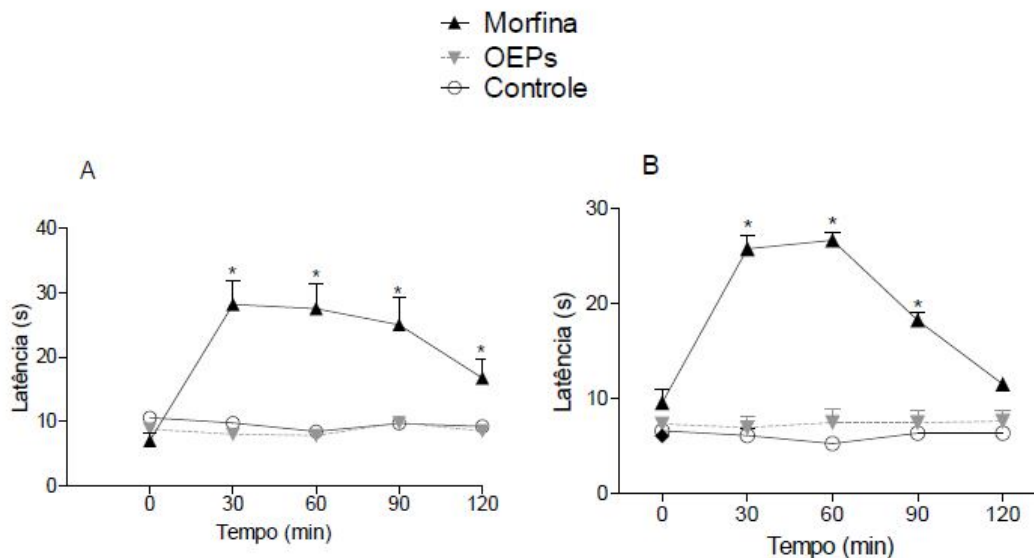


Fig.8: Efeito do óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou morfina (10 mg/kg, s.c) sobre o estímulo nociceptivo térmico. **A.** (50 ± 0,5°C) e **B.** (55 ± 0,5°C) induzido em camundongos. Cada valor representa a média ± EPM (n = 10 animais por grupo). * $P < 0,05$ por two-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente com salina 0,9% e 1% de Tween 80)

O teste de placa quente consiste em colocar ratos ou camundongos sobre uma placa previamente aquecida em temperatura constante e fixa (WOOLFE e MACDONALD, 1944) com o intuito de avaliar respostas analgésicas centrais, mediante parâmetros comportamentais dos animais como lambe as patas, saltar e sapatear sobre a placa, que são consideradas reações estereotipadas para o registro do tempo de latência para o teste (NISHIRARA et al.1995; RICHARDSON et al.1997 e 1998). Analgésicos narcóticos como a morfina (fármaco opióide), que atuam centralmente, são capazes de aumentar o tempo de resposta na placa quente (TURNER, 1965) e aparentemente este efeito está relacionado a mecanismos centrais com o envolvimento essencial de opióides endógenos (RAMABADRAN e BANSINATH, 1990). Esta resposta a nível central é considerada integrativa, pois a estimulação térmica associada à neurotransmissão central ativa nociceptores térmicos que permitem a propagação do estímulo do corno dorsal da medula espinhal até os centros corticais (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001). Portanto, com os resultados obtidos neste modelo sugere-se que o OEPs não possui atividade antinociceptiva de origem central e para melhor estudo da atividade antinociceptiva do OEPs faz-se necessário a realização de

outros modelos mais específicos como o teste da formalina que desencadeia uma dor dependente de estímulos centrais e periféricos para se confirmar a ação do óleo sobre mecanismos periféricos.

9.7. Teste de Formalina 1%

O OEPs na dose de 188,8 mg/kg v.o reduziu de maneira significativa o tempo de lambida na 1ª fase (48,13%) e 2ª fase (93,83%) quando comparado aos grupos controles (**Figura 9**). A morfina (4 mg/kg; s.c), agonista opióide, também reduziu em ambas as fases (66,11 e 88,88% de inibição, respectivamente) o tempo de lambida comparado aos grupos controles. A naloxona, devido as suas propriedades antagonistas, não apresentou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos controles prolongando o tempo de lambida. Além disso, este antagonista reverteu o efeito antinociceptivo da morfina na 1ª e 2ª fase do teste de formalina. Porém, na presença do OEPs não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do óleo.

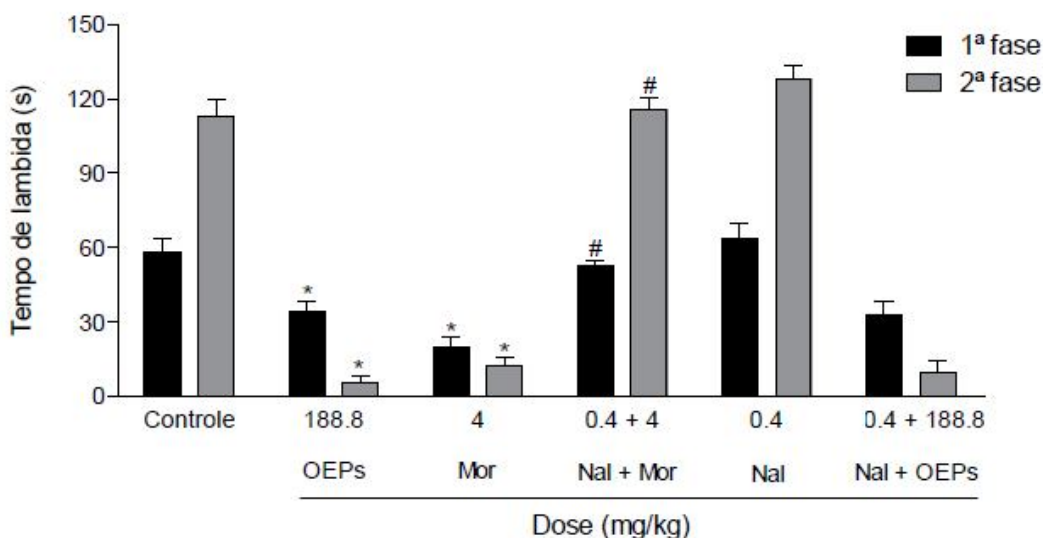


Fig.9: Influência do pré-tratamento de naloxona (Nal, s.c) na ação antinociceptiva de morfina (Mor, s.c) e do óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, v.o) na 1ª (dor neurogênica, 0-5 min) e 2ª fase (dor inflamatória, 15-30 min) na nocicepção induzida por formalina. Cada valor representa média ± EPM (n = 10 por grupo). *P < 0.05, ANOVA seguido por teste de Bonferroni quando comparado ao grupo controle (pré-tratamento oral com salina 0,9% e Tween 80 a 1%). #P < 0.05, teste t Student comparado ao grupo pré-tratado com morfina (s.c).

O teste da formalina consiste na injeção i.pl na pata de roedores com solução de formalina, a qual desencadeia intensa nocicepção por estimulação direta dos nociceptores. A nocicepção causada por esta injeção é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas (HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991 e SEGUIN et al. 1995). Este modelo de nocicepção química é mais específico quando comparado ao teste de contorções abdominais, pois este teste apresenta duas fases distintas: A 1ª fase (0-5 min) é caracterizada pela dor neurogênica causada pela estimulação química direta de nociceptores. A 2ª fase (15-30 min) é caracterizada pela dor inflamatória desencadeada por uma combinação de estímulos, incluindo inflamação de tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização central (TJOLSEN et al. 1992; HUNSKAAR e HOLE, 1987). A substância P está envolvida na 1ª fase, enquanto HIS, 5-HT, PGs e Bk estão envolvidos na 2ª fase (MURRAY et al.1988; TJOLSEN et al. 1992).

O teste de formalina é um método muito utilizado, não somente, para avaliar efeitos antinociceptivos de fármacos, mas também para elucidar o mecanismo de ação de inúmeras substâncias. Fármacos que atuam centralmente como nárcoticos inibem ambas as fases de maneira equivalente. Fármacos que atuam periféricamente como AINEs e corticóides inibem significativamente a 2ª fase (SHIBATA et al.1989). No presente estudo, o pré-tratamento oral de OEPs significativamente inibiu a 1ª (dor neurogênica) e 2ª fase (dor inflamatória) do teste formalina em camundongos, efeito que permaneceu significativamente inalterado pelo pré-tratamento com a naloxona. Estes resultados indicam que o OEPs induz ação antinociceptiva direta em fibras nociceptivas aferentes sem interação com o sistema opióide. Além disso, o OEPs foi efetivo na 2ª fase do teste de formalina indicando uma atividade antiinflamatória. Estes resultados em diferentes modelos nociceptivos sugerem que a ação antinociceptiva de OEPs esteja mais relacionada a mecanismos periféricos que centrais como confirmado no modelo da placa quente.

Em alguns estudos neste mesmo modelo relatou-se o envolvimento de outros sistemas que modulam as fases da origem da dor de várias maneiras diferentes como o serotoninérgico (FASMER et al. 1985) e o noradrenérgico (SUGIMOTO et al.1986). Além disso, substâncias como a capsaicina são capazes de atuarem na fase neurogênica, permitindo a formação de

neuropeptídeos como a SP e o CGRP que são os principais iniciadores da inflamação neurogênica (HOLZER,1988; RICHARDSON e VASCO, 2002). Possivelmente outras vias nociceptivas também deveriam ser estudadas para a elucidação do mecanismo de ação deste óleo, como receptores vanilóides TRPV1 ativados pela capsaicina (CATERINA et al. 1997), receptores glutamaérgicos (NMDA e AMPA) ativados por glutamato (BEIRITH, et al.1998) e receptores 5-HT (OLIVA et al.2002).Pelo fato do OEPs possivelmente estar atuando em mediadores envolvidos no processo inflamatório decidimos avaliar prováveis atividades antiinflamatórias em diferentes modelos de inflamação.

9.8. Edema de pata induzido por Cg em ratos

O OEPs na dose de 188,8 mg/kg foi capaz de impedir a formação do edema de pata a partir da 1ª hora até a 4ª hora, promovendo inibições de 44,18; 23,33; 32,85 e 30,35% , respectivamente. A indometacina na dose de 5 mg/kg foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em todos os tempos (1, 2, 3, 4 e 5 h) de maneira significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

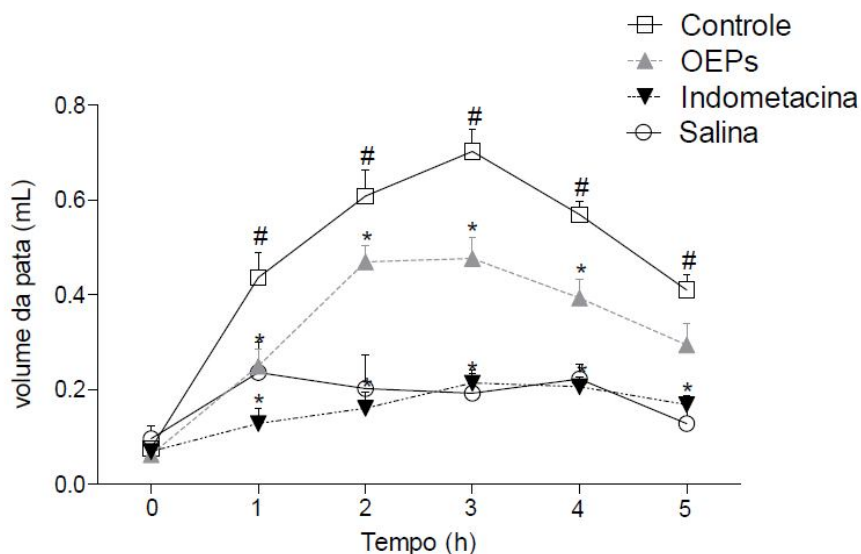


Fig.10: Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg) no edema de pata induzido por Cg em ratos. Cada valor representa média \pm EPM (n = 8-11 por grupo). * $P < 0.05$ por two-way ANOVA seguido por teste Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente por salina 0,9% e 1% de Tween 80) e # $P < 0.05$ por two-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo salina (recebeu somente salina na pata).

O modelo experimental utilizado para este teste apresenta como agente irritante a Cg, a qual é classicamente usado como agente indutor de inflamação e dor inflamatória (CHRISTOPHER, 2003). Este agente quando injetado na superfície plantar em pata de ratos ou camundongos causa uma inflamação aguda característica, permitindo a avaliação antiinflamatória de inúmeras substâncias (SAMMONS et al. 2000). Este tipo de inflamação aguda é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e infiltrado celular promovendo a formação do edema, como resultado do extravasamento de fluídos e proteínas e acúmulo de leucócitos no local da inflamação (POSADAS et al. 2004). Este modelo apresenta ainda certa complexidade pelo envolvimento de uma série de mediadores que podem sensibilizar nociceptores, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8) e mediadores finais da hiperalgesia (PGs e aminas simpatomiméticas) que são modulados por estas citocinas (CUNHA et al. 1991 e 1992).

O modelo de edema de pata induzido por Cg é largamente usado para selecionar AINEs e AIEs, uma vez que envolve vários mediadores inflamatórios na resposta aguda induzida por este agente flogístico. Este tipo de teste induz uma reação inflamatória caracterizada por duas diferentes fases. A fase inicial, que ocorre entre 0 e 2,5 h após injeção do agente inflamatório, induz a formação de edema por ação de mediadores como HIS, 5-HT e Bk promovendo o aumento de permeabilidade vascular. A fase tardia, que ocorre a partir da 3^a h, é também dependente do sistema complemento e a sustentação da formação de edema é atribuída pela presença de PGs nos tecidos no local da inflamação (DI ROSA, 1974).

O pré-tratamento oral com o OEPs inibiu a formação do edema em ambas as fases após a administração de Cg. Este resultado sugere que a resposta antiedematogênica de OEPs está relacionada com a interferência na produção de HIS, 5-HT, cininas (Bk) e metabólitos do AA (PGs). Além disso, Fernandes e colaboradores (2007) observaram que o trans-cariofileno (5-50mg/kg) e o α -humuleno (5-50mg/kg) presentes tanto na composição do óleo essencial de *Cordia verbanacea* como no OEPs foram capazes de reduzir o edema de pata induzido por Cg na 1^ah, 2^ah, 3^ah and 4^ah deste modelo. No trabalho de Passos e colaboradores (2007) verificou-se, ainda, ações destes constituintes na dose de 50 mg/kg (v.o.) sobre PGE₂, Bk, PAF e citocinas pró-

inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). Comparando-se estes resultados possivelmente o OEPs também possa apresentar ações sobre estes mediadores que estão envolvidas na dor inflamatória e na inflamação. Portanto, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação e os resultados encontrados neste teste, decidimos investigar uma possível atividade do óleo no modelo de edema de pata induzido por dextrana.

9.9. Edema de pata induzido por dextrana

O OEPs (v.o) na dose de 188,8 mg/kg foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema de pata em 60 e 90min, promovendo inibições de 26,56 e 25,75%, respectivamente. O Pizotifeno (v.o) 0,5 mg/kg (fármaco antagonista de receptores H₁ e 5-HT₂) foi capaz de abolir o aumento do volume de edema em todos os tempos (30, 60, 90 e 120min) de maneira significativa quando comparado ao grupo dextrana.

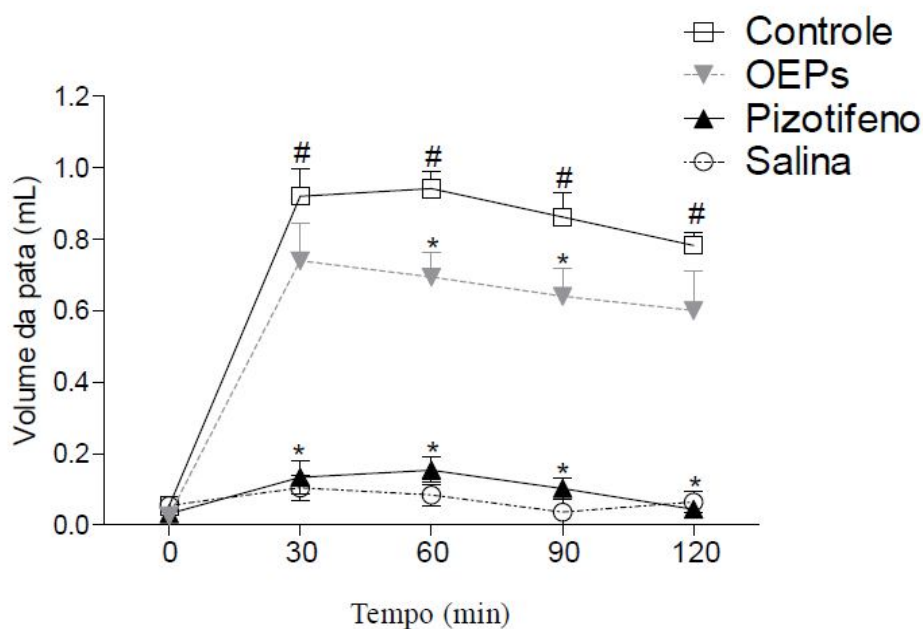


Fig.11: Efeitos do pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg) ou pizotifeno (0,5 mg/kg) no teste de edema de pata induzido por dextrana em ratos. Cada valor representa média \pm EPM (n = 5 por grupo). * $P < 0,05$ por two-way ANOVA seguido por teste Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente com salina 0,9% e 1% de Tween 80) e [#] $P < 0.05$ por two-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo salina (recebeu somente salina na pata)

O edema de pata induzido por dextrana também é um modelo experimental de inflamação que induz uma reação anafilactóide, caracterizada por uma resposta máxima em torno de 30 a 60 min após a injeção do estímulo. Este edema também envolve importantes mediadores inflamatórios mediante degranulação de mastócitos, incluindo principalmente HIS e 5-HT, além de Bk, LTs e PAF (ANKIER e NEAT, 1972; NISHIDA e TOMIZAWA, 1980; VAN WAUWE e GOOSENS, 1989). Neste teste, o OEPs (v.o.) na dose de 188,8 mg/kg que foi capaz de impedir a formação do edema de pata induzido por dextrana de maneira significativa em 60 e 90min, efeito que também foi promovido pelo controle positivo Pizotifeno - bloqueador de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos (SAPER et al. 1993) que foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema a partir de 30 min. Portanto, sugere-se que este óleo possa estar interferindo na ação edematogênica de mediadores como 5-HT e HIS. Este resultado corrobora, para explicar a atividade antiedematogênica observada por nós no modelo de edema de pata induzido por Cg. Outros resultados que reforçam esta hipótese foram observados em modelos alérgicos de edema de pata induzido por ovoalbumina, onde o trans-cariofileno e α -humuleno, ambos na dose 50 mg/kg (v.o.) foram capazes de reduzir a formação deste edema, e ainda no edema de pata induzido por HIS onde somente o α -humuleno (50 mg/kg v.o.) apresentou efeito significativo (FERNANDES et al. 2007). Estes resultados também confirmam o uso(s) popular em processos alérgicos e inflamatórios da espécie *P.serpens* (GRENAND, MORETTI e JACQUEMIN, 1987).

Como podemos observar nos dois modelos de edema, o óleo foi capaz de inibir esta resposta inflamatória por possíveis vias diferentes, uma vez que o edema induzido por dextrana promove uma degranulação parcial a partir de 30 min em mastócitos (liberando rapidamente mediadores como a HIS) e uma acumulação rápida de fluídos com pouca proteína e neutrófilos (THERESA et al. 1982). Além disso, a SP e CGRP são capazes de atuarem sobre mastócitos degranulando-os e liberando HIS e 5-HT mediante reflexo antidrômico. A Cg induz a liberação de HIS de maneira gradual para o início do edema, com uma progressiva acumulação de exsudato rico em proteínas e neutrófilos (THERESA et al. 1982). Portanto pelo fato do OEPs ser altamente lipossolúvel e supostamente atuar em vários mediadores envolvidos na inflamação e na

ação neurogênica como SP que modula a inflamação na resposta a lesão cutânea (ANSEL, ARMSTRONG e SONG, 1997), decidimos realizar o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

9.10. Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O OEPs (v.o) na dose de 188.8 mg/kg foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema induzido pelo óleo de croton de maneira significativa (76,63%) em relação ao grupo controle (**Figura 12**). A dexametasona (10 mg/kg), um antiinflamatório esteroidal, inibiu a formação de edema em 89,18%, quando comparado ao grupo controle, após 6 h de aplicação tópica de óleo de cróton.

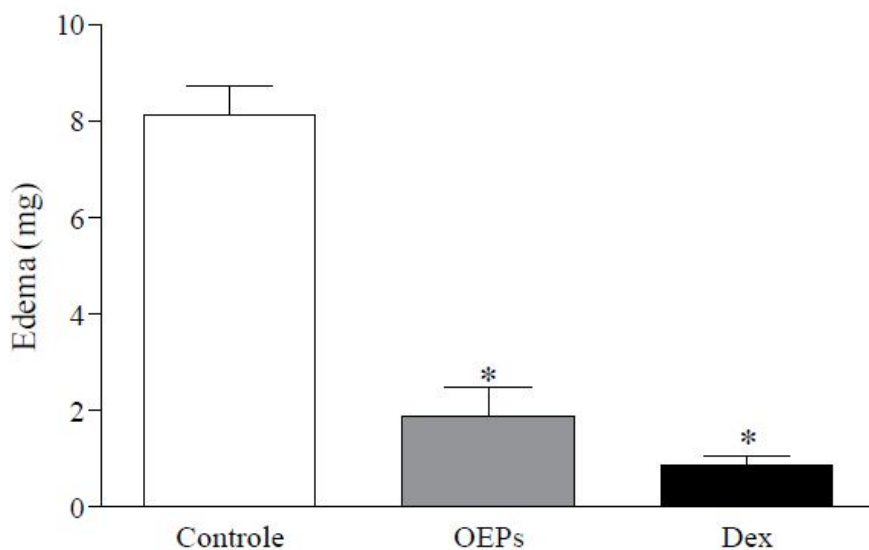


Fig.12: Efeitos de pré-tratamento oral com o óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg, coluna cinza) ou dexametasona (Dex, 10 mg/kg, coluna preta) no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Cada valor representa média \pm EPM (n= 10 por grupo). * $P < 0,05$ por one-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente com salina 0,9% e 1% de Tween 80, coluna branca).

A indução de uma inflamação aguda com o agente químico óleo de cróton em orelhas de camundongos tem sido utilizada como modelo para avaliação da ação antiedematogênica de vários compostos, entre eles AINEs e AIEs (TUBARO, 1985). O óleo de cróton é um irritante vascular que provoca

infiltração leucocitária de polimorfonucleares causando edema intercelular. A dermatite se caracteriza pela formação, na epiderme, de edema com pequenas vesículas ao lado de áreas de ulceração recobertas por exsudato fibrinoleucocitário. Na derme, além do edema, há infiltração inflamatória neutrofílica, congestão e dilatação de vasos e também de marginação leucocitária (SWINGLE, REITER e SCHWARTZMILLER, 1981).

A aplicação tópica deste agente irritante está associada à resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares, devido ao efeito biológico do principal composto encontrado neste óleo, que é o éster de forbol ativado conhecido como, TPA (4 β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008; GARBOR, 2003).

Os ésteres de forbol são diterpenóides tetracíclicos que mimetizam a ação do diacilglicerol como ativadores de proteína kinase C (PKC), uma enzima dependente de cálcio que induz a formação de AA através da ativação de PLA₂ (WEINSTEIN et al. 1979). Biologicamente, estes compostos bem como derivados são responsáveis por induzir migração celular, tumores, irritação cutânea e de maneira geral sinais e sintomas da inflamação. Além disso, é capaz de induzir a liberação de HIS, citocinas como IL-2 e proteases (GOEL et al. 2007). Fármacos inibidores de PLA₂, inibidores de COX e inibidores de LOXs bem como os corticóides são efetivos na supressão do edema de orelha após a aplicação tópica deste agente inflamatório (YOUNG e DE YOUNG, 1989).

De acordo com os resultados apresentados nos modelos de avaliação de edema, verificou-se que o OEPs foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema de orelha induzido por óleo de cróton e esta inibição foi semelhante ao controle positivo dexametasona. Esta atividade inibitória de OEPs pode estar relacionada com a habilidade de inibir cálcio intracelular que ativa PKC e conseqüentemente induz a liberação de mediadores inflamatórios (FURSTENBERGER et al.1981) . No entanto, faz-se necessário a realização de testes complementares para a confirmação desta hipótese. Além disso, a dexametasona é capaz de inibir a formação destes mediadores derivados de AA (PGs e LTs) por inibirem a PLA₂ (CALIGNANO, 1985), bem como atuar inibindo a formação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β pela inibição

de fatores de transcrição de proteínas inflamatórias mediada pelo fator nuclear kappa B (NF-κB) (UMEZAWA e CHACHARENPOONG, 2002). É possível que estes efeitos entre AIEs e OEPs ou seus constituintes possam apresentar similaridade no mecanismo de ação, esta hipótese é reforçada com base na proposta de mecanismo de Fernandes e colaboradores (2007) pelo fato que o trans-cariofileno e o α-humuleno possivelmente atuem inibindo o NF-κB, impedindo a transcrição de mediadores pro-inflamatórios como as citocinas IL-1β e TNF-α e inibindo a produção e/ou liberação de mediadores como Bk, PAF, HIS, PGE₂. Além disso, a SP é capaz de facilitar a liberação destes mediadores e atuar na resposta tecidual cutânea (ANSEL, ARMSTRONG e SONG, 1997). Como a resposta inflamatória aguda é caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular e infiltrado celular promovendo a formação de edema mencionado por Posadas e colaboradores (2004), decidimos investigar modelos agudos que envolvam a migração celular.

9.11. Migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.

Neste modelo de peritonite a Cg aumentou o número de leucócitos em $5,9 \times 10^6$ células/mL, este valor corresponde a 100% de migração de leucócitos (**Figura 12A; tabela 9**). Enquanto que o número de neutrófilos após 3 h aumentou em $4,12 \times 10^6$ células/mL (**Figura 12B e tabela 9**) o qual corresponde a 100%. Quando os animais foram tratados com o OEPs 188,8 mg/kg (v.o.), verificou-se uma redução significativa da contagem total de leucócitos e de neutrófilos em 57% e 59%, respectivamente quando comparado ao grupo controle. O fármaco padrão dexametasona na dose de 10 mg/kg (v.o.) também reduziu de maneira significativa o número de leucócitos totais e de neutrófilos em 56,77% e 64,07%, respectivamente.

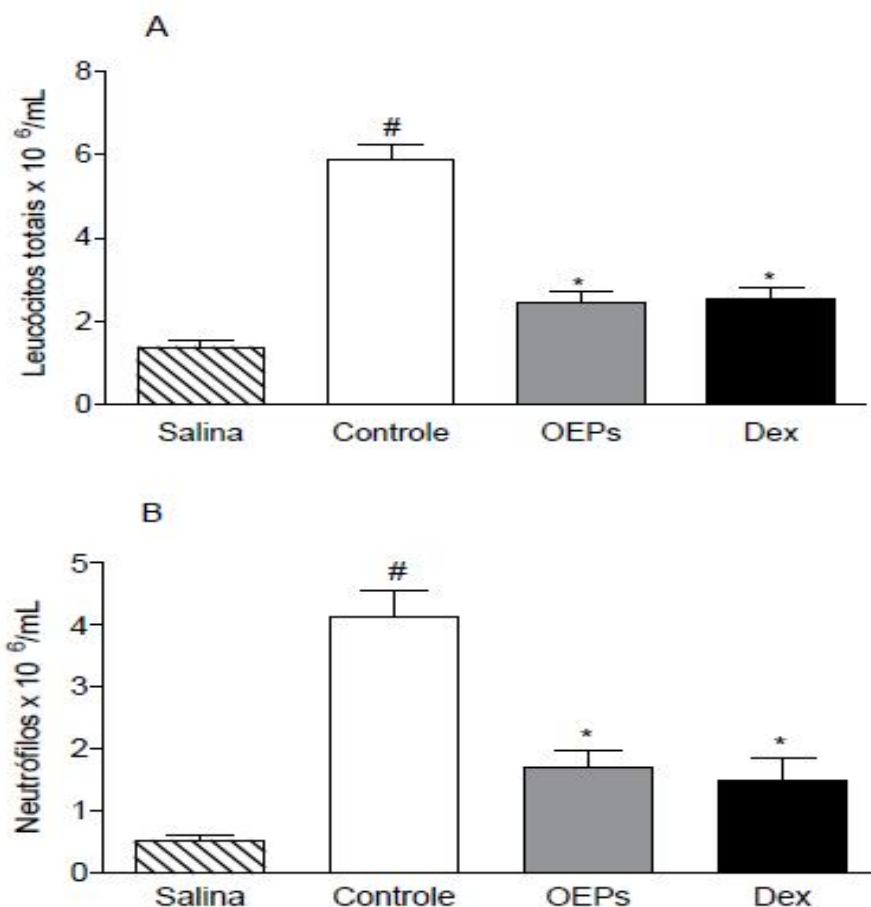


Fig. 13: Efeitos do pré-tratamento oral de óleo essencial de *P.serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg, coluna cinza) ou dexametasona (Dex, 10 mg/kg, coluna preta) na migração de leucócitos (A) e neutrófilos (B) para a cavidade peritoneal em camundongos. Cada valor representa média \pm EPM (n = 5 animais por grupo). * $P < 0,05$ por one-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente por salina 0,9% e 1% de Tween 80, coluna branca). # $P < 0,05$ por teste "t" de Student comparado ao grupo salina (recebeu somente salina na cavidade peritoneal sem injeção de Cg, coluna listrada).

9.12. Análise microscópica em tempo real *in situ* para os eventos de rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos

Na interação leucócito – endotélio (rolamento e adesão) o OEPs na dose de 188,8 mg/kg (v.o) foi capaz de reduzir o rolamento e adesão de leucócitos de maneira significativa quando comparado ao grupo controle em 44,73 e 72,17%, respectivamente. Enquanto, o grupo controle foi capaz de induzir as etapas de rolamento e adesão de leucócitos de maneira significativa quando comparado ao grupo salina.

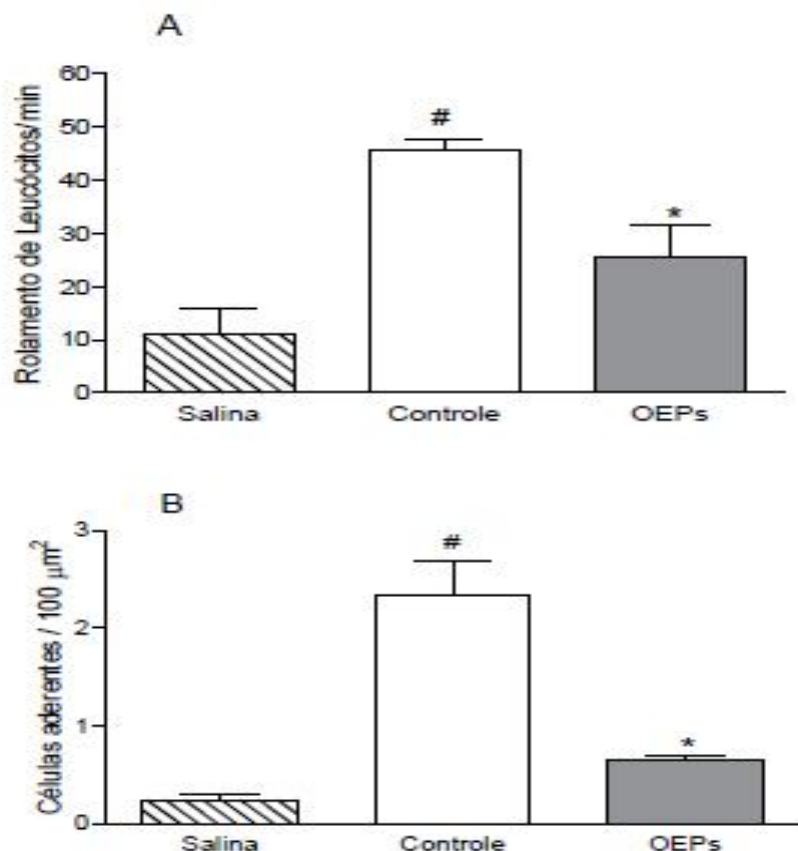


Fig. 14: Efeitos do pré-tratamento oral do óleo essencial de *P. serpens* (OEPs, 188,8 mg/kg, coluna cinza) no rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos. Cada valor representa média \pm EPM (n = 5 animais por grupo). * $P < 0,05$; # $P < 0,05$ por teste t Student comparando-se com grupo controle (pré-tratado oralmente com salina 0,9% e 1% de Tween 80, coluna branca) e com o grupo salina (recebeu somente salina na cavidade peritoneal sem injeção de Cg, coluna listrada), respectivamente.

A peritonite induzida por Cg é uma metodologia utilizada com o intuito de verificar a participação de células migratórias no exsudato presente na cavidade peritoneal, uma vez que a Cg induz exsudato rico em proteínas que contém grande número de leucócitos, principalmente neutrófilos (ZHANG et al. 2007). Nesta indução inflamatória de migração de leucócitos, nas vênulas mesentéricas do peritônio há vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular (HALL et al. 1998), bem como o envolvimento de uma série de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-8) (CUNHA et al. 2005), prostanóides (KASAMA et al. 2005), LTB₄ (efeito quimiotático em neutrófilos, macrófagos e mastócitos) e a liberação de

componente pertencente ao sistema complemento C5a (GUO e WARD, 2005). Além disso, estes mediadores induzem o recrutamento e a migração celular de leucócitos, principalmente neutrófilos que possui como característica múltiplas etapas sequenciais, incluso a interação leucócitos-endotélio: rolamento (atua as selectinas E, P e L), aderência (ICAM, VCAM e PECAM; interação com o complexo integrinas β_2), transmigração posterior para os vasos sanguíneos, quimiotaxia e fagocitose (MAYADAS e CULLERE, 2005).

De acordo com o resultado obtido na peritonite induzida por Cg na migração celular, verificou-se que o OEPs foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal após a injeção i.p de Cg e este efeito foi semelhante ao fármaco padrão dexametasona utilizado neste teste. Além disso, na microscopia intravital no leito mesentérico o OEPs foi capaz de reduzir o rolamento e a adesão de leucócitos sobre o endotélio de vênulas pós-capilares. Portanto, este resultado confirma que o OEPs é capaz de reduzir a migração celular de leucócitos e também de neutrófilos. Estes resultados sugerem que o OEPs possa esta atuando na inibição de moléculas de adesão que são expressas por citocinas pró-inflamatórias. Esta hipótese é reforçada pelo fato de α -humuleno e (E)-cariofileno inibirem TNF- α e IL-1 β (FERNANDES et al. 2007). No entanto, faz-se necessário a realização de mais experimentos para a confirmação desta hipótese.

Os resultados obtidos com o OEPs em modelos de dor e inflamação estão em consonância, uma vez que o envolvimento de mediadores na gênese da dor inflamatória é essencial para a ativação de eventos da inflamação, incluso edema e migração leucocitária (NUNES et al. 2009). Neste modelo de migração celular, como de suas etapas (rolamento e adesão) reforça-se a suposição que o OEPs apresente uma possível ação sobre a inflamação neurogênica, uma vez que a SP é capaz de promover quimiotaxia, acúmulo de leucócitos, induzir a aderência nas células endoteliais (HAINES et al.1993; KAHLER et al. 1993), sintetizar fatores de transcrição e de liberar citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- α (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999) que estão envolvidos na produção de prostanóides e aminas simpáticas (CUNHA et al. 2005). Esta hipótese foi reforçada, uma vez que OEPs apresentou atividade antinociceptiva na 1ª fase e 2ª fase do teste de formalina e ainda nos modelos de edema de pata por Cg (principais ações na 1ªh- HIS e 5-HT e 3ªh- PGs),

dextrana (envolve HIS e 5-HT) e edema de orelha (envolve HIS, citocinas e PGs). Trabalhos anteriores utilizando os constituintes majoritários presentes na composição do OEPs como α -eudesmol inibidor de SP e CGRP (ASAKURA et al. 2000a) também reforçam esta hipótese.

Acredita-se que o efeito do OEPs ocorra principalmente a nível periférico, pelo fato deste não possuir atividade central no modelo de placa quente. Com isso, nossa suposição é que o OEPs possa estar atenuando a excitabilidade de nociceptores mediante a redução de mediadores da inflamação como HIS, 5-HT, Bk, PGs e de neuropeptídeos (SP e CGRP) que são responsáveis pela propagação do estímulo nocivo da periferia para o centro do sistema nervoso. E que esta inibição possa ser decorrente de uma possível ação sobre fatores transcricionais como NF- κ B que é responsável por regular a expressão de muitos genes envolvidos na resposta inflamatória como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , COX-2 e moléculas de adesão. Porém, faz-se necessário a realização de testes específicos com estes mediadores, enzimas e fatores transcricionais para melhor elucidação do mecanismo de ação deste óleo essencial.

10. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível analisar a composição química do OEPs, sendo identificados 25 constituintes de predominância sesquiterpênica como trans-nerolidol, ledol, α -humuleno, trans-cariofileno e α -eudesmol. A avaliação toxicológica foi avaliada administrando-se as doses de 2000 e 5000mg/kg (v.o.) do óleo essencial resultando em uma baixa toxicidade. Nos teste farmacológicos envolvendo modelos nociceptivos, o OEPs apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético nas doses de 62,5; 125; 250 e 500mg/kg (v.o.); e no teste de formalina o OEPs na dose de 188,8 mg/kg (v.o) apresentou atividade em ambas as fases sendo que este efeito independe do envolvimento de receptores opióides. Porém, não apresentou efeito antinociceptivo central no modelo de placa quente, sugerindo o envolvimento de mecanismos periféricos na dose de 188,8 mg/kg (v.o.). Nos modelos inflamatórios o OEPs na dose de 188,8 mg/kg (v.o.) apresentou atividade antiinflamatória nos modelos de edema de pata induzido por Cg e dextrana e edema de orelha induzido por óleo de cróton. Além disso, foi capaz de inibir a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal por estímulo indireto promovido pela Cg, bem como diminuiu o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas, sugerindo uma possível inibição de moléculas de adesão. Com isto, É possível que o OEPs através de seus principais constituintes, atue sobre citocinas pró-inflamatórias e este efeito antiinflamatório do óleo essencial atue sobre cálcio intracelular e apresente mecanismos de ação similares aos AIEs. Portanto nossos resultados sugerem que OEPs possui atividades antinociceptiva e antiinflamatória comprovadas cientificamente justificando o uso popular. Esta planta apresenta ainda, indicações pela medicina popular, onde as folhas desta espécie são usadas na forma de decoctos como antigripais, antiasmáticos e analgésicos e juntamente com o mel como antitussígeno.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gás chromatography/ quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Allured; Carol Stream, IL, 2007, p 456.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J**; V 4:p: 2860-2867. 1990

ALBAN, L.; WOLF, C.J. Central sensitization: A generator of Pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The journal of pain**. V 10, N^o9, p:895-926, 2009.

ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other celladhesion molecules. **FASEB J**; V 4. p: 2868-2880.1990

ALMEIDA, T. P; MAIA, J. Z; FISCHER, C. D. B; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107- 118, 2006

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

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12 (10), p. 225 – 234, 2006.

ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, V. 112, p. 171–183, 2006

ANKIER, S.I.; NEAT, M.L. Some studies on acute inflammation induced by dextran in the mouse. **Int Arch Allergy Appl Immunol**. V 42: 264-277, 1972.

ANKIER,S.I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**. V. 27, N^o 1, p: 1-4. 1974.

ANSEL, J.C; ARMSTRONG, C.A; SONG, I. Interactions of the skin and nervous system. **J Investig Dermatol Symp Proc** V 2: p: 23. 1997

ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHARADE, W.H. Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoids. **einstein.** ; V. 6 , N^o1 .p:159-165. 2008.

APG [=Angiosperm Phylogeny Group] II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot J Linn Soc** . V. 141. p:399– 436. 2003

ARRIGONI-BLANK, M.F; DMITRIEVA, E.G; FRANZOTTI, E.M; ANTONIOLLI, A.R;-ANDRADE, M.R AND MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. V. 91, nº 2-3, p: 215-218. 2004

ARRUDA, D.; D'ALEXANDRI, F.; KATZIN, A.; ULIANA, S. Antileishmanial activity of the terpene Nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, V. 49. p:1679–1687.2005

a. ASAKURA, K.;KANEMASA, T.; MINAGAWA, K.; KAGAWA, K.; YAGAMI, T.; NAKAJIMA, M.;NINOMIYA, M. α -Eudesmol, a P/Q-type Ca^{2+} channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion, **Brain research**, V.873, nº1, p:94-101, Agosto 2000

b._____. ω -Agatoxin IVA-sensitive Ca^{2+} channel blocker, α -eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats. **European Journal of Pharmacology**, V. 394, nº 1, p: 57-65.2000b

AZIBA, P.I; ADEDEJI, A; Ekor, M; Adeyemi, O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. **Fitoterapia**, V. 72,p: 57–58, 2001.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. Fevereiro. V. 46. nº 2, p: 446-475. 2008

BAKIR, B.; HIM, A.; ÖZBEK, H.; DUZ, E.; TUTUNCU, M. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of β -caryophyllene., **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, V. 2, nº 1, p: 41-44.2008

BARGER, G.; DALE, H.H. The presence in ergot and physiological activity of B-iminazoylethylamine. **J Physiol** , V. 40. p:38-40. 1910

BARNES, P.J.; ADCOK, I - Anti-inflammatoy actions of steroids:molecular mechanisms. **Trends Phrmacol Sci**, V. 14 p: 436-441. 1993

BEIRITH, A. Mecanismos envolvidos na nocicepção e edema causados pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Florianópolis. **Tese (Doutorado)-Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina**, 2003.

BAZZONI, F; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**. V. 334, Nº26, p: 1717–1725, 1996

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, V. 32, Nº. 3, p: 588-594, 2009

BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesth Scand.** V. 39. nº 103. p:1-44. 1995

BLOT W.J; McLAUGHLIN J.K. Over the counter non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal bleeding. **J Epidemiol Biostat.** V. 5, Nº 2, p:137-142, 2000

BONICA, J.J; YAKSH, T; LIEBESKIND, J.C – **Biochemistry and modulation of nociception and pain - The management of Pain**, 2ª Ed, V.1, Malvern, 1990; p: 96-99

BOVIL, J.G - Os **opióides na anestesia intravenosa**. 2ª Ed, Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter, 1993. p;192-229.

BRENOL J.C.T; XAVIER R,M; MARASCA J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Rev Bras Med.** V. 57, p: 33-40. 2000

BURT, S. Essential oil: their antibacterial properties and potencial applications in foods –a review. **International Journal of Food Microbiology.** V.94, p:223-253. 2004

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, V. 107, Nº 2, p. 139 – 154, 2005.

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

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anestesiologia**, V. 48. nº: 2 p: 137 – 158. 1998

CARVALHO, W.A.; VIANA, W- **Analgésicos Opióides** - Farmacologia, 4ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994, p: 441-459.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, V. 389, p: 816– 824, 1997

CHAHADE,W.H; GIORGI, R.D.N; SZAJUBOK, J.C.N. Nonsteroidal anti inflammatory drugs. **Einstein**, V. 6, Nº1, p:166-174. 2008.

COLE, D.S e MORGAM, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical science.** V. 104, p: 455-466, 2003

CORREA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, V. 110, p. 193-198, 1996.

COSTA, A. **Farmacognosia**. 6ª ed. Vol I. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001-2002, p. 360-361

COTRAN, C.; KUMAR, T.; ROBBINS, A . **Patología estructural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 4 Ed 1994. p:35-71.

CHIMONA, T. N.; PANAYIOTIDES, PAPADAKIS C. E.; HELIDONIS E. S.; VELEGRAKIS G. A. Antihistamine effects on experimental middle ear inflammatory model. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, V. 265, nº 8.p: 899-905. 2008

CHRISTOPHER, M. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, V. 225, p: 115–121, 2003.

CLEMENZA,L; DIELI, F; CICARDI, M; SALLERNO, A. Research on complement old issues revisited and a novel sphere of influence. **Trends immunology**. V. 24, pp: 292-296, 2003.

CROFFORD, L. J., WILDER, R. L., RISTIMAKI, A. P., SANO, H., REMMERS, E. F., Epps, H. R.. **Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid** .1994

CUNHA, F.Q ;LORENZETTI, B.B; POOLE, S;FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol**. V. 104, p: 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q; POOLE, S; LORENZETTI, B. B; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol** . V .107, Nº 3, p: 660–664.1992

CUNHA, J. M; CUNHA, F. Q; POOLE, S; FERREIRA, S. H. Cytokine mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br J Pharmacol**. V.130, Nº 6, p: 1418–1424, 2000.

CUNHA, T. M; VERRI, W. A.JR; SILVA, J. S; POOLE S;CUNHA, F. Q;FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. V.102, p: 1755–1760, 2005.

DAHLGREN, R.M.T. A revised system of classification of the angiosperms. **Bot. J. Linn. Soc**. V 80, nº 2, p: 91–124, 1980

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, V.273, p.3-13, 2003.

DA SILVA, A.C.M; ANDRADE.E.H; CARREIRA, L.M.M. Essential oil Composition of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of essential oil research**. V.18. p: 269-271. 2006

DE GENHARDT, J; KOLLNER, T.G; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, V. 70, p. 1621-1637. 2009.

DEMLING, R.H; HARMS, B; KRAMER, G; GUNTHER, R. Acute versus sustained hypoproteinemia and posttraumatic pulmonary edema. **Surgery**. V. 92, p: 79–86,1982

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, V. 82, Nº 2, p. 82 – 90, 2003.

DOHERTY, N.S; POUBELLE, P; BERGEAT, P; BEAVER, T.H; WESTRICH, G.L; SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**. V 30, Nº 5, p: 769–789, 1985

DOHERTY, N.S; BEAVER, T.H; CHAN, K.Y; COUTANT, J.E; WESTRICH, G.L. .The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice. **Br. J. Pharmacol**. V. 91, p: 39–47.1987.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **Int Rev Immunol**. V. 16; Nº 5-6, p: 457–499. 1998.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Surv Immunol Res**. V. 3, Nº 1, 29–33. 1984.

DI ROSA, M; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. **European Journal of Pharmacology**. V.4, p: 340–342, 1968.

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

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 24,p: 89–102. 1972

DÒREA, H.S; GAUJAC, A; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**. V. 4, Nº 077201. p:1-7.2008

DOS SANTOS, P.R.D.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES. E. F.; KAPLAN, M.A.C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**. V. 8. p: 547-551, 2001

DUARTE, I.D.G; NAKAMURA, M; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol.Res.** 21, 341–343, 1988

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia.** V. 101, n^o1. p: 8–16. 2008

FALLON, P. G; JOLIN, H. E; SMITH, P; EMSON, C. L; TOWNSEND, M. J., FALLON, R.. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. **Immunity.** V.17, N^o 1,p: 7–17, 2002.

FASMER, O.B; BERGE, O.G; HOLE, K., Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests, **Neuropharmacology.** V. 24, p: 729-734,1985.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Anti-inflammatory effects of compounds alphahumulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol,** V. 569, p: 228-236, 2007

FERREIRA, S. H; NAKAMURA, M.I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins.** V.18, N^o 2, p: 179–190,1979

FIHELSON, Z. Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. **Molecular immunology.** V. 28, p: 545-552, 1991

FOGEL, W.A.; LEWINSKI, A.; JOCHEM, J. Histamine in idiopathic inflammatory bowel diseases--not a standby player. **Folia Media Cracov,** V 46, n^o 3-4. p:107–18, 2005

FORTES,Z.B; FARSK, Y.S.P; OLIVEIRA, M.A; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes.** V. 40, p:1267–1273, 1991.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal.** Banco de dados in: < www.interscience.wiley.com > 2010

FRIES, J.W; WILLIAMS, A.J; ATKINS, R.C; NEWMAN, W; LIPS-COMB, M.F; COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. **Am. J.Pathol.** V.143, p: 725-737, 1993.

FRODIN, D.G. History and concepts of big plant genera. **Táxon,** N^o 3, p:753–776. 2004.

FUHLBRIGGE,R.C; WEISHAUPT, C. Adhesion molecules in cutaneous immunity. **Seminars in Immunopathology,** V.29, p.45-57, 2007.

FURSTENBERGER, G; RICHTER, H; FUSENIG, N.E; MARKS, F. - Arachidonic and prostaglandin E2 release and hanced cell proliferation induced

by the phorbol ester TPA in murine epidermal cell line. **Cancer Lett.** V.11, p: 191-198, 1981.

FUNK,C.D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science.** V. 294, p: 1871 ,2001

GALIGNANO, A; CARNUCCIO, R; DI ROSA, M; IALENTI, A; MONCADA, S. The anti-inflammatory effect of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. **Agents and Actions** V. 16, p: 1-3, 1985.

GARBOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. **Protocols inflammation: Methods in Molecular Biology**, V. 225, p: 129-137, 2003

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, V. 29, p: 1249-1257, 2008.

GENE, R.M.; SEGURA, L.; ADZET, T.; MARIN, E.; INGLESIAS, J. Heterotheca inuloides: anti-inflammatory and analgesic effects. **J Ethnopharmacology**, V. 60, p: 157–162. 1998

GILLIGAN, J.P; LOVATO, S.J; ERION, M.D; JENG, A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**, V. 18, p: 285–292, 1994

GILROY, D. W. The endogenous control of acute inflammation – from onset to Resolution. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies / Inflammatory and musculoskeletal diseases**, V. 1, Nº 3, p: 313 – 319, 2004

GIEMBYCZ, M.A e LINDSAY, M.A. Pharmacology of the Eosinophil. **Pharmacological reviews**, V. 51, p: 213-340, 1999.

GIORDANO, L.C.V.; GUIMARÃES, E.F. Piperaceae do Nordeste brasileiro I : estado do Ceará. **Rodriguésia**. V. 55. Nº 84. p: 21-46, 2004.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. **International Journal of Toxicology**, V. 26, p:279–288, 2007.

GOETTL, V.M; LARSON, A.A. An antagonist of substance P N-terminal fragments, D-substance P(1-7), reveals that both nociceptive and antinociceptive effects are induced by substance P N-terminal activity during noxious chemical stimulation. **Brain Research**, V. 780, Nº 1, p: 80–85, 1998.

GOLDEN, M.P; BROCK, T.G. **FEBS Lett.** V.487, p: 323. 2001

GOULART, R.H; KIMURA, E; PERES, V; COUTO, A; KATZIN, A.D.F. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in

Plasmodium falciparum. **Antimicrob Agents Chemother**, V. 48. p: 2502–2509.2004

GOZZANI, J.L.Opioids and Antagonists. **Rev Bras Anesthesiol**. V 44. Nº1. p 65-73.1994

GRACIOSO, J.S.;PAULO, M.Q.; LIMA.C.A.H; BRITO, A.R.M. Antinociceptive effect in mice of a hydroalcoholic extract of *Neurolaena lobata* (L.) and its organic fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, V. 50, p: 1425-1429, 1998.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopées Traditionnelles em Guyane: Créoles, Palikur, Wayapi**. Paris: Editions de l'ORSTOM. 1987, p.569.

GUENTHER, E. **In The Essential Oil**, 3ª edição. D.Van Nostrand: New York. Vol IV 1950.

GUIMARÃES, E.F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na reserva biológica de Poço das Antas, Silvia Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. V. 57. Nº 3. p: 567-587.2006

GUO, R.F., WARD, P.A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol**, V. 23, p: 821–852, 2005.

HAINES, K.A; KOLASINSKI, S.L; CROSTEIN, B.N; REIBMAN, J; GOLD, L.I; WEISSMANN, G. Chemoattraction of neutrophils by substance P and transforming growth factor-beta 1 is inadequately explained by current models of lipid remodeling. **Journal Immunology**, V.151, Nº3, p: 1491-1499, 1993

HALL, J.M. Bradikinin receptors. **Gen. Pharmac.** V.28. Nº 1. p: 1-6.1997

HALL, J.C; HEEL, K; PAPADIMITRIOU, J.M; PLATELL, C. The Pathobiology of Peritonitis. **Gastroentology**, V. 114, p:185–196, 1998.

HEYWOOD, V.H. Flowering Plants of the World. **Oxford University Press**. London p. 38-40. 1979.

HORL, W.H. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. **Pharmaceuticals** , V 3, p: 2291-2321, 2010.

HOLZER, P e HOLZER-PETSCHKE, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural, excitation, secretion and inflammation. **Pharmacol Therap**. V. 73, Nº3, p: 219-263, 1997.

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

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

JAMES, F.R; LARGE, R.G; BUSHNELL, J.A. Epidemiology of pain in New Zealand. **Pain**. V. 44, p: 279-283. 1991

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, V. 88, n. 4, p. 706-716. 2001

JOLY, A.B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal** Companhia Editorial Nacional. São Paulo-SP.1984, p. 306-313

JONKAM, C.C; ENKHBAATAR, P; YOSHIMITSU, N; THOMAS, B; JIANPU, W; JUERG, M; AIMALOHI, E; LILLIAN D.T; DAVID, H; DANIEL, L.T. Effects of the Bradykinin B2 Receptor Antagonist Icatibant on Microvascular Permeability After Thermal Injury in Sheep. **Shock**, V. 28. Nº 6, p: 704-709, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, V. 413, nº 13. 2001.

JÚNIOR,W. A. V; CUNHA, T.M; PARADA, C.A; POOLE, S; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology e Therapeutics**,p:1-23. 2006.

JÚNIOR, D.M; ARAÚJO, J.A.P; CATELAN, T.T.T; DE SOUZA, A.W.S; DA SILVA, N.P; ANDRADE, L.E.C; CRUVINEL, W.M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**. p: 66-81, 2011.

KIDD, B. L e URBAN, L. A.Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, V. 87, Nº 1, p: 3-11, 2001

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

KOUL, S.K.; TANEJA, S.C.; MALHOTRA, S.; DHAR, K.L. Phenylpropanoids and (-)-ledol from two *Piper* species. **Phytochemistry**, V. 32, nº 2, 1993, p: 478-480. 1993

KASAMA, T; MIWA, Y; ISOZAKI, T; ODAI, T; ADACHI, M; KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, V . 4, p: 273–279, 2005.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, E.D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. **Fitoterapia**. V. 3, p: 251-254.2002

KHAN, A; RAHMAM, M.; ISLAM, M.S. Neuropharmacological effects of *Peperomia pellucida* leaves in mice. **DARU**,V. 16, No. 1. 2008

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

KROEGEL, C; GIEMBYCZ, M. A; BARNES, P.J. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and fMET-LeuPhe. **J Immunol**, V. 145, p: 2581–2587, 1990.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran. Patologia –Bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

KUMAZAWA, T; MIZUMURA, K; KODA, H; FUKUSAKO, H. EP receptor subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. **Journal of Neurophysiology**, V. 75, Nº 6, p: 2361–8.1996

LANS, C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, V 3. Nº 3. p: 1-12. 2007

LAPCZYNSKI, A.; BHATIA, S.P.; LETIZIA, C.S.; API, A.S. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, V. 46, p:247–250.2008

LARSEN, G.L.; HENSON, P.M. MEDIATORS OF INFLAMMATION. **Annual, Rev. Immunol**, V 1. p:335-59 .1983

LE BARS, D.; GOZARIU, M.;CADDEN, S.M. Animal Models of Nociception. **Pharmacol Rev**, V. 53, p:597–652, 2001

LEE, S.J.; HAN, J.I.; LEE, G.S.; PARK, M.J.; CHOI, I.G.; NA, K.J.; JEUNG, E.B. Antifungal Effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporium gypseum* in a Guinea Pig Model. **Biol. Pharm. Bull.** V 30, nº 1. p:184—188 .2007

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F.; SOBERMAM, R.J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **Journal of medicine**. V 323, p: 645-654.1990.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F.A. simplified method of evaluation dose-effect experiments , **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, V.96, p:99-113 .1949

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**. Vol.10, nº 2 . p: 71-77. 2003

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, V.353, n.9164, 8, p.1607-1609.1999

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. p.512

LUSTER, A.D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**. V. 338, p: 436–445, 1998.

McDONALD, A.D; WOOL, A.G. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **Br. J. Pharmacol.** V 1, p: 4-14, 1946.

MACGLASHAN, D. histamine. A mediator of inflammation. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, V112, p :53-59, 2003.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Quim. Nova**, V. 32, No. 3, p: 595-622, 2009.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, V.25, p: 320-332. 1962.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V.38, nº 1, 2002.

MAYADAS, T.N e CULLERE, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. **Trends Immunol**, V. 26, p: 388–395, 2005.

MCGLANDLESS, E.L. Sulfated Polysaccharides in red and Brown algae. **Ann. Rev. Plant Physiol**, V 30, p:41-53. 1979.

MILLAN, M. J. **Prog. Neurobiol.** V. 57, p: 1611–164, 1999

MELLER, S.T; DYKSTRA, C; GRZYBYCKI, D; MURPHY, S; GEBHART, G.F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**, V. 33, p: 1471–1478, 1994.

MENDELL, L. M.; WALL, P. D. Presynaptic hyperpolarization: a role for fine afferent fibres. **Journal of Physiology**, V 172, p:274-29, 1964.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**, V. 46, n. 2, p: 142-153, 1997

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, V 150, p: 971-979, 1965

MIZUSHIMA, T. Molecular Mechanism for Various Pharmacological Activities of NSAIDS. **Pharmaceuticals**, V 3, p: 1614-1636, 2010.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (PIPERACEAE). **Rodriguésia**, V. 59. Nº1. p:161-195. 2008

MONCADA, S; FERREIRA, S.H; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. **European Journal Pharmacology**, V. 31, Nº2, p:250–260, 1975.

MURRAY, C.W; PORRECA, F; COWAN, A. Methodological refinement in the mouse paw formalin test an animal model of tonic pain. **Journal of Pharmacological Methods**, V. 20,p: 175–186, 1988.

MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacóides derivados dos lipídeos – Eicosanóides e fator de ativação das plaquetas. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 503 – 515, 2003

MURATA T, USHIKUBI F, MATSUOKA T, HIRATA M, YAMASAKI A, SUGIMOTO Y, ICHIKAWA A, AZE Y, TANAKA T, YOSHIDA N, UENO A, OH-ISHI S, NARUMIYA SHU. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. **Nature**, V. 388, Nº 6643, p:678–82, 1997

NAKA, T., NISHIMOTO, N; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res**, V . 4, Nº 3, p: 233–242, 2002

NATHAN, P.W e RUDGE, P. Testing the gate-control theory of pain in man. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** . Vol. 37, p: 1366-1372, 1974.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature – insight review articles**, V. 420, p: 846 – 852, 2002

NEE, M.; SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S. Flowering plants of the neotropic's. **Princeton University press**. p: 296-297. 2004

NIIRO, H; OTSUKA, T; TANABE, T; HARA, S; KUGA, S; NEMOTO, Y. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. **Blood**, V. 85, Nº12, p: 3736–3745, 1995

NISHIHARA ,I; MINAMI,T; UDA, R; ITO, S; HYODO, M; HAYAISHI, O. Effect of NMDA receptor antagonists on prostaglandin E2-induced hyperalgesia in conscious mice. **Brain Res**, V. 677, p:138–44, 1995.

NISHIDA,S; TOMIZAWA, S.Effects of compound 48/80 on dextran-induced paw edema and histamine content of infl ammatory exudate. **Biochem Pharmacol** V.29, p: 1073-1075, 1980

NUNES, B.S; RENSONNET, N.S; DAL-SECCO, D; VIEIRA, S.M; CAVADA,B.S;TEIXEIRA, E.H; MOURA, T.S; TEIXEIRA, C.S; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T; CUNHA, F.Q; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**,V. 379, p : 609–616, 2009.

OECD – Organization of Economic Co-operation and development: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. **NIH Publication**. Nº 02-4501, p. I-4, 2001 CD-ROM 1-2.

OLIVA, P.; AURILIO, C.; MASSIMO, F.; GRELLA, A.; MAIONE, S.; GRELLA, E.; SCAFURO, M.; ROSSI, F.; BERRINO, L. The antinociceptive effect of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. **European Journal of Pharmacology**, V. 445, nº 3. p: 179-185, 2002.

OLIVEIRA JÚNIOR J.O; SERRANO S,C; TEODORO A.L; DANA B,A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática Hospitalar**, V. 9, Nº 51, p:173-178, 2007

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology Reviews**, V. 87, p. 315 – 424, 2007.

PAN, J; XIA, L; YAO, L; MCEVER, R.P. Tumour necrosis Factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/Camp response element. **J. Biol. Chem**, V. 273, p: 10068 - 10077, 1998.

PANÉS, J; PERRY, M; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic Intervention. **British Journal of Pharmacology**, V. 126, p: 537 – 550, 1999.

PANGBURN, M.K;RAWAL, N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. **Biochemical Society Transactions**. V. 30, p: 6-10, 2002

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J Ethnopharmacol**, V.110, p: 323-333. 2007

PERAZA, G.G.; RODRIGUES, S.T.; MEDEIROS, S.H.L.; MUCCILLO-BAISCH, A.L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittale**, V.19. nº1. p: 35-44, 2007

PEREIRA, L.A; RAULLYAN, B. L.S; GUIMARÃES, E.F; ALMEIDA, M.Z; MONTEIRO, E.D.C. Plantas medicinais de uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental: Aspectos utilitários de espécies das famílias Piperaceae e Solanaceae. **Rev. Bras. de Agroecologia**, V.2, No.2 p: 1385-1388, 2007

PERRY,M.A; GRANGER, D.N. Role of CD 11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. **Journal of clinical investigation**, V. 87, p: 1798-1804, 1991.

PIERCE, P. A., G; XIE, X.; MEUSER, T E PEROUTKA, S.J. **5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study.** *Neuroscience*, V.81, n.3, p: 813-819. 1997

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.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional. Rio de Janeiro 1984. v.1,3,5.

PISERA, D. **Fisiologia da dor: Avaliação da dor e Tratamento em Pequenos Animais.** OTERO, P. E. São Paulo:Interbook, 2005. p. 30-74

PLEUVRY, B.J. Opioid receptors and their relevance between no adrenergic and cholinergic mechanisms involved in spinal nociceptive processing. **Acta Anaesthesiol Scand.** V 33. p 39-47. 1989

POSADAS,I ;BUCCI, M; ROVIEZZO, F; ROSSI, A; PARENTE, L; SAUTEBIN, L ; CIRINO, C Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, V.142, p: 331–338, 2004.

QUEIROZ,E. F.; FARO, R.R.A.; MELO,C.A. A Biodiversidade brasileira como fonte de novas drogas: passado, presente e futuro. **Revista de Fitoterapia.** V 9. nº1, p: 31-35. 2009

RAMADABRAN, K ; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmacol. Res**, V.3. p: 263-269,1996.

RAMABADRAN, K., BANSINATH, M. Bioscreening technique for analgesic activity. In: Thompson, E.B. (Ed.), **Drug Bioscreening: Drug Evaluation Techniques in Pharmacology.** VCH Publishers, New York, p. 53–78.1990

REGOLI, D.; BARRABÉ, J. Pharmacology of bradikinin and related kinins. **Pharmacology. Rev**, Vol 32, pp: 1-46. 1980.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.;FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol**, V. 387, p: 111-118, 2000.

RICHARDSON, J.D e VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, V. 302, No. 3. 839-845, 2002.

RICHARDSON, J.D; AANONSEN, L; HARGREAVES, K.M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. **Eur J Pharmacol**, V.345, p:145–153, 1998.

RICHARDSON JD, AANONSEN L, HARGREAVES KM. a cannabinoid receptor antagonist, produces hyperalgesia in untreated mice. **Eur J Pharmacol**, V. 319, p: 3–4,1997.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials Inc.), 1973.Acute oral and dermal toxicity studies. **RIFM** report number 2003, March 5, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA.

RIPAMONTI, C.; BANDIERI, E. Pain therapy. **Oncology Hematology**, p 1-15. 2009

ROCCA, B.; FITZGERALD, G.A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **International Immunopharmacology**. V. 2, 603–630, 2002

ROSLAND, J.H. The formalin teste in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, V. 45, p: 211-216, 1991.

RUIZ, A.H.; PAVON, J. **Flora peruviana et chilensis prodromus**. Madrid, imprenta de Sancha,1794 p. 8.

RUSSEL , W.M.S; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, especially 69-154, 1959.

RUSSO,C. BROSE,W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**. V.49, p: 123-133.1998.

SAMAIN, M.S; WANKE, S; MATHIEU, G; NEINHUIS, C; GOETGHEBEUR, P. Verhuellia revisited–unravelling an intricate taxonomical history and a new subfamilial classification of Piperaceae. **Táxon** . V. 57, p: 583–587. 2008.

SAMAIN, M.E; VANDERSCHAEVE, L.; CHAERLE, P.; GOETGHEBEUR,P.; NEINHUIS, C; WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus Peperomia (Piperaceae). **Plant Syst Evol**, V. 278, p :1–21, 2009.

SAPER, J.R; SILBERSTEIN, S; GORDON, D.C; HAMEL, R.L. **Handbook of headache management: A Pratical Guide to Diagnosis and Treatment of Head, Neck and Facial Pain**, 1993. Baltimore, p: 53-82.

SARAIVA, J.F.K. COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente? **Phaenix Comunicação Integrada**,São Paulo. p: 1-5. 2007

SAMMONS, J.M; RAVAL, P; DAVEY, P.T; ROGERS, D;PARSONS, A.A e BINGHAM, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse : role of nerve growth factor and the mitogen-activaded protein kinase pathway. **Brain research** , V. 876, p: 48-54, 2000.

SCHAFERS, M.; SCHIMIDT, C; VOGEL, C; TOYKA, K. V; SOMMER, C. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) regulates the expression of ICAM-1 predominantly through TNF receptor 1 after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve. **Acta Neuropathol (Berl)**, V. 104, Nº 2, p:197–205, 2002.

SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R.F. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. **Dioscorides Press**, p:484. 1990

SCHUMACHER H.R; KLIPPEL J,H; KOOPMAN W,J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Klippel JH. **Primer in the rheumatic diseases**. 12nd ed. Georgia: Arthritis Foudation; 2001. p. 583-91

SCHOLICH , K e GEISLINGER, G. Is mPGES-1 a promising target for pain therapy? **TRENDS in Pharmacological Sciences** .V .27, No.8 Available online 30 June 2006.

SEGUIN, L; MAROUILLE-GIRARDON, L; MILLAN, M..J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin-1 and neurokinin-2 receptor antagonists, a comparision to other classes of antinociceptive agent. **Pain**, V.61, p:325-343.1995

SHIGETA, A; MATSUMOTO, M; TEDDER, T.F; LOWE, J.B; MIYASAKA, M; HIRATA, T. An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation. **Blood** , V.112, p: 4915-4923, 2008.

SHERWOOD,E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology** V. 18, No. 3, p. 385–405, 2004.

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

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; DE SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano 3, n.16. Setembro/Outubro. p.38-43. 2000

SIMÕES, C.A.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento: óleos voláteis**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004 ,p. 467-495.

SIMON, L.S. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Curr Opin Rheumatol**. V.7; nº 3; p.159-166.1998

SIMON, E.J - Opioid peptides and their receptors. **Opioids in Anesthesia II**, Boston, Butterworth-Heinemanu, p;20-32. 1991

SMITH, W.L.; LANGENBACH R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J Clin Invest** , V. 107, p:1491– 1495, 2001

SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, V.6, n.12, p.1191-1197, 2005

SOUZA, G..E.P e FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed pentoneal cavity. **Inflammation research**, V. 17, Nº1, p.97-103, 1985.

STEWART, J.M; GRETTO, C.J; NELDNER, K; REEV, E.B; KRIVOY, W; ZIMMERMANN, M. Substance P and analgesia. **Nature** (London), V. 262, p: 784-785, 1976

SUGIMOTO, M; KURASHI, Y; SATOH, M; TAKAGI, H., Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain, **Neuropharmacology**, V. 25, p: 481-485, 1986.

SWINGLE, K.F; REITER, M.J; SCHWARTZMILLER, D.H. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, V. 254, p:168-76, 1981.

TEDDER, T.F; STEEBER, D.A; CHEN, A ; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J**, V. 9, p: 866 – 873, 1995.

THERESA, N.L; ALVAIR, P.A; MICHAEL, A.B. Dextran and Carrageenan Evoke Different Inflammatory Responses in Rat with respect to composition of infiltrates and effect of Indomethacin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, V. 221, p: 260-267, 1982.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.

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

TRANQUILLI, W. J. **Fisiologia da dor aguda: segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 399-402.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLALOGGIA, R. The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**. V. 17, p: 347-349, 1985

TURK, D.C e MELZACK, R. The measurement of Pain and the Assessment of People experience Pain. **Handbook of pain Assessment**. New York, Guildford, p: 3-12.1992.

TURNER, R.A. In: Turner, R.A. (Ed.), **The Screening Methods in Pharmacology**, vol I. Academic Press, New York, 1965

UMEZAWA, K; CHAICHAROENPONG, C. Molecular Design and Biological Activities of NF- κ B Inhibitors. **Mol. Cells**, V. 14, No. 2, p. 163-167, 2002

URBAN, L; THOMPSON, S.W.N e DRAY, A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. **Trends in Neurosciences Research**, V. 17, p: 432-438, 1994.

VANE, J.R., 1972. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-Like Drugs. **Nature New Biology**, V. 231, p: 232-235

VAN DEN BERG, M.E. **Plantas Medicinais na Amazônia/ Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático**. Belém: CNPq, 1982. p.223.

VAN WAUWE, J.P. GOOSENS, J.G. Arabinogalactan and dextran-induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents Actions**, V. 28, p: 78-82, 1989

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

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. **Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Campus Chapecó, Santa Catarina: Argos- Ed. Universitária UNOESC, 2001. p. 381-432.

VINEGAR, R; TRUAX, J.F; SELPH, J.L; JOHNSTON, P.R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: Vane JR, Ferreira SH, editor. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 50. Springer: Verlag, Berlin.1979. pp. 208–222

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 349 – 374, 2000.

WARE, C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. **Annu Rev Immunol**, V. 23,p: 787–819, 2005.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug Disc**. V. 2, p: 973-985, 2003.

WEINSTEIN, I. B.; LEE, L.S.; FISHER, P.B.; MUFSON, A.; YAMASAKI, H. Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes, **J. Supramol. Struct**, V.12, p:195–208,1979.

WINTER, C.A, RISLEY, E.A, NUSS, G.W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**. V.111, p.544-7, 1962

WHITE, I; OSHIMA, L; LESWARA, N.D. Antimicrobial activity and micropropagation of *Peperomia tetraphylla*. **Journal of medical and Biological sciences**. V.1. n°1, 2007

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, V. 24, p:739–768, 1988

WOOLF, C.J; MA, Q: Nociceptors: Noxious stimulus detectors. **Neuron**, V. 55, p:353-364, 2007.

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

WU, C.L.; HUANG, Y.M.; CHEN, J.R. (-)-Ledol the liverwort *Cephaloziella recurvifolia* and the clarification of its identity. **Phytochemistry**. V. 42. n°3 p: 677-679. 1996

YUNCKER, T. G. The Piperaceae – A Family Profile. **Brittonia**. Janeiro, Vol 10. p: 1-7. 1958.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil I: Piper – Groups I, II, III, IV. **Hoehnea** .Vol 2. p: 19-366, 1972

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil II: Piper- Group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorrhachis. **Hoehnea**. V. 3 , p: 121-144, 1973

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil III: *Peperomia* : taxa of uncertain status. **Hoehnea**. V. 4, p: 71- 413, 1974

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

ZUBRZYCKA, M e JANECKA, A. Substance P: Transmitter of nociception (minireview). **Endocrine regulations**, V. 34, p: 195- 201, 2000