



Universidade Estadual do Ceará  
Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de Souza

# EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI- EDEMATOGÊNICO DO EUGENOL

Fortaleza-Ceará  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Estadual do Ceará  
Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de Souza

## EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI- EDEMATOGÊNICO DO EUGENOL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andreлина Noronha Coelho de Souza  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Claudia Ferreira Santos

Fortaleza-Ceará  
2007

Universidade Estadual do Ceará

**Curso de mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas**

**Título do trabalho:** Efeito antinociceptivo e anti-edematogênico do Eugenol

**Autor:** Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de Souza

Defesa em: 27/12/2007

Conceito obtido: SATISFATÓRIO  
Nota obtida: 9.5

Banca examinadora:

---

Andrelina Noronha Coelho de Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora - UECE

---

Aline Alice Cavalcante de Albuquerque, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
UECE

---

José Henrique Leal Cardoso, Prof. Dr.  
UECE

**Ciência exige persistência.**

**“Muitos dos fracassos que as pessoas experimentam são devidos ao fato de que elas não sabem quão próximas estão do sucesso quando resolvem desistir.” Thomas Edson**

**“A finalidade fundamental da ciência é o bem estar da humanidade. A ciência é também o caminho mais certo e mais curto para a obtenção deste objetivo.**

**Os dirigentes da sociedade por desconhecerem tal função da ciência, geralmente não espelham em suas ações, a compreensão de tal objetivo.” Ernesto Neves**

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico é uma atividade complexa. Essa complexidade exige compreensão e ajuda de muitas pessoas. Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me dado o dom da vida e a força de vontade necessária para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Ernesto Neves e Itassucê Frota Sá Nogueira Neves pelo amor, compreensão e dedicação durante todos os anos de minha vida e principalmente por me ajudarem durante o longo processo do mestrado.

Agradeço ao meu esposo Erimar Feijó de Souza e aos meus filhos Mahayana Clara e Rhavy pelo amor e aceitação nos momentos em que me ausentei para dedicar-me aos estudos.

Aos meus irmãos e colegas de profissão Riedel, Tassel e Slayton pelo incentivo e apoio. Aos meus sobrinhos Israeli, Mariana, Gabriel, Arthur obrigada pelos momentos de alegria e descontração.

Agradeço às minhas secretárias e amigas Márcia Gomes Leite, Neila Rodrigues Martins e Sueli Gomes de Souza por organizar e realizar muitas tarefas que a mim cabiam.

Aos colegas de mestrado e aos colegas da família LAFIEX, obrigada pela paciência, gentil ajuda e prazerosa convivência.

Em especial, agradeço à grande amiga Natália Rocha Celedonio, pela participação, dedicação, presteza e competência, com quem sempre pude contar quando as muitas dúvidas surgiam.

Às amigas Magda Marinho e Patrícia Silva por dedicarem seus sábados, domingos e feriados para me ajudar no desenvolvimento dos experimentos.

Aos funcionários da Universidade Estadual e do Lafix, que sempre nos atenderam prontamente.

Ao professor Ariclécio Cunha de Oliveira, por contribuir com sua valiosa ajuda na correção e sugestões para desenvolvimento deste trabalho.

Nossos agradecimentos aos dirigentes da FUNCAP pelo apoio financeiro e aos proprietários e funcionários da Faculdade Christus pelo apoio logístico, pressupostos importantes para o sucesso de produção científica.

Pedindo desculpas pelas ajudas recebidas e aqui não lembradas, chego finalmente às minhas orientadoras Dr<sup>as</sup>. Andreлина Noronha Coelho de Souza e Cláudia Ferreira Santos pela difícil tarefa de avaliação e crítica deste trabalho.

Agradeço à banca examinadora, que prontamente aceitou o convite para a avaliação desta tese.

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>I- INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Eugenol	13
1.1.1 Atividades farmacológicas e ações biológicas	14
1.2 Dor	17
1.2.1 Mecanismos envolvidos na transmissão da dor	19
1.2.2 Alguns mediadores químicos envolvidos na sensação dolorosa	23
1.3 Inflamação	26
1.3.1 Inflamação aguda	28
1.4 Regulação da temperatura corporal	30
1.5 Relevância	32
<b>II- OBJETIVOS</b>	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
3.1 Drogas e soluções	34
3.2 Animais	34
3.3 Determinação da toxicidade aguda	35
3.4 Atividade antinociceptiva	35
3.4.1 Determinação do efeito antinociceptivo do eugenol no teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético	36
3.4.2 Determinação do efeito antinociceptivo do eugenol no teste da formalina	37
3.4.3 Determinação do efeito antinociceptivo do eugenol no teste da placa quente	39
3.5 Determinação da influência do eugenol na regulação da temperatura corporal	39
3.6 Atividade antiedematogênica	40
3.6.1 Determinação do efeito anti-edematogênico do Eugenol no edema de pata induzido por carragenina	40
3.6.2 Determinação do efeito anti-edematogênico do Eugenol no edema de pata induzido por dextrana	40
3.7 Análise estatística	41
<b>IV- RESULTADOS</b>	42
4.1 Toxicidade aguda do Eugenol	42
4.2 Avaliação do efeito do Eugenol em modelos de nociceção	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau centígrado  
5-HT - serotonina  
AA – ácido araquidônico  
ACP – área cinzenta periaquedutal  
ANOVA – análise de variância  
C – controle  
Ca<sup>+2</sup> – íon cálcio  
CK – quimiocinas  
COX – cicloxigenase  
CSF – fatores estimuladores de colônias  
DAINES – drogas antiinflamatórias não esteroidais  
DL 50 – dose que provoca letalidade em 50 % dos animais  
GABA – ácido gama – aminobutírico  
GCRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
H – receptores de histamina  
HSV-2 – vírus herpes simples tipo 2  
I.A.S.P. – Associação para Estudo da Dor  
i.p. – intraperitoneal  
i.pl - intraplantar  
IFN – interferons

IL – interleucina  
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada  
K<sup>+</sup> - íon potássio  
LC – leucotrienos  
MAO A – monoaminooxidase A  
N – número de experimentos  
NE – norepinefrina  
NGF – fator de crescimento do nervo  
NMDA – N – metil – D – aspartato  
NO – óxido nítrico  
NOSi – enzima óxido nítrico sintase induzida  
NOSn – enzima óxido nítrico sintase neuronal  
PAF – fator de ativação plaquetário  
PGE – prostaglandina E  
PGHS – enzima prostaglandina H sintase  
PLC – fosfolipase C  
POA – área pré-óptica  
RNA – ácido ribonucléico  
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro  
s.c. – subcutâneo  
SNC – sistema nervoso central  
SP – substância P  
TNF – fator de necrose tumoral  
TX – tromboxano  
v.o. – via oral  
v/v – volume por volume  
VIP – peptídeo vasoativo

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Efeito do eugenol no teste das contorções abdominais	44
<b>Figura 2-</b>	Efeito do eugenol no teste da formalina	46
<b>Figura 3-</b>	Efeito do eugenol no teste da placa quente	48
<b>Figura 4-</b>	Efeito do eugenol sobre a temperatura retal	49
<b>Figura 5-</b>	Efeito do eugenol sobre o edema de pata induzido por carragenina	51
<b>Figura 6-</b>	Efeito do eugenol sobre o edema de pata induzido por dextrana	52

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Parâmetros observados na determinação da toxicidade aguda	43
------------------	---	----

## RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as propriedades antiedematogênica e antinociceptiva do Eugenol, seu efeito sobre a temperatura corporal, bem como foi determinada sua toxicidade aguda, quando administrado por via oral. Foram utilizados os testes das contorções abdominais, teste da formalina, teste da placa quente, edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Inicialmente, foi estudada a toxicidade aguda do Eugenol, através da DL50, onde este monoterpênóide derivado do fenilpropano, apresentou DL50 de aproximadamente 1,2 g/kg. O Eugenol na dose de 300 mg/kg, inibiu significativamente o edema de pata induzido por dextrana em relação ao grupo controle. No edema de pata induzido por carragenina, o Eugenol, na dose de 300 mg/kg, apresentou efeito máximo reduzindo em 54 % o edema em relação ao grupo controle. No teste da formalina, o Eugenol (1 mg/kg) apresentou efeito antinociceptivo apenas na primeira fase, já na dose de 3 mg/kg, apresentou efeito antinociceptivo tanto na primeira quanto na segunda fase do teste. Isto demonstra que o Eugenol apresenta atividade anti-inflamatória, já que a segunda fase é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios. No teste da placa quente, o Eugenol na dose de 100 mg/kg, no tempo de 90 minutos, foi eficaz em aumentar o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico ( $55,0 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), demonstrando sua possível ação central. No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o Eugenol foi capaz de inibir significativamente o número de contorções quando comparado ao grupo controle. Estes dados são condizentes com os dados obtidos no edema de pata induzido por carragenina, visto que os dois testes envolvem a formação e liberação de derivados do ácido araquidônico, tais como as prostaglandinas. O efeito antiedematogênico do Eugenol manifestado no edema de pata induzido por dextrana parece está relacionado à diminuição do efeito e/ou da liberação de histamina. Percebeu-se ainda que o Eugenol reduziu em média aproximadamente  $2^{\circ} \text{C}$  a temperatura corporal quando utilizado nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg. Os resultados

aqui apresentados indicam que o Eugenol, por via oral, apresenta efeito antiedematogênico, antinociceptivo e redutor da temperatura corporal.

### ABSTRACT

In this present study, it was evaluated the antioedematogenic and antinociceptive effect of the Eugenol, its effect about the corporal temperature, as well like was determined its sharp toxicity, when administered orally. It was utilized the writhing test, the formalin test, the hot plate test and edema of paw prompted by carrageenan and dextran. Initially, it was studied the sharp toxicity of the Eugenol, through the DL50, where monoterpenoid derived from the phenylpropane, presented DL50 of approximately 1.2 g/kg. The Eugenol in the dose of 300 mg/kg, inhibited significantly the paw oedema induced by dextran regarding the group control. In the paw oedema prompted by carrageenan, the Eugenol, in the dose of 300 mg/kg, presented maximum effect reducing in 54 % the edema regarding the group control. In the formalin test of, the Eugenol (1 mg/kg) presented antinociceptive effect in the first phase, already in the dose of 3 mg/kg, presented antinociceptive effect in the first and in the second phase of the test. This shows that the Eugenol presents anti-inflammatory activity, since to second phase is characterized by the liberation of inflammatory mediators. In the hot plate test the Eugenol, in the dose of 100 mg/kg, in the time of 90 minutes, was efficient in increase the time of latency of answer to the thermal stimulus ( $55.0 \pm 1$  °C), showing its possible central action. In the acetic acid-induced writhing test the Eugenol inhibit significantly the number of contortions when compared to the group control. These dates are appropriate with the facts obtained in the paw oedema induced by carrageenan, seen that the two tests involve the formation and liberation of derived from the arachidonic acid, such as the prostaglandins. The antioedematogenic effect of the Eugenol manifested in the paw

oedema induced by dextran is probably related to the diminution of the effect and/or of the liberation of histamine. It perceived itself even if the Eugenol reduced in mean approximately (2 °C) the corporal temperature when utilized in the doses of 10, 30, 100 and 300 mg/kg. The results here presented indicate that the Eugenol, administered orally, presents antioedematogenic and antinociceptive effects and reducer of the corporal temperature.

## I- INTRODUÇÃO

### 1.1- Eugenol

O eugenol é uma substância aromática natural farmacologicamente muito ativa presente nos óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste brasileiro. Dentre estas plantas destacam-se: *Eugenia caryophyllus* (Spr.) Merril et Harr, o “cravo-da-índia”; *Dicypelium cariophyllatum* Ness, o “craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Cróton zehntneri* Pax et Hoffm, a “canela-de-cunha”; *Ocimum gratissimum* L., variedade *eugenoliferum*, a “alfavaca-cravo” (Craveiro *et al.*, 1981; Dallmeier e Carlini, 1981; Dundee, 1971; Lin *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1994). Em algumas destas espécies citadas, o teor de eugenol pode ser bastante elevado, podendo chegar até 95% do peso do óleo, como é o caso do cravo-da-índia.

Também conhecido como ácido eugênico ou cariofilico, o eugenol é um fenol monoterpenóide derivado do fenilpropano (Bruneton, 1995), popularmente denominado

essência de cravo (Escobar, 2002). A nomenclatura IUPAC para o eugenol é 4-alil-2-metoxi fenol (Oliveira-Filho *et al.*, 1975).

O eugenol se apresenta à temperatura ambiente como um líquido oleoso, incolor ou amarelo claro, mas quando em contato prolongado com o ar, torna-se mais espesso e de cor vermelho escuro. Em baixas temperaturas ( $-9^{\circ}\text{C}$ ) encontra-se no estado sólido (Escobar, 2002). É amplamente solúvel em clorofórmio, éter, gorduras e álcool etílico e pouco solúvel em água pura. Sua alta lipossolubilidade possibilita uma fácil absorção através das membranas lipídicas e rápido acesso ao local de ação. Apresenta odor característico, semelhante ao cheiro do cravo-da-índia, além de possuir sabor ardente e picante. É bastante irritante às mucosas e causa forte sensação de queimação quando em contato com a mucosa oral (Sticht e Smith, 1971).

### **1.1.1- Atividades farmacológicas e ações biológicas**

Apesar de existirem estudos com o eugenol que datam do século dezenove, foi na segunda metade do século vinte que verificou-se um interesse maior na pesquisa com este componente, sendo muitos dos trabalhos publicados ligados à odontologia, (Bonastre, 1967; Molnar, 1967). Atualmente, o eugenol vem sendo extensivamente estudado, já tendo sido caracterizados diversos de seus efeitos biológicos.

Por suas diversas propriedades farmacológicas, o eugenol tem diversos usos. Seus efeitos, dependentes da concentração de eugenol livre e do tempo de exposição ao tecido, são complexos e muitos deles ainda não estão completamente esclarecidos. Com a evolução do conhecimento a cerca desse composto, seu uso ficou mais comum, específico e seletivo, sendo utilizado em diferentes propostas, principalmente na área odontológica (Escobar, 2002; Atsumi *et al.*, 2000).

Devido a sua estrutura molecular complexa o eugenol possui diversas ações farmacológicas comprovadas. O eugenol é utilizado em práticas odontológicas como anti-séptico tópico, analgésico e anestésico local, além de conferir propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canais, visto ser bactericida (em concentrações relativamente altas de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  mol/L), portanto, eficaz no tratamento de algumas enfermidades infecciosas na cavidade oral (Markowitz *et al.*, 1992; Escobar, 2002). Também é utilizado como cimento provisório em cavidades dentárias, quando associado ao óxido de zinco (Nagababu e Lakshmaih, 1994).

A atividade anestésica local do eugenol talvez se deva a sua estrutura fenólica, que possui capacidade de penetrar com rapidez na bainha de mielina de uma fibra nervosa interferindo na transmissão do impulso nervoso por bloqueio de correntes neuronais, sejam elas provocadas por canais de potássio de rápida ativação e inativação ou por canais de potássio retificadores tardios (Gurney, 1965). Como anestésico local, o eugenol em baixas concentrações é um inibidor da atividade nervosa de forma reversível. Já em elevadas concentrações, bloqueia a condução nervosa irreversivelmente, indicando um efeito neurotóxico (Ozeki, 1975; Kozam, 1977).

O efeito bactericida do eugenol também tem sido atribuído à sua estrutura fenólica, principal responsável pelas propriedades antibacterianas dos óleos essenciais (Burt, 2004), que em concentrações mais elevadas provocam a degradação das proteínas das membranas celulares das bactérias; e em concentrações menores tendem a estabilizar as membranas das células, prevenindo a penetração de bactérias nos condutos dentários (Markowitz *et al.*, 1992).

Estudos têm evidenciado sua ação antifúngica, especialmente sobre toxinas de *Aspergillus parasiticus* (Markowitz *et al.*, 1992) sendo uma alternativa para conservação de alimentos. O eugenol pode ser também utilizado como alternativa de baixo custo para a preservação de obras culturais em bibliotecas, por exemplo, em função de sua atividade contra fungos (Rakotonirainy e Lavédrine, 2005). Segundo Chami e colaboradores, 2004, o eugenol pode ser uma droga promissora para o tratamento de candidíase oral experimental induzida por *Candida albicans* em ratos imunodeprimidos. O eugenol demonstrou ainda atividade contra HSV-2 (vírus herpes simples tipo 2) *in vitro* e forneceu proteção significativa contra um modelo de HVS-2 genital em ratos e camundongos (Bourne *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos também têm atribuído ao eugenol atividade anticarcinogênica (Reddy, 1996, 1997; Al-Harbi *et al.*, 1995), uma vez que suprimiu a mutagenicidade induzida em *Salmonella typhimurium* TA100 pela anfotericina B1 e pelo N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Francis *et al.*, 1989) e em TA98, pelo metilbenzantraceno (Amonkar *et al.*, 1986). Estudo realizado por Yoo e colaboradores, 2005, demonstrou ter, o eugenol, induzido apoptose de células cancerígenas de humanos, sugerindo ser um agente quimioterápico seguro e não tóxico, quando comparado à terapêutica convencional.

O eugenol apresenta também efeito anti-edematogênico local, anti-inflamatório e antinociceptivo. Os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo são favorecidos pela diminuição da síntese de prostaglandinas, através da inibição da cicloxigenase talvez devido a competição com o substrato do ácido araquidônico pelo sítio de ação da prostaglandina-sintase (Dewhist e Goodson, 1974; Escobar, 2002). Essa inibição da COX, associada à mobilização de  $Ca^{+2}$ , confere ao eugenol propriedade antiplaquetária (Chen *et al.*, 1996). Com relação ao efeito anti-edematogênico do eugenol parece resultar da interferência com as enzimas cicloxigenase e lipoxigenase da cascata do ácido araquidônico (Suzuki *et al.*, 1985; Wright *et al.*, 1995; Atsumi *et al.*, 2000).

Foi atribuída ao eugenol inibição da degranulação mastocitária, prevenindo a reação anafilática, além de inibir a liberação de histamina de células mastocitárias *in vivo e in vitro* (Kim *et al.*, 1997). Em estudos com edema de língua induzido por extrato de *Dieffenbachia picta* Scott (planta tóxica comumente conhecida como comigo-ninguém-pode), Dip e colaboradores, 2004, mostraram que o eugenol reduziu significativamente o edema em tempo e doses muito menores que as drogas habitualmente utilizadas.

Alguns trabalhos têm mostrado o potente efeito modulador do eugenol sobre as concentrações intracelulares de substâncias antioxidantes como glutatona e a enzima glutatona-N-transferase (Drukarch *et al.*, 1997; Rompelber *et al.*, 1996; Bouthillier *et al.*, 1996; Budavari, 1996; Stohs *et al.*, 1986). Ito e colaboradores, 2005, demonstraram que o eugenol tem atividade antioxidante também sobre moléculas de LDL-colesterol. O eugenol inibe a peroxidação lipídica pela varredura de radicais intermediários como as espécies reativas de oxigênio, essa atividade antioxidante é determinada por sua estrutura metoxifenólica (Stohs *et al.*, 1986; Taira *et al.*, 1992; Nagababu e Lakshmaiah, 1994; Mansuy *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 2005).

Em tecido nervoso, o eugenol apresenta ação anestésica geral, pois bloqueia tanto a condução do potencial de ação em nervos periféricos quanto na junção neuromuscular (efeito dependente da concentração) (Bevan e Szolcsanyi, 1990; Shibata *et al.*, 1994; Brondin e Rold, 1984; Ozeki, 1975; Seimoneit *et al.*, 1996; Cruz, 2001). O eugenol pode ainda promover neuroproteção contra dano isquêmico através de sua ação hipotérmica e por modulação de receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) e do radical superóxido (Won *et al.*, 1998; Wie *et al.*, 1997).

O eugenol apresenta ação depressora sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), o que pode explicar, pelo menos em parte, sua ação anticonvulsivante, antinociceptiva e hipotermizante. Alguns estudos revelam ainda que o eugenol apresenta significativa atividade antipirética quando administrado perifericamente, além de reduzir a febre por ação central de forma semelhante ao acetaminofeno (Feng e Lipton, 1987; Dallmeier e Carlini, 1981; Monte *et al.*, 2000; Sticht e Smith, 1971; Reiter e Brandt, 1985; Mello *et al.*, 1973; Sell e Carlini, 1976; Ohkubo e Shibata, 1997).

Em músculo liso vascular, o eugenol promove vasodilatação reversível da artéria pré-contraída por norepinefrina, por alta concentração extra-celular de  $K^+$  e por estimulação elétrica (Sticht e Smith, 1971; Nishijima *et al.*, 1999). O efeito vaso-relaxante é dependente de concentração, em vasos pré-contraídos com cloreto de potássio e fenilefrina, sugerindo sua atuação como antagonista de  $Ca^{+2}$  e na modulação do óxido nítrico (Damiani e Rossoni, 2003).

Alguns estudos relacionam os efeitos anticonvulsivante, hipotérmico e antiespasmódico do eugenol ao efeito como bloqueador de canais de cálcio (Monte *et al.*, 2000; Stich and Smith, 1971). Quando o eugenol interage com canais de cálcio, o influxo de íons é alterado e previne a permeabilidade da membrana celular ao sódio de maneira não específica, ocasionando bloqueio da neurotransmissão (Senseh *et al.*, 1993).

Estudos têm demonstrado que o eugenol pode apresentar diferentes tipos de toxicidade *in vitro*, *in vivo*, e quando admini

altas doses e foram associados à produção de radicais fenoxil, devido à sua instabilidade e hidrofobicidade (Fujisawa *et al.*, 2002).

## 1.2- Dor

A dor é uma manifestação utilizada pelo SNC para sinalizar um processo lesivo sofrido pelo organismo, que coloca em risco sua integridade física e pode, com frequência, ser o primeiro sinal de doenças. Essa manifestação proporciona reações de adaptação que visam preservar a integridade do organismo contra futuras lesões teciduais (Levine e Taiowo, 1994; Dray, 1997).

A dor, além de ser uma sensação, é uma experiência. Isto é importante, porque as sensações possuem vias neuroanatômicas relevantes, com receptores específicos que permitem a detecção e a medida de um estímulo. Já as experiências, incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (Russo e Brose, 1998).

O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual. A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinadas pela medula espinhal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (Russo e Brose, 1998).

A sensação dolorosa pode ser classificada de acordo com vários critérios. Levando em consideração a velocidade de sua transmissão pode ser classificada como rápida ou lenta. A dor rápida é sentida dentro de cerca de 0,1 s depois do estímulo doloroso ser aplicado. Os impulsos dolorosos são transmitidos pelos nervos periféricos, para a medula espinhal, pelas fibras aferentes primárias mielinizadas A-delta, com velocidade de condução entre 12 e 30 m/s. Por outro lado, a dor lenta começa após 1 segundo ou mais e aumenta lentamente, durante muitos segundos e às vezes minutos, sendo os impulsos conduzidos por fibras aferentes primárias não mielinizadas do tipo C, com velocidade de 0,5 a 2,0 m/s (Newmann *et al.*, 1996; Millan, 1999).

De acordo com a duração pode ser denominada transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Na dor aguda, geralmente ocorre lesão e ativação dos nociceptores no sítio lesionado (Loeser e Melzack, 1999), podendo rapidamente cronificar (Carr e Goudas, 1999). A dor crônica é causada, geralmente, por uma lesão ou patologia, sendo perpetuada por outros fatores que não os causadores iniciais da dor. A dor crônica está geralmente relacionada a hiperalgesia e a alodinia, além do processo de habilidade de modulação da dor está prejudicado (Loeser e Melzack, 1999).

A dor pode ser ainda classificada como nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica ou inflamatória que são resultantes, respectivamente, da estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neural, disfunção de um nervo, fatores psicológicos, ou resultante de processos inflamatórios (Millan, 1999).

Existem ainda algumas manifestações dolorosas que podem ser mencionadas, como a hiperalgesia e a alodinia. Segundo a Associação para Estudo da Dor (I.A.S.P.) existem determinadas situações em que a excitação das fibras torna-se progressivamente maior, especialmente em relação à dor lenta, enquanto o estímulo doloroso continuar. Ao estado de sensibilização desenvolvido nessas circunstâncias, denominamos hiperalgesia (Almeida *et al.*, 2004; Dray *et al.*, 1994).

A hiperalgesia envolve mediadores armazenados (substância P e aminoácidos excitatórios) e induzidos (óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico), liberados de neurônios aferentes primários ou sintetizados na medula espinhal (Meller *et al.*, 1996; Meller e Gebhart, 1994; Meller *et al.*, 1994). A hiperalgesia primária é consequência da sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório (La Montte *et al.*, 1982). Enquanto a hiperalgesia primária é a sensação de dor no local da injúria, a hiperalgesia secundária é sentida num local remoto da injúria inicial (Almeida *et al.*, 2004; Dray *et al.*, 1994).

A alodinia é caracterizada por uma sensibilidade aumentada para um estímulo normalmente inócuo. Um exemplo é uma autosensibilidade da pele queimada pelo sol ao leve toque. A alodinia pode resultar de duas diferentes condições; responsividade aumentada de neurônios transmissores da dor, da coluna espinhal (sensibilização central) ou diminuição dos

limiares de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica) (Basbaum e Jessell, 2000; Almeida *et al.*, 2004; Dray *et al.*, 1994).

Na sensibilização central, a dor pode ser produzida por ativação de fibras sensoriais primárias não-mielinizadas. A sensibilização periférica ocorre quando as terminações dos nociceptores ficam expostas a produtos de danos teciduais e inflamação, referidos coletivamente como caldo inflamatório. Tais produtos incluem prótons extracelulares, serotonina, bradicinina, nucleotídeos, fator de necrose tumoral (TNF), ácido araquidônico e outros metabólitos lipídicos, todos os quais interagem com receptores em terminações nervosas sensoriais (Basbaum e Jessell, 2000).

### **1.2.1- Mecanismos envolvidos na transmissão da dor**

A transmissão do processo doloroso é um mecanismo que envolve interações muito complexas de estruturas periféricas e centrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral. Embora os mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso tenham sido melhor compreendidos devido a um maior entendimento da fisiologia das fibras aferentes e do processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal (Grubb, 1998; Millan, 1999), os mecanismos exatos envolvidos na gênese e na transmissão da dor ainda não estão totalmente esclarecidos (Macfarlane *et al.*; 1997).

O início da transmissão da sensação dolorosa é mediada pela estimulação de receptores específicos, os nociceptores. A característica fundamental dos nociceptores é que estes respondem a estímulos que por sua intensidade são capazes de lesar tecidos, em contrapartida, não respondem a estímulos de média ou de baixa intensidade (Julius e Basbaum, 2001). Como todo sistema sensorial, a sensibilização nociceptiva converte estímulos ambientais em sinais elétricos, porém, ao contrário de outros sistemas (visão, olfato, tato), os nociceptores não se encontram restritos a estruturas anatômicas especiais, mas presentes em todo o corpo (Schmidt, 1976; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

Os nociceptores podem se dividir de acordo com os estímulos a que respondem em três classes: os mecanonociceptores, os termonociceptores e os nociceptores polimodais.

Os primeiros são sensíveis a estímulos mecânicos intensos, como apertões, beliscões e picadas; os segundos são sensíveis a estímulos térmicos ( $>45^{\circ}\text{C}$ ), na faixa em que os tecidos começam a ser lesionados pelo calor; e os terceiros são sensíveis tanto a estímulos mecânicos, como térmicos ou químicos (Nakatani e Yamashita, 1977).

Os nociceptores estão associados a fibras aferentes de pequeno diâmetro, que podem ser mielinizadas (fibras tipo A) ou amielinizadas (fibras tipo C). As fibras aferentes de primeira ordem, relacionadas com a condução do estímulo doloroso são classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: fibras C, fibras A-beta, fibras A-delta (Rang *et al.*, 2001).

As fibras tipo C se caracterizam por serem amielinizadas, possuírem diâmetro de 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução que varia de 0,5 a 2,0 m/s. Estas fibras apresentam receptores termosensíveis que respondem ao frio e ao calor, mecanociceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias alogênicas tais como íons potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina. Muitas fibras C, com receptores de alto limiar, estão associadas a nociceptores do tipo polimodais (Mense, 1983; Millan, 1999).

As fibras A-delta são mielinizadas, têm diâmetro que varia de 2,0 a 6,0  $\mu\text{m}$ , conduzindo a uma velocidade de 12 a 30 m/s. Elas transmitem informações de alta intensidade e baixa latência, promovendo a sensação dolorosa rápida da primeira fase da dor aguda, desencadeando o reflexo de retirada. As fibras A-delta dividem-se em dois grupos. O primeiro (tipo I), corresponde às fibras com receptores de limiar alto, que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e a estímulos térmicos ou químicos de baixa intensidade. O segundo grupo (tipo II) apresenta receptores que são estimulados por altas temperaturas ( $45-53^{\circ}\text{C}$ ) e alguns receptores para frio intenso ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) (Willis e Westlund, 1997; Almeida *et al.*, 2004).

As fibras A-beta possuem diâmetro maior que 10  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução que varia entre 30 e 100 m/s. Estas fibras não propagam estímulos potencialmente nócicos em situações normais, além de estarem relacionadas a alodinia. Existem ainda as fibras A-alfa, que juntamente com as fibras A-beta são fundamentais no circuito doloroso, pois participam no mecanismo de supressão segmental da dor. (Willis e Westlund, 1997; Millan, 1999).

Vários são os tratos envolvidos na transmissão da informação dolorosa, dentre eles o principal é o trato espinotalâmico. Através deste, a percepção da sensação nociceptiva tem início a nível periférico, através dos nociceptores e das fibras a eles associados sendo então transmitida até o sistema nervoso central (SNC). Para tanto os nociceptores fazem sinapse no corno dorsal com neurônios de segunda ordem, predominantemente ao nível da Lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender através do trato espinotalâmico, com suas fibras terminando principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatossensor, onde ocorre a somatização do estímulo nocivo, ou emitem axônios para o giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor. Esta é a chamada via clássica e é também a principal via de condução da dor, apesar de existirem outros possíveis caminhos envolvendo diferentes estruturas nervosas (Bensson, 1999).

Alguns “inputs” ao invés de resultarem em processos excitatórios, podem resultar em inibição das projeções neuronais. O balanço entre os procesos excitatórios e inibitórios é a base da teoria da comporta de transmissão da dor (Melzack e Wall, 1965) e referido por Le Bars e colaboradores, 1979, como controles excitatórios de substâncias nóxicas difusas.

A principal via descendente inibitória da dor passa via funículo dorsolateral. Essa via tem início na área cinzenta periaquedutal (ACP) e recebe aferências do hipotálamo e do trato espinotalâmico ascendente; descende via núcleo magno da rafe, que dá origem a neurônios liberadores de serotonina (5-HT) e de norepinefrina (NE), cujos papéis inibitórios descendentes contribuem para analgesia. As terminações dessas fibras fazem sinapses com neurônios na raiz dorsal completando um longo feedback negativo, funcionando como parte essencial do sistema de controle de comporta (Dickenson, 1995; Stamford, 1995).

De acordo com a teoria da comporta, a ativação das fibras A-alfa e A-beta, aumenta a atividade de neurônios inibitórios, e desta forma fecha a comporta bloqueando a transmissão da informação dolorosa para estruturas supra-espinhais. Ao invés disso, quando ocorre a ativação das fibras A-delta e C, dar-se a inibição da ativação dos interneurônios inibitórios e a comporta se abre, facilitando a transmissão da informação nociceptiva até as estruturas supraespinhais (Wall, 1978; Le Bars *et al.*, 1979).

A inibição dos circuitos nociceptivos no corno dorsal é mediada por um grande número de neurotransmissores, incluindo aminoácidos inibitórios tais como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina bem como neuropeptídeos tais como a encefalina (Curtis *et al.*, 1968; Lin *et al.*, 1994). O GABA está envolvido em ambas as inibições pré e pós-sinápticas, enquanto a glicina somente na inibição pós-sináptica (Eccles *et al.*, 1963; Curtis *et al.*, 1968; Carlton e Hayes, 1990; Carlton *et al.*, 1992). Receptores pré-sinápticos que medeiam inibição pré-sináptica incluem receptores GABA A e GABA B, esses mesmos tipos de receptores também podem estar envolvidos na inibição pós-sináptica, juntamente com receptores de glicina (Curtis *et al.*, 1968; Curtis e Lacey, 1994).

Os caminhos modulatórios descendentes da dor têm mostrado utilizar diferentes neurotransmissores, incluindo opióides, serotonina, e/ou catecolaminas, e as estruturas não incluem somente ACP, mas também locus ceruleus, subceruleus e núcleo fusocolicular e vários núcleos da formação reticular. Além disso, estruturas dos altos níveis do sistema nervoso tais como o córtex cerebral e várias estruturas límbicas, incluindo o hipotálamo contribuem para os caminhos da analgesia (Willis e Westlund, 1994).



Muitas citocinas são pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8), outras são anti-inflamatórias, e ainda outras apresentam ambos os efeitos. Das citocinas, as mais importantes são IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF). A IL-1 e o TNF são liberados por células mononucleares do processo inflamatório e produzem muitas das respostas pró-inflamatórias, incluindo indução de febre, mobilização e ativação de leucócitos polimorfonucleares, indução das enzimas cicloxigenases e lipoxigenase, elevação na expressão de moléculas de adesão, ativação de linfócitos T e B, estimulação da produção de outras citocinas.(Dray,1997; Millan,1999; Calixto *et al.*,2000 ). As citocinas, em geral, são liberadas em sequência controlada, por diversos tipos de células e são responsáveis pela produção de mediadores finais, envolvidos na indução de sinais e sintomas inflamatórios. Essa regulação ocorre principalmente a nível de transcrição gênica com expressão do RNA mensageiro (RNAm) da citocina (Millan, 1999).

Além do envolvimento no processo inflamatório, as citocinas estão envolvidas na regulação da dor. Diversos são os exemplos da participação das citocinas nos processos dolorosos, quer apresentem componentes periféricos ou centrais. A IL-1 $\beta$  e IL-6 estimulam a produção de prostaglandinas, enquanto TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos via prostaglandinas, bem como aminas simpaticomiméticas. Em adição aos efeitos via prostaglandinas, IL-1 $\beta$  pode estimular a secreção de NGF dos matócitos e exerce efeitos hiperalgésicos através de leucotrienos B<sub>4</sub>. Existem evidências de que a expressão de citocinas no sistema nervoso periférico e na coluna espinhal apresentam um envolvimento no comportamento doloroso em vários modelos de injúria neuropática em roedores, além disso, estas podem sensibilizar diretamente nociceptores (Wieseler-Frank *et al.*, 2004; Zelenka *et al.*, 2005).

As **cininas** pertencem a um grupo de peptídicos contendo de 9-11 aminoácidos, cujo principal representante é a bradicinina (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1992). As cininas participam de diversos processos fisiopatológicos, como regulação da pressão arterial, controle do tônus do músculo liso gastrintestinal, e das vias aéreas, bem como em vários estados inflamatórios e de fenômenos dolorosos (a nível espinhal e supra-espinhal) (Hall, 1992; Greisbacher e Legat, 1997).

Os efeitos das cininas são mediados através dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Calixto *et al.*, 2000). Os receptores B<sub>1</sub> promovem a manutenção da hiperalgesia e sua expressão é aumentada rapidamente durante os processos metabólicos ou infecciosos, inclusive na fase crônica dos processos inflamatórios e infecciosos (Couture *et al.*, 2001). Os receptores B<sub>2</sub>

parecem estar envolvidos na fase aguda de respostas dolorosas e infecciosas, estando presentes em neurônios sensoriais, onde se encontram acoplados à proteína G que induz a ativação das fosfolipases C e A<sub>2</sub> (Millan, 1999).

Dentre os **eicosanóides** estão a prostaciclina (PC), o tromboxano (TX), leucotrienos (LC) e as prostaglandinas (PGs), um dos principais mediadores envolvidos na regulação da dor. As prostaglandinas são geradas a partir do ácido araquidônico através da ação de enzimas denominadas cicloxigenases (COXs). Existem duas isoformas ou isoenzimas de cicloxigenase denominadas cicloxigenase 1 (COX<sub>1</sub>) e cicloxigenase 2 (COX<sub>2</sub>). A COX<sub>1</sub> é constitutiva e encontra-se relacionada com ações fisiológicas nos vasos sanguíneos, estômago e rins. A COX<sub>2</sub> é produzida por células expostas à agentes pró-inflamatórios, incluindo as citocinas, ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas (Vane e Botting, 1995,1996; Millan, 1999).

Muitas dessas substâncias químicas relacionadas aos processos dolorosos também estão relacionadas a processos inflamatórios.

### **1.3- Inflamação**

A inflamação é compreendida como a maior reação da imunidade natural (congenita) frente a penetração de agentes infecciosos, ao ataque de antígenos e/ou injúria tecidual (dano tecidual), que ocorre no tecido vascular. É um processo celular e bioquímico que ocorre aproximadamente da mesma maneira, independentemente da natureza do estímulo, visto que em quaisquer circunstâncias, a inflamação possui três etapas comuns que são vasodilatação com aumento de permeabilidade, migração de leucócitos e plaquetas e finalmente o reparo tecidual (Rang *et al.*, 2001).

Suas funções incluem destruição e remoção de agentes nocivos, confinamento de agentes lesivos para a remoção eficaz e eliminação dos efeitos sistêmicos dos agentes

celulares, além do aumento da resposta imune e da promoção da cicatrização da ferida (Brown *et al.*, 1968). A inflamação excessiva, entretanto, pode guiar a injúria tecidual, e se for severa, causar descompensação fisiológica, disfunção orgânica e até morte (Liew, 2003).

A inflamação pode ser dividida em duas grandes categorias que são crônica e aguda. A inflamação crônica se caracteriza por uma prolongada duração (semanas, meses ou anos). Infiltração de células mononucleares e fibrose são feitos histológicos típicos da inflamação crônica (Liew, 2003; Davies *et al.*, 2003). De modo geral, a inflamação aguda apresenta-se relativamente de curta duração (horas ou dias) e se caracteriza por vasodilatação (rubor), exsudação de fluido rico em proteínas e migração celular primariamente de neutrófilos no local da injúria e em muitos casos ativação da cascata de coagulação (Splettstoesser e Schull-Werner, 2002).

A inflamação é sempre induzida por produtos de degradação bacteriana, fungos, vírus, bem como células mortas ou defeituosas do próprio hospedeiro. Produtos da degradação de agentes invasores são detectados por receptores específicos localizados na membrana plasmática, o que ocasiona a expressão de genes da inflamação. A expressão desses genes determina a liberação de proteínas envolvidas nas reações inflamatórias (Simbirtsev, 2005; Walting, 2006; Igonin *et al.*, 2004; Kulinsky, 2007).

Proteínas regulatórias, peptídeos e enzimas expressadas como resultado da ativação de genes inflamatórios são especialmente importantes na iniciação e na regulação da inflamação, com destaque para as citocinas, quimiocinas, fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase 1 e 2, proteínas kinase, sistema complemento, cascata de coagulação, enzimas proteolítica (Kulinsky, 2007).

Na fase inicial da resposta inflamatória, que ocorre imediatamente após a lesão tecidual, os vasos sanguíneos locais se dilatam tornando-se mais permeáveis. A vasodilatação permite que o sangue alcance a região danificada e o aumento da permeabilidade permite que células citotóxicas naturais, plaquetas, principalmente neutrófilos e macrófagos migrem com mais facilidade dos vasos sanguíneos (Lingen, 2001). O aumento do fluxo sanguíneo possibilita a percepção dos sinais e sintomas da inflamação – calor, rubor, dor, edema na região afetada (Mc Green e Mc Green, 2000), além de perda da função em determinadas circunstâncias (Rang *et al.*, 2001; Rocha e Silva, 1978).

Como mencionado, a vasodilatação é um feito clássico da inflamação aguda caracterizada clinicamente por vermelhidão e calor no local, que se verifica em consequência do engurgitamento dos capilares e arteríolas, bem como recrutamento adicional de outros vasos que normalmente levam ao eritema; também pode haver elevação da temperatura local (Rocha e Silva, 1978). A vasodilatação é mediada primariamente por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras (PGI<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub>). Esses mediadores lipídicos são produzidos à partir do ácido araquidônico via ativação da cicloxigenase (Taberner *et al*, 2003). Outro sinal inicial da inflamação é o edema, que é causado pelo fluxo transvascular de fluido rico em proteínas provenientes do compartimento intravascular para dentro do interstício como resultado das ações da histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema de complemento, SP e PAF (Friedl *et al.*, 1989; Denzlinger *et al.*, 1985). De acordo com Tortora e Grabowski (2002) a dor pode resultar de lesão de fibras nervosas, da irritação provocada por substâncias químicas provenientes de patógenos ou ainda, do aumento da pressão originada do edema (Tortora e Grabowski, 2002).

À medida que o plasma sai para o interstício, o sangue remanescente flui mais lentamente e torna-se mais viscoso, permitindo que leucócitos possam se aderir às paredes dos vasos e espremam-se através dos espaços criados pela retração endotelial. O fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilos da anafilaxia causam movimento unilateral de neutrófilos e eosinófilos para o local da inflamação. Os neutrófilos são os primeiros e mais abundantes leucócitos a serem transferidos para o local da inflamação ou infecção. O fenômeno de transmigração é dividido nas fases de migração, rolagem, adesão, diapedese e quimiotaxia (Schiffman *et al.*, 1975; Fernandez *et al.*, 1978). A migração leucocitária é facilitada pelas moléculas de adesão, que podem estar presentes em diferentes tipos de células e são expressas por estímulos gerados no sítio do processo inflamatório. Algumas das células que podem expressar moléculas de adesão têm sido identificadas como leucócitos, macrófagos fibroblastos, plaquetas, bem como em células endoteliais. Os fatores quimiotáticos estimulam tanto os leucócitos como as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, facilitando a adesividade entre essas células, processo conhecido como rolling (Bevilacqua, 1993).

No processo inflamatório três sistemas de proteínas plasmáticas que desempenham papel fundamental são o sistema de cininas, o sistema complemento, e o sistema de coagulação; todos consistindo de uma série de enzimas inativas que são convertidas através de uma cascata de etapas em enzimas ativas. Estes sistemas estão unidos

através de uma mistura de interações nas quais as proteínas de um podem ativar um ou os demais sistemas (Bhole e Stahl, 2003; Opal, 2003; Campbell, 2001).

### **1.3.1- Inflamação aguda**

A formação do edema está entre os sinais iniciais da inflamação. O edema é causado pelo fluxo de fluido rico em proteínas do compartimento transvascular para o interior do intertício como resultado da ação da histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema do complemento, SP e fator de agregação plaquetária (PAF). Estes fatores alteram de modo marcante a função de barreira dos pequenos vasos e aumenta a permeabilidade de capilares e vênulas a água e proteínas (Abbas e Lichtman, 2005; Rang *et al.*, 2001). Diversos são os agentes flogísticos capazes de induzir a liberação de mediadores inflamatórios e que portanto podem ocasionar o edema. Dentre estas substâncias estão a carragenina e a dextrana.

A carragenina causa uma reação inflamatória facilmente reproduzível sendo pois, um irritante padrão para examinar inflamação aguda. Este teste é altamente sensível para drogas anti-inflamatórias não esteroidais, sendo desde muito, aceito como agente flogístico para investigar novas drogas de efeito anti-inflamatório (Just *et al.*, 1998).

A injeção intraplantar de carragenina elicitava uma resposta inflamatória que é caracterizada por edema de pata tempo dependente, infiltração de neutrófilos e aumento dos níveis de vários mediadores inflamatórios que operam em uma seqüência para produção da resposta inflamatória (Vinegar *et al.*, 1969), além do desenvolvimento de hiperalgesia para estímulos térmicos e mecânicos (Handy e Moore, 1998).

Tem sido bem documentado que vários mediadores inflamatórios tais como cininas, prostaglandinas, histamina e PAF estão envolvidos em respostas edematogênicas elicítadas por carragenina (Kheifets *et al.*, 1989). A formação de edema após a injeção de carragenina tem sido descrita como um evento bifásico, consistindo de uma primeira fase, relativamente rápida, seguida de uma fase tardia mais sustentada (Handy e Moore, 1998). A fase inicial do edema (0-1h) que não é inibida por drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINS), tais como indometacina ou aspirina tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-

HT e bradicinina (Di Rosa *et al.*, 1971). Em contraste, a segunda fase (após a primeira hora) tem sido relacionada com elevada produção de prostaglandinas, em especial PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> (Di Rosa e Willoughly, 1971).

A carragenina induz a liberação periférica de NO, o que contribui para a formação de edema e desenvolvimento de hiperalgisia em tecido injuriado e inflamação. A liberação periférica de NO é mediada por óxido nítrico sintase neuronal (NOS<sub>n</sub>) na primeira fase da inflamação e por ambos NOS<sub>n</sub> e óxido nítrico sintase induzida (NOS<sub>i</sub>) na fase tardia da inflamação. NO dilata e promove a permeabilidade microvascular (Gardiner *et al.*, 1990), resultando na formação de edema (Giraldelo, *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1990). NO também aumenta a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como citocinas e espécies reativas de oxigênio (Marcinkiewicz *et al.*, 1995) e prostanoides (Sautebin *et al.*, 1995), resultando na formação de reação inflamatória.

A dextrana é um polissacarídeo de alto peso molecular, capaz de induzir uma reação anafilática (Van Wauve e Goosens, 1989). No edema induzido por dextrana, percebe-se um acúmulo de fluidos devido à degranulação de mastócitos, caracterizado por apresentar poucas proteínas e alguns neutrófilos (Lo *et al.*, 1982). Os principais mediadores envolvidos na reação edematosa induzida por dextrana são histamina e serotonina (Katz *et al.*, 1984).

É interessante salientar que o edema produzido por substâncias como dextrana, carragenina, formalina, dentre outros agentes flogísticos não é especificamente influenciado por compostos anti-inflamatórios. Uma variedade de outros compostos são capazes de reduzir suas respostas edematogênicas. Especificamente no caso do edema de pata induzido por carragenina, este pode ser inibido por agentes adrenérgicos, mas não por cortisona (Winter *et al.*, 1962).

#### **1.4- Regulação da temperatura corporal**

Os humanos são homeotérmicos (sangue quente) e podem manter a temperatura corporal interna dentro de 0,5 °C acima de uma faixa de temperatura que varia de 12 °C a 60 °C em ar seco (Wheeler, 2006). A temperatura interna do corpo precisa ser mantida dentro de

uma estreita faixa de temperatura para garantir a função ótima das células. Muitas reações enzimáticas dependem da temperatura, sendo consideravelmente lentas com temperaturas baixas; por outro lado, altas temperaturas podem resultar na desnaturação das proteínas, o que pode iniciar o processo de morte celular (Wheeler, 2006).

Termorregulação é o termo dado ao balanço existente entre a produção e a perda de calor para que se estabeleça uma temperatura dentro de certa “normalidade” (Cinar e Filiz, 2006). Atualmente, o controle da temperatura do corpo ainda não está totalmente compreendido, mas sabe-se que a regulação da temperatura depende da habilidade do sistema nervoso em estabelecer o sensoriamento e a integração da informação térmica entre o ambiente externo e interno (Wheeler, 2006).

Em mamíferos, se sabe que a temperatura da superfície do corpo é medida por sensores térmicos (Necker, 1972, 1977; Gentle, 1989) e a temperatura interna por estruturas termosensíveis na área pré-óptica (POA), hipotálamo anterior, coluna espinhal (Necker e Rautenberg, 1975; Schmidt, 1976, Hammel *et al.*, 1976; Helfmann *et al.*, 1981; Schmidt e Simon, 1982; Mercer e Simon, 1984); e possivelmente em outros locais.

Pelo menos em mamíferos, embora sensores de frio e calor tenham sido encontrados na pele e na parte interna do corpo, parece que existe uma dominância de informação de sensores de frio cutâneos, enquanto a maioria de estruturas termosensíveis internas do corpo são sensíveis ao calor (Boulant, 1998).

POA é a região da junção entre o telencéfalo e o diencéfalo no cérebro dos vertebrados; essa região parece integrar informações provenientes da temperatura local do cérebro com outras temperaturas corporais, sendo, pois, um local termointegrativo e termosensitivo do sistema nervoso central (Boulant e Dean, 1986; Boulant, 1998).

Tem sido mostrado ainda que o aquecimento da região pré-óptica elícita uma variedade de respostas para perda de calor que incluem aumento de secreção salivar, aumento do fluxo sanguíneo da pele, bem como respostas comportamentais. Em contraste, o resfriamento desta área evoca respostas para produção de calor, tais como calafrios e respostas para retenção de calor, como vasoconstricção cutânea além de respostas comportamentais (Klir e Heath, 1994).

A febre é uma complexa reação fisiopatológica resultante do contato do hospedeiro com agentes infecciosos ou inflamatórios referidos como pirógenos exógenos. Este contato resulta em uma série de respostas que são chamadas em conjunto como “resposta da fase aguda”. Entre estas respostas pode-se citar, além da febre, a ativação endócrina e imunológica (Dinarelli *et al.*, 1988; Blatteis e Schic, 1997). Alguns argumentos apontam os benefícios da febre, tais como melhora da função imune e redução da proliferação bacteriana particularmente em associação com privação de ferro (Kluger, 1991; Marnila *et al.*, 1995; Kluger *et al.*, 1998).

Estes argumentos dão suporte a idéia da febre como um fator importante para a sobrevivência de diversos organismos (ectodermas e endodermas), por outro lado esta pode ocasionar danos quando acima de certa temperatura. Segundo antigas observações (DuBois, 1949), a febre em humanos raramente excede 41 °C e parece ter limites, sendo postulado que existem mecanismos de emergência que previnem aumento febril da temperatura do corpo para níveis que põem em risco a vida devido manifestações de dano cerebral (Mackowiak e Boulant, 1997; Tatro, 2000; Kluger *et al.*, 1998; Roth, 1998; Roth *et al.*, 2004).

### **1.5- Relevância**

Há muito, existe a preocupação em compreender os processos dolorosos, que apesar de causar incômodo, desempenham uma função biológica essencial, que é de proteção. Apesar dos muitos avanços já alcançados nesta área existem várias lacunas a serem preenchidas, visto que muitos dos processos dolorosos ainda são difíceis de tratar com os medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico.

Na medicina moderna, muitos produtos naturais têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de drogas de importância terapêutica, prova disto é que cerca de 25% de

todas as drogas derivam, direta ou indiretamente, de plantas (Cragg *et al.*, 1997; De Smet, 1997; Shu, 1998).

Apesar das plantas medicinais serem tradicionalmente utilizadas para curas de enfermidades, há cinco milênios, por diversas civilizações, a utilização de plantas como fonte de novas drogas é inexplorado, visto que entre as estimadas 250.000 espécies de plantas existentes no mundo, somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e uma fração apenas, submetida aos ensaios farmacológicos (Hamburger e Hostettmann, 1991).

A despeito do desenvolvimento da terapêutica que tem ocorrido nos últimos anos, a comunidade médica ainda precisa urgentemente de analgésicos potentes e eficazes, especialmente para o tratamento de dores crônicas, visto que milhares de portadores de câncer ainda continuam utilizando morfina, ou outros derivados opióides, apesar de seus conhecidos efeitos colaterais. Isso, portanto, tem renovado o interesse das maiores companhias farmacêuticas em pesquisar produtos oriundos de plantas com o intuito de descobrir analgésicos potentes e específicos, com menos efeitos colaterais.

A escolha da utilização do eugenol nos nossos ensaios experimentais se deve a todas as atividades e ações biológicas atribuídas a este composto como ação anti-edematogênica, anti-fúngica, anestésica, analgésica, anti-carcinogênica, dentre outras, além deste composto estar presente na composição de diversos óleos essenciais de várias plantas do Nordeste brasileiro que são popularmente utilizadas para a cura de diversas enfermidades.

## **II- OBJETIVOS**

### **2.1- Geral**

- Caracterizar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do Eugenol em modelos experimentais de analgesia e de edema.

### **2.2- Específicos**

- Determinar os efeitos tóxicos do Eugenol em modelo de toxicidade aguda.
- Avaliar os efeitos do eugenol, por via oral, sobre modelos clássicos de nocicepção (teste das contorções abdominais, nocicepção induzida por formalina, teste da placa quente).
- Estudar os efeitos do Eugenol, por via oral, sobre a temperatura corporal.
- Analisar a ação anti-edematogênica do eugenol, por via oral, em modelos de edema de pata induzidos por dextrana ou carragenina.

### **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- Drogas e Soluções**

As drogas utilizadas para o desenvolvimento da pesquisa foram de pureza analítica. As soluções de ácido acético (0,6 % v/v; i.p.) e formaldeído (2,5 % v/v; i.pl.) foram obtidas da Cinética Química Ltda e preparadas em solução salina (NaCl 0,9 % p/v). A morfina (10 mg/kg; s.c.), dextrana (1% p/v; i.pl.) e carragenina (1% p/v; i.pl.) foram obtidas

da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) e preparadas em solução salina (NaCl 0,9% p/v). A indometacina (10 mg/ml; i.p.) foi obtida da Sigma e preparada em bicarbonato 1 % (NaCl 0,9 % p/v).

As soluções de eugenol (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10; 30; 100; 300 mg/kg), foram preparadas em salina 0,9 % contendo Tween 80 0,1 % v/v seguidas de agitação mecânica. Após homogeneização, estas doses foram administradas por via oral através de cânula orogástrica em um volume final de 0,1 ml/10g de peso corpóreo do camundongo. O Tween 80 0,1 % foi obtido da companhia Sigma e preparado em solução salina (NaCl 0,9 % p/v).

### **3.2- Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos machos, pesando entre 25 e 35 g e ratas *Wistar* fêmeas, pesando entre 250 e 350 g. Estes foram provenientes do Biotério da Faculdade Christus e mantidos na sala de quarentena do Instituto Superior de Ciências Biomédicas com ciclo claro/escuro de 12 h.

No dia do experimento, os animais permaneceram no laboratório à temperatura de 22 a 24 °C, por um período médio de 2 horas antes da realização dos testes, que ocorreram entre 9 e 18 h, na fase clara do ciclo. Durante o experimento, os animais tiveram água *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará.

### **3.3- Determinação da toxicidade aguda**

Para determinação da toxicidade aguda, os camundongos foram separados em 3 grupos de 6 animais cada. Os grupos foram tratados com eugenol, via oral, nas doses de 600, 1500 e 3000 mg/kg. Após a aplicação, os animais foram observados de forma contínua durante 120 minutos seguido de intervalos de 8/8 horas por 72 horas. O número de animais que chegaram a óbito foi anotado e expresso como percentual do número total de animais injetados. A determinação da DL50 foi feita através de interpolação logarítmica, onde foram plotados no eixo das ordenadas os valores dos próbitos correspondentes ao percentual de mortes e no eixo das abcissas as doses da substância em estudo. Por ocasião da determinação da DL50 foram observadas e registradas todas as alterações comportamentais visíveis.

Os parâmetros comportamentais observados foram alerta, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, piloereção, ptose, dispnéia, micção e morte.

### **3.4- Atividade antinociceptiva**

Estudos sobre comportamento doloroso em laboratório geralmente utilizam ratos e camundongos. Os métodos usados nestes estudos são direcionados especialmente para a detecção de diferentes modalidades de dor através da variação dos tipos de estímulos, sua localização ou intensidade (Franklin e Abbott, 1989).

Os testes de atividade antinociceptiva tiveram como finalidade, avaliar o efeito do eugenol administrado via oral sobre a indução da dor. Foram utilizados modelos de nocicepção térmica e química. Os testes foram usados para distinguir entre as seguintes hipóteses: se o eugenol possui capacidade de inibir nocicepção por mecanismos centrais, periféricos ou inflamatórios.

#### **3.4.1- Determinação do efeito antinociceptivo do eugenol no teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético**

Dentre os vários modelos de dor visceral, o teste das contorções abdominais tem sido usado como método de ilustração padrão para avaliação de drogas com atividade

analgésica (Abdollahi *et al.*, 2003). Inúmeras substâncias podem desencadear contorções e o ácido acético é uma delas (Collier *et al.*, 1968). O ácido acético produz uma dor indireta, como resultado de uma inflamação aguda do peritônio (Gyres e Knull, 1975).

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é realizado através da injeção intraperitoneal dessa substância nóxica e irritante em ratos ou camundongos. Logo após a administração do ácido acético os animais apresentam uma resposta nociceptiva que consiste na formação de uma onda de constrição e alongamento que passa caudalmente pela parede abdominal, podendo ser acompanhado por torcedura do tronco seguida por extensão dos membros posteriores (Siegmund *et al.*, 1957).

No teste das contorções ambos os efeitos analgésicos, centrais e periféricos, podem ser detectados, mas devido a inespecificidade, cautela é necessária para a interpretação dos resultados, é importante que outros testes sejam desenvolvidos para confirmação de dados (Vogel e Vogel, 1997).

Muitos mediadores tais como as cininas, a acetilcolina, a SP e as prostaglandinas participam na transmissão da nocicepção proveniente das vísceras (Vogel e Vogel, 1997). Drogas anti-inflamatórias não esteroidais, como a indometacina, alguns inibidores da monoaminoxidase, antioxidantes, e outros, inibem a síntese endógena de prostaglandinas induzidos por ácido acético, inibindo assim as contorções abdominais (Deraedt *et al.*, 1976 e 1980). Foi também relatada a participação do sistema simpático nas contorções abdominais através da liberação de aminas, como a dopamina (Duarte *et al.*, 1988).

A metodologia utilizada seguiu o modelo proposto por Vander Wende e Morgolin (1956) para ratos e modificada por Koster e colaboradores (1959) para camundongos. As contorções abdominais foram induzidas por administração intraperitoneal de 0,1 ml/10g de peso de ácido acético 0,6% (v/v). Em seguida, foi realizada a contagem do número de contorções abdominais durante 20 min, sendo iniciada a contagem 10 min após a injeção do ácido acético.

Uma hora antes da avaliação, os animais do grupo controle receberam, via oral, solução salina contendo Tween 80 0,1% (veículo) e os animais dos grupos tratados receberam diferentes doses de eugenol (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 mg/kg). Como controle positivo foi utilizada indometacina (10 mg/kg, i.p.), aplicada 30 minutos antes da injeção do ácido acético.

### **3.4.2- Determinação do efeito antinociceptivo do eugenol no teste da formalina**

O teste da formalina é um modelo de dor no qual é possível avaliar a resposta do

A segunda fase do teste da formalina parece ser um modelo de sensibilização central uma vez que pode ser contraposta por antagonista de receptores NMDA e porque neurônios do corno dorsal exibem propriedades associados com sensibilização central quando registrado durante essa fase da resposta da formalina (Beirith *et al.*, 1998).

O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Dubuisson e Dennis (1977) e Shibata e colaboradores (1989), com algumas modificações. O teste foi realizado à temperatura ambiente de 22 a 24 °C, na ausência de fatores experimentais que pudessem afetar o fluxo sanguíneo periférico, devido à grande sensibilidade da resposta da fase tardia.

Foi aplicado, na pata contralateral direita do camundongo, formalina (20 µl de solução 2,5%, v/v), e logo após a injeção da formalina os animais foram colocados individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), ao lado de espelhos, que serviram para facilitar a observação. Foi registrado em cronômetro o tempo, em segundos, que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante as fases inicial (0-5 min após aplicação da formalina) e tardia (15-30 min após aplicação da formalina) (Tjolsen *et al.*, 1992).

Uma hora antes da avaliação, os animais do grupo controle receberam, via oral, solução salina contendo Tween 80 0,1% (veículo) e os animais dos grupos tratados receberam diferentes doses de eugenol (0,1; 1; 3; 10; 30; 100; 300 mg/kg, v.o.). A solução de morfina (10 mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo para o teste.

### **3.4.3- Determinação do efeito antinociceptivo do Eugenol no teste da placa quente**

O teste da placa quente foi proposto por Woolfe e MacDonald, 1944, e modificado por Carlini, 1993. Este teste é um modelo de dor muito sensível às drogas que atuam centralmente como a morfina e seus derivados sendo baseado no estímulo fásico de alta intensidade. Este teste pode, portanto, ser utilizado com o intuito de confirmar a relevância do componente central no mecanismo de ação de uma dada substância (Tjolsen *et al.*, 1992; Eddy e Leimback, 1953).

O teste consiste em colocarmos o camundongo sobre uma superfície aquecida a uma temperatura constante de  $55 \pm 1^{\circ} \text{C}$  e registramos o tempo que o animal apresenta uma resposta, medida em segundos. A resposta ao estímulo térmico resulta no ato de morder ou lamber e/ou saltar. Estes componentes comportamentais estão relacionados a respostas supraespinhais (Le Bars *et al.*, 2001). Os animais utilizados no teste foram submetidos a um pré-teste no dia anterior e aqueles que apresentaram uma resposta nociceptiva no intervalo de 8 a 12 segundos foram selecionados para o teste.

O grupo controle recebeu solução salina contendo Tween 80 0,1% (veículo) via oral, enquanto os grupos experimentais receberam eugenol nas doses 1; 10; 100 mg/kg. Após a administração destas soluções, os animais foram colocados na placa pré-aquecida e em intervalos de 30 min até 210 min após o início do teste. O tempo máximo de permanência sobre a placa não excedeu 30 s para prevenir possíveis danos teciduais.

### **3.5- Determinação da influência do eugenol na regulação da temperatura corporal**

A fim de avaliar possíveis alterações sobre a temperatura corporal induzidas pelo eugenol (1; 3; 10; 30; 100; 300 mg/kg, v.o.), foi mensurada a temperatura retal, em graus centígrados, antes e 1h após a aplicação das citadas doses do eugenol. Para tal foi utilizado um termômetro de precisão encapsulado por epox e protegido por uma haste de aço inoxidável. A haste, anexada a um mostrador digital, (Harvard, Soutw Natik, MA, USA) foi introduzida 2 cm, no reto do camundongo.

### **3.6- Atividade antiedematogênica**

### **3.6.1- Determinação do efeito anti-edematogênico do Eugenol no edema de pata induzido por carragenina**

No edema de pata induzido por carragenina, os camundongos foram pré-tratados com eugenol nas doses de 30 e 300 mg/kg ou veículo (tween 80 em solução salina), 1 hora antes de receber a injeção de 50 µl de carragenina (300 µg/pata) na região subplantar da pata traseira do animal. Após a aplicação, o volume (µl) da pata é determinado pelo pletismômetro nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 minutos (Katz *et al.*, 1984; Lo *et al.*, 1982).

### **3.6.2- Determinação do efeito anti-edematogênico do Eugenol no edema de pata induzido por dextrana**

Para avaliação da atividade antiedematogênica, neste modelo utilizamos ratas Wistar fêmeas, que receberam via oral eugenol nas doses de 30 e 300 mg/kg ou veículo (0,1% tween 80 em solução salina), 1 hora antes da injeção subplantar de 0,1 ml de dextrana (300 µg/pata). Nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos após a injeção do agente flogístico medimos o volume das patas (Katz *et al.*, 1984; Lo *et al.*, 1982).

## **3.7-Análise Estatística**

Os resultados foram aqui apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, onde (n) representa o n<sup>o</sup> de experimentos. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência de hipótese de nulidade menor do que 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação das médias foram utilizados testes de análise de variância entre grupos (ANOVA) e testes não paramétricos.

## **IV – RESULTADOS**

### **4.1- Toxicidade aguda do Eugenol**

A toxicidade aguda do eugenol foi de 1173,33 mg/kg.

## **4.2- Avaliação do efeito do Eugenol em modelos de nocicepção**

### **4.2.1- Efeito do Eugenol no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

A figura 1 apresenta os resultados do efeito do Eugenol, administrado por via oral, no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

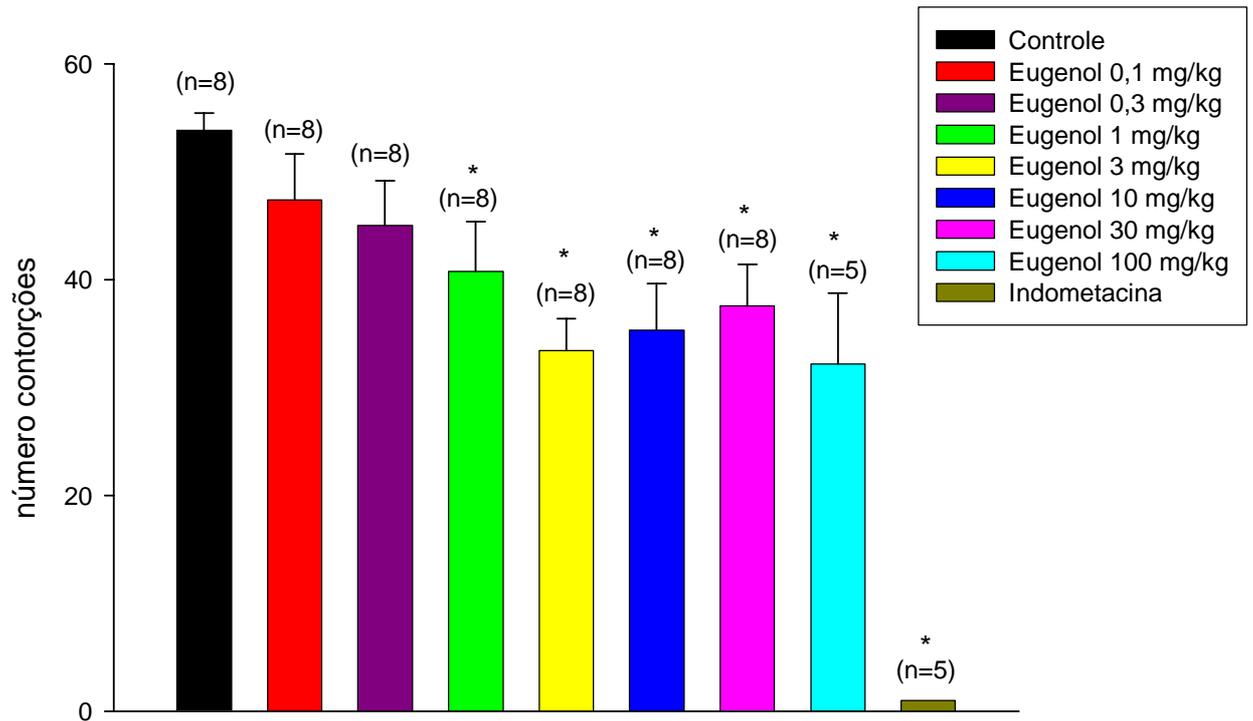
O Eugenol, nas doses de 0,1 e 0,3 mg/kg, não apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg, o Eugenol apresentou atividade antinociceptiva, que não se mostrou dose-dependente, promovendo uma redução significativa ( $p < 0,05$ , teste t) no número de contorções abdominais, que foi de  $53,8 \pm 1,5$  no grupo controle. O Eugenol alcançou redução máxima na dose de 3 mg/kg (39% em relação ao controle), para as doses de 1, 10, 30 e 100 mg/kg as reduções foram, respectivamente, de 26%, 35%, 31% e 31% em relação ao grupo controle.

A indometacina (10 mg/kg), droga que bloqueia a síntese de prostaglandinas, aqui utilizada como controle positivo, diminuiu em aproximadamente 99% o número de contorções abdominais em relação ao controle ( $p < 0,05$ , Boferroni T- test).

	600 mg/Kg	1500 mg/Kg	3000 mg/Kg
Diminuição da atividade motora espontânea	-	4	6
Sedação	-	4	6
Piloereção	-	3	6
Dispneia	-	2	3
Ptose	-	-	3
Micção	-	-	-
Morte	-	1	6

TABELA 1: Parâmetros comportamentais observados para determinação da toxicidade aguda

## Efeito do eugenol no teste das contorções abdominais



**FIGURA 1:** Efeito antinociceptivo do Eugenol, administrado por via oral, no teste das contorções abdominais induzidas ácido acético. As colunas representam a média do número de contorções e as barras verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle.

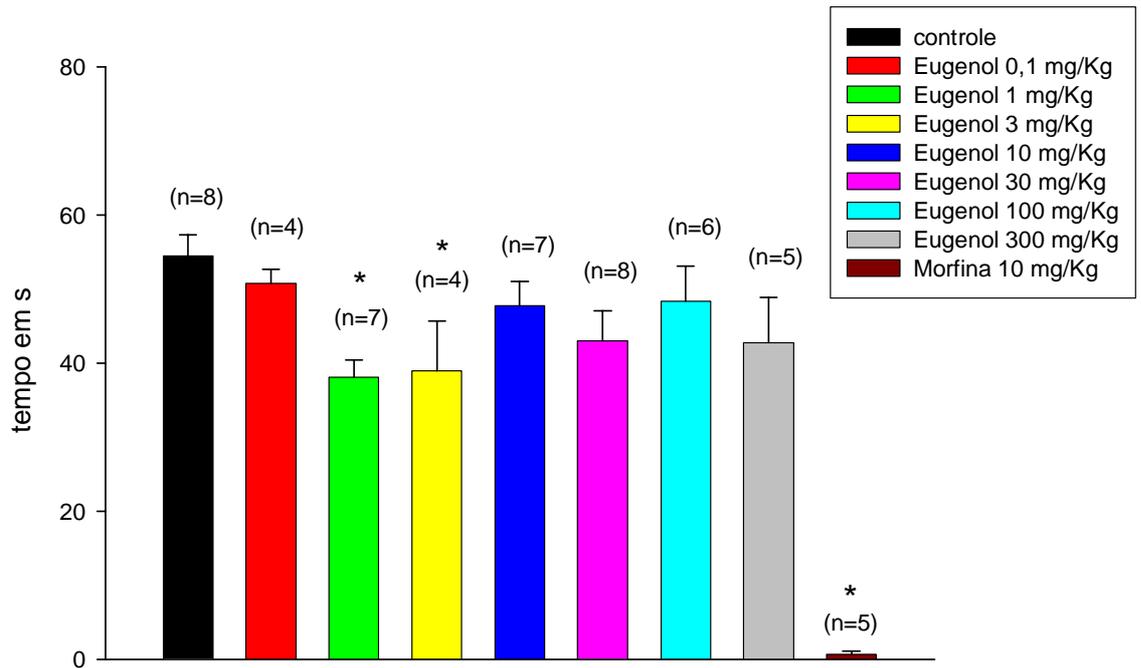
#### 4.2.2 – Efeito do Eugenol no teste de nocicepção induzida por formalina

Os resultados apresentados na figura 2 mostram que o Eugenol administrado por via oral, 60 minutos antes do teste, causou inibição significativa ( $p < 0,05$ , teste t) da dor característica da primeira fase do teste de formalina (fase neurogênica) nas doses de 1 e 3 mg/Kg, diminuindo em 31% e 29%, respectivamente, o tempo em que o animal passou lambendo a pata, que foi de  $54,5 \pm 2,7$  s no grupo controle.

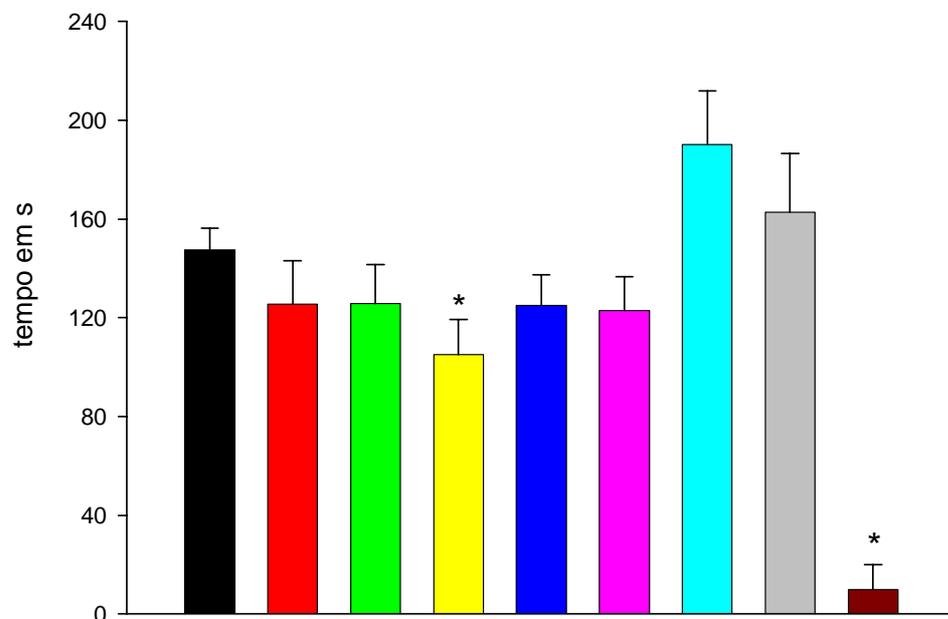
Na segunda fase (dor inflamatória) somente com a dose de 3mg/kg o Eugenol foi capaz de reduzir de forma significativa ( $p < 0,05$ , teste t) a dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, diminuindo em 29% o tempo em que o animal passou lambendo a pata, que foi de  $147,9 \pm 8,9$  s no grupo controle.

A morfina, droga de referência utilizada neste teste como controle positivo na dose de 10 mg/kg, causou inibição de 98 % e 94 % respectivamente na primeira e segunda fases do teste da formalina.

## Efeito do eugenol na primeira fase do teste da formalina



## Efeito do eugenol na segunda fase do teste da formalina



**FIGURA 2:** Efeito antinociceptivo do Eugenol, aplicado por via oral, no teste formalina. Ordenada, tempo gasto (em segundos) pelos animais lambendo a pata. As colunas representam a média do tempo de lambida da pata e as barras verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle.

#### **4.2.3- Efeito do Eugenol no teste da placa quente**

Conforme resultados apresentados na figura 3, o Eugenol administrado por via oral, na dose de 100 mg/kg causou aumento do tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente nos tempos de 90 e 120 minutos aumentando o tempo de resposta, respectivamente, de  $11,6 \pm 0,6$  s e  $10,6 \pm 0,4$  s, no grupo controle, para  $17,5 \pm 1,5$  s e  $20,1 \pm 2,4$  s, no grupo experimental.

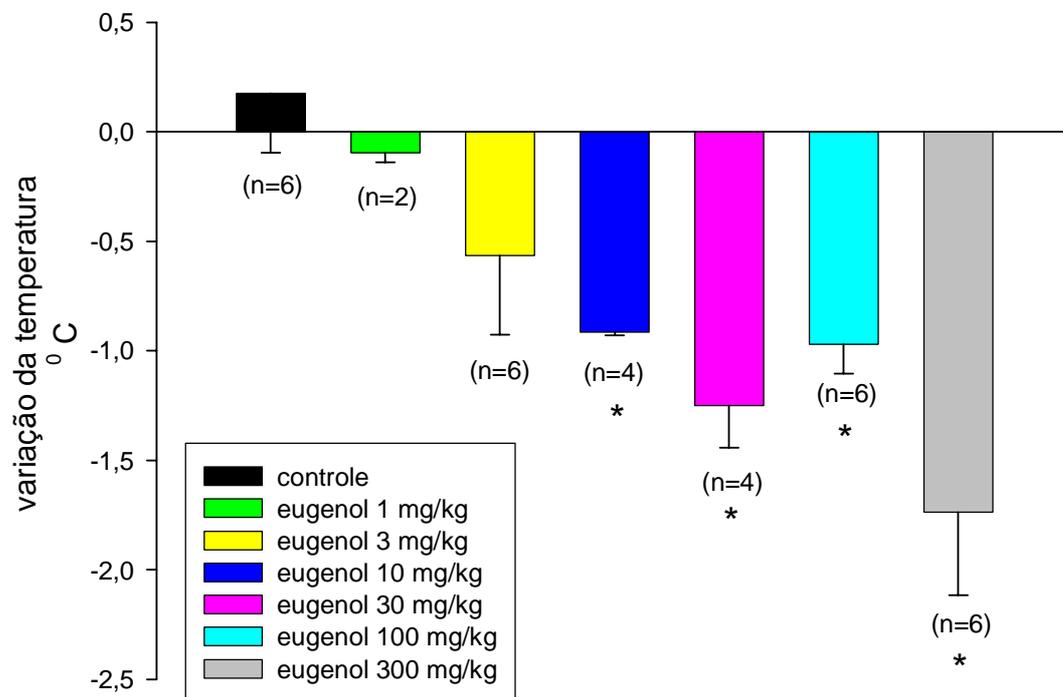
#### **4.3– Efeito do Eugenol no teste da temperatura corporal**

Conforme os dados apresentados na figura 4, os animais tratados com Eugenol, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, apresentaram uma redução na temperatura corporal quando comparado com o grupo controle. No grupo controle a variação de temperatura 1 h após o tratamento com tween 0,1 % foi de  $0,17$  °C, já nos grupos experimentais a variação de temperatura, após 1 h de tratamento com Eugenol, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, foi, respectivamente, de  $-1,2$  °C;  $-0,9$  °C;  $-1,7$  °C.

## Efeito do Eugenol no teste da placa quente

tempo (min)

### Efeito do eugenol sobre a temperatura retal



**FIGURA 4:** Efeito do Eugenol aplicado por via oral, sobre a variação da temperatura corporal. Ordenada, variação da temperatura 1h após o tratamento. As colunas representam a média da variação da temperatura e as barras verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle

#### **4.4- Avaliação do efeito do Eugenol em modelos de edema**

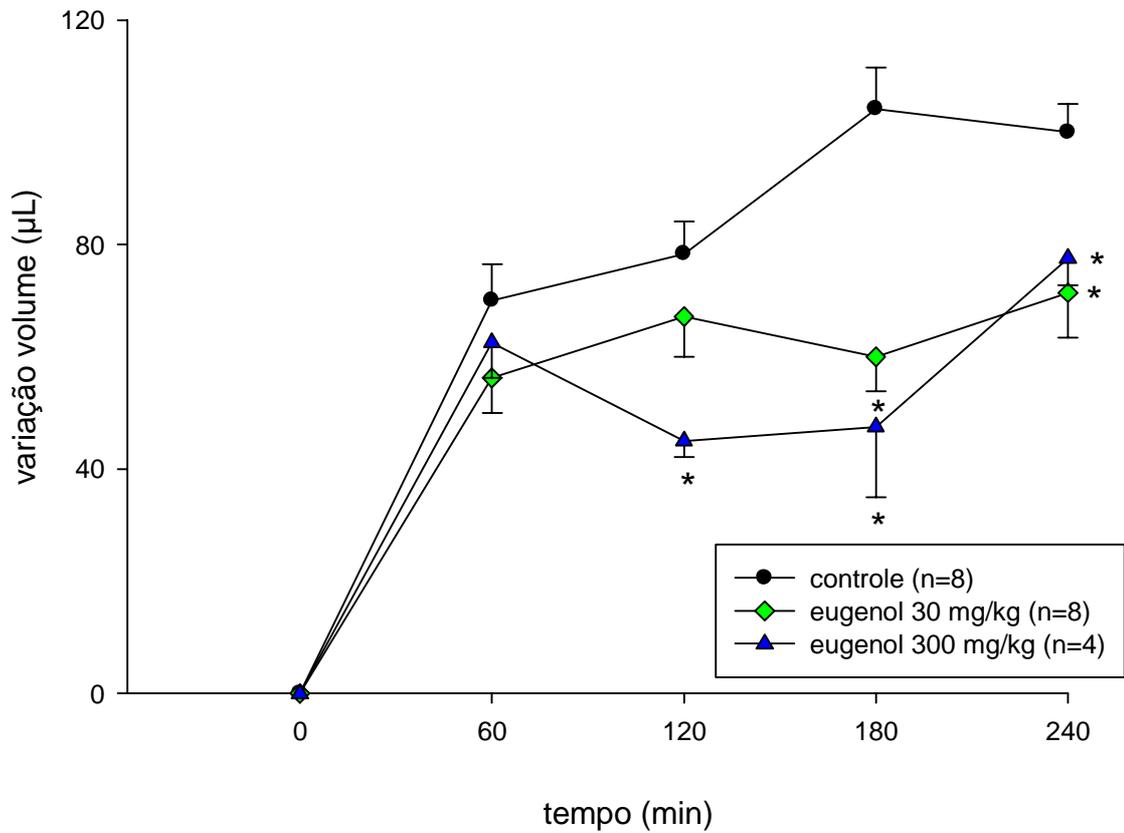
##### **4.4.1- Efeito do Eugenol no modelo de edema de pata induzido por carragenina**

De acordo com os resultados apresentados na figura 5, a administração oral de Eugenol reduziu de maneira significativa o volume do edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina. No grupo controle os volumes de edema de pata foram de  $78,3 \pm 5,7 \mu\text{L}$ ,  $104,1 \pm 7,4 \mu\text{L}$  e  $100,0 \pm 5,0 \mu\text{L}$ , respectivamente nos tempos de 120, 180 e 240 minutos. O pré-tratamento com Eugenol na dose de 300 mg/Kg reduziu significativamente o volume de edema para  $45,0 \pm 2,8 \mu\text{L}$ ,  $47,5 \pm 12,5 \mu\text{L}$  e  $77,5 \pm 4,7 \mu\text{L}$  respectivamente nos tempos de 120, 180 e 240 minutos, reduções equivalentes a 42,5 %, 54,3 %, 22,5 % ( $p < 0,05$ , teste T). O pré-tratamento com Eugenol na dose de 30 mg/Kg reduziu significativamente o volume de edema para  $71,4 \pm 7,9 \mu\text{L}$ , no tempo de 240 minutos, redução equivalente a 28,6 % ( $p < 0,05$ , teste T).

##### **4.4.2- Efeito do Eugenol no modelo de edema de pata induzido por dextrana**

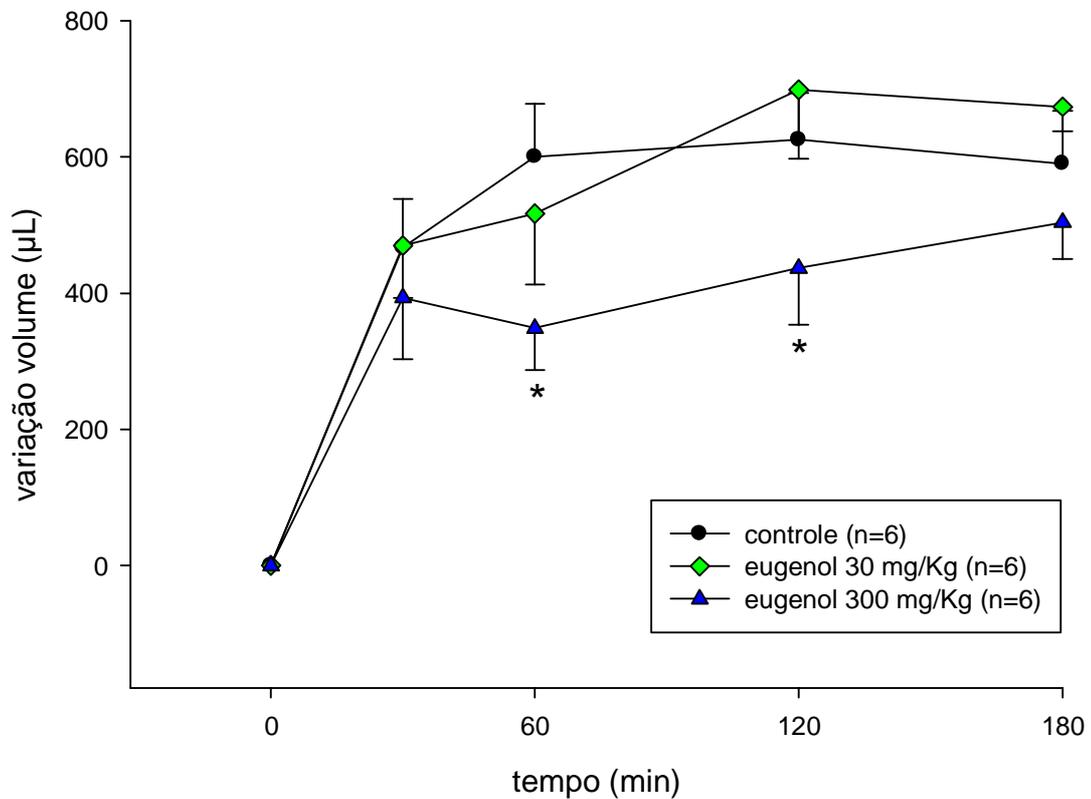
Conforme apresentado na figura 6, a administração oral de Eugenol reduziu de maneira significativa o volume do edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de dextrana. No grupo tratado com Eugenol 300 mg/Kg o volume do edema foi reduzido significativamente, respectivamente nos tempos de 60 e 120 min, de  $600,0 \pm 77,7 \mu\text{L}$  e  $625,0 \pm 68,3 \mu\text{L}$  no grupo controle para  $348,3 \pm 61,0 \mu\text{L}$  e  $436,6 \pm 82,7 \mu\text{L}$  no grupo experimental, uma redução equivalente, respectivamente, a 42 % e 30 % ( $p < 0,05$ , teste T).

## Efeito do eugenol no edema de pata induzido por carragenina



**FIGURA 5:** Efeito antiedematogênico do Eugenol, aplicado por via oral, no edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina. Abscissa, tempo decorrido em minutos após a injeção de carragenina; ordenada, variação do volume da pata em  $\mu\text{L}$ . Os pontos representam a média da variação do volume da pata direita após a injeção intra-plantar de carragenina e as barras verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle.

## Efeito do eugenol no edema de pata induzido por dextrana



**FIGURA 6:** Efeito antiedematogênico do Eugenol, aplicado por via oral, no edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de dextrana. Abscissa, tempo decorrido em minutos após a injeção de dextrana; ordenada, variação do volume da pata em  $\mu\text{L}$ . Os pontos representam a média da variação do volume da pata direita após a injeção intra-plantar de carragenina e as barras verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle.

## V – DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido desenvolvidos em grandes centros de pesquisa, no intuito de descobrir e comprovar as atividades biológicas e farmacológicas dos constituintes oriundos de vários óleos essenciais de plantas utilizadas na medicina popular. Dentre estes constituintes de óleos, o derivado fenólico 4-alil-2-metoxifenol, designado Eugenol, conhecido comumente como essência de cravo, talvez seja o mais estudado desde o início do século passado até os últimos anos (Bonastre, 1967). O grande interesse em estudá-lo talvez se deva a seus diversos efeitos farmacológicos comprovados e à sua baixa toxicidade (Dundee, 1971; Huang *et al.*, 1990; Leal-Cardoso *et al.*, 2002).

Neste trabalho apresentamos os resultados oriundos da avaliação das atividades antinociceptiva e antiedematogênica do Eugenol, bem como seu efeito sobre a temperatura corporal, quando administrado por via oral.

Os resultados obtidos em três diferentes modelos experimentais de nocicepção (teste das contorções abdominais, teste da formalina e teste da placa quente) por nós utilizados indicam que o Eugenol apresenta uma significativa atividade antinociceptiva. A propriedade anti-inflamatória do eugenol foi também detectada através da inibição do edema de pata induzido por carragenina e dextrana, um método farmacológico padrão de avaliação do efeito anti-edematogênico de produtos naturais (Vinergar *et al.*, 1969).

Avaliamos a toxicidade aguda do Eugenol através da DL50, que é um dos parâmetros tradicionais mais valiosos para a verificação desse tipo de toxicidade. A DL50 para o Eugenol foi de cerca de 1,2 g/kg. Vale ressaltar que as doses que apresentaram efeito antinociceptivo, anti-edematogênico, bem como redutor da temperatura corporal encontram-se bem abaixo da dose tóxica, configurando um grande índice terapêutico desta substância. É importante ainda lembrarmos que a determinação da toxicidade aguda foi realizada por via oral. Esta é a via preferida para a administração de medicamentos por ser mais cômoda para o paciente além de ser economicamente mais viável. Além do que a maioria da população faz largo uso de medicamentos “caseiros” através da utilização de chás.

Iniciamos nosso estudo utilizando o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este modelo abrange diferentes mecanismos nociceptivos tais como sistema simpático (liberação de aminas biogênicas), via da cicloxigenase e seus metabólitos (Duarte *et al.*,1988) bem como mecanismos opióides (Collier *et al.*,1968). O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos, tem se mostrado bastante eficiente na avaliação do efeito antinociceptivo (Vaz *et al.*,1996; Viana *et al.*, 2000; Moore *et al.*,1991; Rabelo *et al.*,2003; Carvalho *et al.*,1996). Além disso, este teste possibilita após uma adaptação correlacionar valores de doses efetivas obtidas em roedores e doses analgésicas em humanos (Dubinsky *et al.*, 1987). Embora o teste das contorções abdominais não apresente especificidade, possui a vantagem de ser sensível, permitindo a detecção mesmo de analgésicos fracos. Este modelo permite avaliar a atividade de substâncias que atuam principalmente a nível periférico, mas pode detectar também aquelas que atuam a nível central, sendo valioso para uma investigação antinociceptiva abrangente (Deraedt *et al.*, 1980; Le Bars *et al.*, 2001).

O Eugenol diminuiu significativamente as contorções abdominais nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg, apresentando redução máxima de 39% em relação ao controle, na dose de 3 mg/kg. Tal resultado aponta para uma ação anti-inflamatória periférica do eugenol. Este pode agir sobre a via de síntese de prostaglandinas uma vez que o ácido acético, aplicado intraperitonealmente, provoca a biossíntese e a liberação de consideráveis amostras de prostaglandinas e cininas no fluido peritoneal (Northover, 1963; Gyres e Knull, 1975; Deraedt *et al.*, 1976; Franzotti *et al.*,2002). Esses dados corroboram com achados vistos na literatura, onde Anamura e colaboradores em 1988, demonstraram que o efeito analgésico do Eugenol em terapias endodônticas poderia resultar de sua ação inibitória sobre o metabolismo do ácido araquidônico.

Uma vez que a dor visceral induzida pela injeção de ácido acético caracteriza-se como uma dor de origem inflamatória, pode ser prevenida através do tratamento com fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais. Tais constatações foram aqui reforçadas, uma vez que a indometacina (10 mg/kg), droga analgésica e anti-inflamatória não esteroideal, reduziu em aproximadamente 99% o número de contorções abdominais em relação ao controle. Este dado é condizente com o relatado por Heapy e colaboradores em 1993.

O uso de diferentes testes nociceptivos é útil na detecção e revelação da verdadeira atividade antinociceptiva, uma vez que podem existir atividades falso-positivas,

onde agentes que não são considerados analgésicos, na realidade apresentam tal função (Loux *et al.*, 1978).

Dentro deste contexto, outro modelo experimental aqui utilizado foi o teste da formalina. A injeção intraplantar de formalina age como um estímulo nóxico e induz a uma dor difusa, moderada e de longa duração que possui profunda conexão com uma injúria tissular, o que faz deste teste um válido modelo de dor clínica. Este teste é útil não somente para avaliar drogas analgésicas, mas também para elucidar mecanismos de dor e analgesia. Tem sido ainda postulado que a dor periférica mediada pela formalina pode ser análoga à dor humana pós-operatória (Abbott e Franklin, 1986). Após a injeção de formalina na pata o comportamento nociceptivo pode ser dividido em duas fases, uma resposta rápida (primeira fase) e uma resposta tardia prolongada (segunda fase) (Dubuisson e Dennis, 1977; Heapy *et al.*, 1987).

Neste modelo o Eugenol também foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela injeção intraplantar do agente nóxico, confirmando sua ação antinociceptiva; no entanto, este efeito só foi confirmado para baixas doses. Na primeira fase do teste, que evoca um quadro doloroso devido a estimulação direta dos nociceptores e ativação predominante das fibras C, o Eugenol apresentou efeito nas doses de 1 e 3 mg/kg, o que, de certa forma corrobora com resultados apresentados na literatura onde o Eugenol, em baixas concentrações, é um inibidor da atividade nervosa de forma reversível. Além disto, também já foi demonstrado que a aplicação de baixas concentrações de Eugenol em polpa dentária apresenta efeito analgésico na dor mediada através de fibras C (Ozeki, 1975; Kozam, 1977).

Com relação a segunda fase do teste da formalina o Eugenol apresentou efeito antinociceptivo somente na dose de 3 mg/kg. Embora a segunda fase da formalina seja, assim como as contorções abdominais induzidas por ácido acético, resultado de uma dor inflamatória, o Eugenol não foi capaz de apresentar o mesmo efeito encontrado no teste das contorções para doses equivalentes. Estes dados parecem contraditórios, no entanto é importante ressaltar que alguns dos mediadores inflamatórios liberados na segunda fase do teste da formalina não são os mesmos liberados no teste das contorções abdominais. Outro aspecto a ser considerado é que, além das respostas inflamatórias locais, a segunda fase da formalina relaciona-se com processos na coluna espinhal induzidos pela primeira fase, sendo também um modelo de sensibilização central, envolvendo especialmente receptores NMDA (Dickenson e Sullivan, 1987; Hunskaar e Hole, 1987; Brown *et al.*, 1968).

Outro modelo experimental de dor é o teste da placa quente, que se caracteriza por apresentar respostas de curta duração frente a estímulos físicos de alta intensidade (Gyres e Torma, 1984). A atividade analgésica no teste da placa quente é mediada supraespinhalmente e pode ser causada pela inibição da síntese de PG. A atividade nocicepiva central pode ser avaliada através deste modelo térmico embora este mecanismo térmico seja pobremente compreendido (Jain *et al.*, 2001; High, 2001; Brochet *et al.*, 1986). O teste da placa quente também é bastante utilizado para a avaliação ou comparação de agentes analgésicos. Este teste, assim como o teste das contorções nos possibilita ainda indicar a ação do eugenol na dor aguda (Yeh, 1985; Silva *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 1977; Bighetti *et al.*, 1999; Tita *et al.*, 2001). Quando utilizamos o teste da placa quente em torno de 50 °C ou abaixo desse valor apesar de se ter um aumento na variabilidade dos resultados, o que dificulta a análise estatística podemos identificar analgésicos mais fracos ou menos potentes, tais como o ácido acetil salicílico e o acetaminofen (Edd e Leimback, 1953; Le Bars *et al.*, 2001). Por outro lado, temperaturas superiores a 50 °C detectam substâncias com efeito central. Apesar de ser considerado um teste sensível a analgésicos que agem a nível central o teste da placa quente é um modelo animal que além de avaliar a atividade de fármacos opióides, também demonstra atividades para outras drogas de efeito central, tais como sedativos e hipnóticos (Le Bars *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 1982).

Os achados desse estudo demonstraram que o eugenol administrado por via oral inibiu significativamente a nocicepção induzida por estímulo térmico e que portanto, o mesmo pode apresentar efeitos a nível de sítios centrais, sejam na medula espinhal e/ou em níveis mais altos no sistema nervoso central.

Tendo em vista que a aplicação intracerebroventricular do eugenol causa efeito hipotermizante decidimos avaliar seu comportamento quando aplicado via oral e percebemos que ele apresentou significativa ação redutora sobre a temperatura corporal nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg. Para nós não foi surpresa observar uma redução na temperatura corporal dos animais tratados com eugenol, já que o eugenol parece agir periféricamente a nível de mediadores inflamatórios, principalmente prostaglandinas, e estas por sua vez, juntamente com histamina, bradcinina e leucotrienos, estão relacionadas a estados febris (Brune e Alpermann, 1983).

Embora não tenhamos desenvolvido modelo de febre, sabendo que a febre está relacionada a produção de mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas, e cientes de

que o eugenol promove uma diminuição da síntese de prostaglandinas e efeito de redução da temperatura corporal podemos supor que ele poderia ser utilizado como antipirético (Akio *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 2005). Tais resultados corroboram com outros achados anteriormente descritos na literatura, onde o eugenol teve potente ação antipirética, quando aplicado central e periféricamente, revertendo totalmente a febre, enquanto o acetaminofen só reduziu a febre em 68% para doses equivalentes (Feng e Lipton, 1987).

Está clara a íntima relação entre a dor e processos inflamatórios. A liberação de mediadores tais como prostaglandinas e leucotrienos exercem papel fundamental na gênese dos sinais e sintomas do processo inflamatório. Em diferentes tipos de inflamação alguns mediadores possuem ação mais proeminente do que outros, esses mediadores uma vez liberados, podem interferir em diversos mecanismos celulares, desenvolvendo sinais e sintomas da inflamação, e8.5(4 d.6(8.5(4r15.5(n.5(ção)-2hi38(e)2.05289i)16.8.5(m))-2.3(fg)-20(ie0:0923

O edema induzido por carragenina se caracteriza pela liberação de histamina e serotonina em tecidos injuriados (Van Wauve e Goosens, 1989) e ao contrário do edema induzido por dextrana induz a formação de um exudato rico em proteínas e com um largo número de neutrófilos (Lo *et al.*, 1982). Em particular, a resposta imune para injeção intraplantar de carragenina envolve a ativação de macrófagos residentes, células mastocitárias e células endoteliais, que resultam em liberação de um número de citocinas pró-inflamatórias e mediadores (incluindo TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, e óxido nítrico). Neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas da circulação para a pata inflamada. Neutrófilos alcançam o pico de 1 ½ a 3 h após a aplicação da carragenina e o período de influxo de neutrófilos é seguido por um período de influxo de macrófagos (Cunha *et al.*, 1991, 1992, 2005; Leung *et al.*, 2001; Sampson, 2000; Walker *et al.*, 2005).

O Eugenol apresentou significativa redução do edema induzido por carragenina no tempo de 180 minutos, tempo este, que coincide com o pico do edema e onde há predominância de síntese de prostaglandinas (feito característico da segunda fase) (Brito e Antônio, 1998). Estes achados nos levam a hipotetizar que o efeito anti-edematogênico do Eugenol possa está relacionado à inibição da liberação e/ou ação das prostaglandinas, reforçando as conclusões obtidas com os resultados apresentados pelo Eugenol nos teste nociceptivos.

É conhecido que nos locais da inflamação existem altas concentrações de radicais livres e substâncias oxidantes que apresentam importante envolvimento em diferentes processos inflamatórios. Portanto, componentes anti-oxidantes podem ser coadjuvantes na finalização do processo inflamatório (Salvemini *et al.*, 1996). Apresentando, pois o eugenol atividade anti-oxidante, talvez possamos hipotetizar que seu efeito anti-inflamatório revelado através de seu anti-edematogênico também se deva , pelo menos em parte à sua atividade anti-oxidante (Ito *et al.*, 2005).

É bem estabelecido que dextrana e a carragenina, modelos de inflamação (Brito e Antônio, 1998) induzem ao edema de pata em roedores por mecanismos diferentes. A dextrana é um polissacarídeo de alto peso molecular que produz uma reação anafilática após sua injeção nas extremidades em ratos e camundongos e o edema neste modelo é uma consequência da liberação de histamina e serotonina das células mastocitárias (Rowley e Benditt, 1956); percebe-se ainda um acúmulo de fluidos, devido a degranulação de mastócitos, com poucas proteínas e alguns neutrófilos (Lo *et al.*, 1982).

A histamina é uma amina básica relacionada a processos alérgicos e inflamatórios, causando dentre vários efeitos vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sendo considerada um dos principais mediadores do edema de pata induzido por dextrana (Rang *et al.*,2001). Correlacionando estes aspectos com os resultados apresentados pelo Eugenol no edema de pata induzido por dextrana pode-se sugerir que o Eugenol seja capaz de inibir a liberação de histamina dos mastócitos, indicando que este monoterpene pode apresentar efeito estabilizador da membrana das células mastocitárias (Ortner e Chignell, 1981). Estes resultados foram condizentes com os achados de Kim e colaboradores, 1997, onde se percebeu que o eugenol inibiu a degranulação de mastócitos prevenindo reação anafilática além de inibir a liberação de histamina de células mastocitárias *in vivo e in vitro*.

Os resultados aqui apresentados não são suficientes para afirmar que o Eugenol possa ser usado, por via oral, como agente antinociceptivo e/ou anti-edematogênico. No entanto, nossos dados corroboram e estendem com dados encontrados na literatura que apontam o Eugenol como uma opção terapêutica para ser usada na clínica de dor e inflamação.

## VI- CONCLUSÕES

1. Os dados obtidos neste estudo mostraram que o Eugenol, administrado por via oral, apresenta baixa toxicidade.
2. O Eugenol demonstrou atividade antinociceptiva periférica sobre a dor inflamatória, uma vez que diminuiu o número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético e pela injeção intraplantar de formalina na fase tardia do teste. Apresentou ainda ação antinociceptiva com relação a dor de origem neurogênica, inibindo de forma significativa a dor característica da primeira fase da formalina.
3. O Eugenol pode ter efeitos em sítios centrais, uma vez que aumentou o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente.
4. Foi observado ainda, que o Eugenol proporcionou uma redução da temperatura corporal, o que nos leva a propor uma futura avaliação sobre a sua utilização em estados febris.
5. Com relação ao efeito antiedematogênico, o Eugenol pode apresentar esta característica devido a uma possível atividade sobre a liberação de histamina e/ou sobre a ação e/ou síntese de prostaglandinas.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacology Biochemical Behavior**, v.24, p. 319-321, 1986.

ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.; LUDWICK, R.J.; MELZACK, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. **Pharmacology, Biochemical and Behavior**, v. 15, p. 631-640, 1981.

ABBOTT, F.V.; MELZACK, R. Brainstem lesions dissociated neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. **Brain Research**, v. 251, p. 149–155, 1982.

ABBOTT, F.V.; MELZACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. **Experimental Neurology**, v.75, p.644-651, 1982.

ABDOLLAHI, M.; KARIMPOUR, H.; MONSEF-ESFEHANI, H.R. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. **Pharmacological Research**, v.48, p. 31-35, 2003.

AKIO, M.; TOMOKI, N.; TATSUO, W.; TAKUYA, O.; NAOTOSHI, M. Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin endogenous pyrogen and prostaglandins. **American Journal of Physiology**, v.254, R633-R640,1988.

AL – HARBI, M.M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M.M.; GIANGRECO, A.B. AND SHAH, A.H. Influence of anethole treatment on the tumor induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. **European Journal of Cancer Prevention**. v.4, p. 307 – 318, 1995.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: Na efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v.12, p.225-234, 1999.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways. **Brain Research**, v.1000, p. 40 – 56, 2004.

ALREJA, M.; MUTTALIK, P; NAYAR, U.; MANCHANDA, S.K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. **Pain**, v.20, p. 97-105, 1984.

AMONKAR, A.J.; NAGBHUSHAN, M.; D' SOUZA, A.V.; BHRIDE, S.V. Hydroxychavicol: a new phenolic antimutogen from betel leaf. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24(12), p. 1321-4, 1986.

ANAMURA, S.; DOHI, T.; SHIRAKAWA, M.; OKAMOTO, H.; TSUJIMOTO, A. Effects of phenolic dental medicaments on prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit kidney medulla. **Archives of Oral Biology**, v. 33, p. 555-560, 1988.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; SATOH, K.; SAKAGAMI, H.; IWAKURA, I.; UEHA, T.; SUGITA, T. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or dimmers. **Anticancer research**, v. 20, p. 2519-2524, 2000.

BASBAUM, A.I; JESSELL, T.M. **Principles of Neuroscience**. McGraw-HILL, New York, 2000.

BEIRITH, A., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S., CRECZYNSKI-PASA, T.B., CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 233-245, 1998.

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

BEVAN, S.; SZOLCSÁNYI, J. Sensory neuron- Specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. **Trends in Pharmacology Science**, v.11, p. 330-333, 1990.

BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leucocyte adhesion molecules. **Annual Review in Immunology**, v.11, p.767-804, 1993.

BHOLE, D.; STAHL, G.L. Therapeutic potential of targeting the complement cascade in critical care medicine. **Critical Care Medicine**, v. 31, p.97-104, 2003.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacology Review**, v. 44, p.1 – 80, 1992.

BIGHETTI, E.J.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; BRITO, A.R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of cróton cajucara Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.1447-1453, 1999.

BISHOP- BAILEY, D.; LARKIN, S.W.; CHEN, G.; MITCHELL, J.A. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in rat aorta in organ culture. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 125-133, 1997.

BLATTEIS, C.M.; SCHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. **News in Physiology Science**, v..12, p.1-9, 1997.

BONASTRE, J.F. De la combinaison des huiles volatiles de girofle...avec les alcalis et autres bases salifiables, **Jornal De Pharmacie**, v.13, p. 464-513, 1967.

BOULANT, J.A. Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: Blatteis, C. (Ed.). *Physiology and Pathophysiology of temperature Regulation*. **World Scientific, Singapore**, p.93-105,1998.

BOULANT, J.A.; DEAN, J.B. Temperature receptors in the central nervous system. **Annual Rev. Physiology**, v.48, p. 639-654, 1986.

BOURNE, K.Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R. Plant products as topical microbicidal candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v. 42, p. 219 – 236, 1999.

BOUTHILLIER, L.; CHARBONNEAU, M.; BRODEUR, J. Assessment of the role of glutathione conjugation in the protection afforded by anethol dithiolthione against hexachloro-1,3-butadiene-induced nephrotoxicity. **Toxicol Applications Pharmacology**, v. 139, p. 177-85, 1996.

BRITO, A.R.M.S.; ANTÔNIO, M.A. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethopharmacology**, v.61, p. 215-228, 1998.

BROCHET, D. MICO, J.A.; MARTIN, P.; SIMON, P. Antinociceptive activity of beta-adrenoceptor agonists in the hot plate test in mice. **Psychopharmacology**, v.88, p. 527-528, 1986.

BRONDIN, P.; ROLD, A. Effects of eugenol on rat phrenic-nerve diaphragm preparations. **Archives Oral Biology**, v. 29, p. 611-615, 1984.

BROWN, J.H.; KISSEL, J.W.; LISH, P.M. Studies on the acute inflammatory response. I. Involvement of the central nervous system in certain models of inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapies**, v.160, p. 231-242, 1968.

BRUNE, K.; ALPERMANN, H. Non-acid inhibition of prostaglandin production, carrageenan oedema and yeast fever. **Agent Actions**, v.13, p.360-363, 1983.

BRUNETON, J. **Terpenoids and steroids. Technique & Documentation-Lavoisier**, 1995.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**, 1996.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

CAMPBELL, D.J. The kallikrein-kinin system in humans. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 1060-1065, 2001.

CAO, Y.Q.; MANTYH, P.W.; CARLSON, E.J.; GILLESPIE, A.M.; EPSTEIN, C.J.H.; BASBAUM, A.I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, v.392, p.390-394, 1998.

CARLINI, E.L.A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1993.

CARLTON, S.M.; HAYES, E.S. Light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. **Journal of Comportamental Neurology**, v. 300, p.162-182, 1990.

CARLTON, S.M.; WESTLUND, K.N.; ZHANG, D.; WILLS, W.D. GABA-immunoreactive terminals synapses on primate spinothalamic tract cells. **Journal of Compartmental Neurology**, v. 322, p.528-537, 1992.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; FILHO, D.S.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferreo* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p. 175-178, 1996.

CESARE, P.E MCNAUGHTON, P.A. Peripheral pain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, p. 493-499, 1997.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p. 217 – 226, 2004.

CHEN, S.J.; WANG, M.H.; CHEN, I.J. Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. **General Pharmacology: the vascular system**, v. 27, p. 629 – 633, 1996.

ÇINAR, N.D.; FILIZ, T.M. Neonatal tharmorregulation, **Journal of Neonatal Nursing**, v.12, p.69-74, 2006.

CLANCY, R.M.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 210, p.93-101, 1995.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction responde and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brazilian Journal of Pharmacy and Chemotherapy**, v. 32, p.295-310, 1968.

COUTURE, R; HARRISSON, M; VIANNA, R.M; CLOUTIER, F. Kinin receptores in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v.429, p.161-176, 2001.

COWAN, A.; PORRECA, F.AND WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluating analgesics, NIDA. **Research Monog** v.95, p.116-122, 1989.

CRAVEIRO, A.C.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos Essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, CE: Edições UFC, 1981.

CRUZ, G.M.P. Efeito do eugenol e do metil eugenol sobre o potencial composto do nervo ciático do rato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Ceará, 2001.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 521, p. 22–39, 2003.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.104, p.765-767, 1991.

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

CUNHA, F.Q.; VERRI JR., W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRO, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Procediments in Natural Academic Science, USA**, v.102, p.1755-1760, 2005.

CURTIS, D.H.; HOSLI, L.; JOHNTON, G.A.R. A pharmacological study of the depression spinal neurons by glycine and related amino acids. **Experimental Brain Research**, v. 6, p. 1-18, 1968.

CURTIS, D.R.; LACEY, G. GABA-B receptor-mediated spinal inhibition. **Neurology Report**, v.5, p.540-542, 1994.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Aesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivates. **Pharmacology**, v. 22, p.113-127, 1981.

DAMIANI, C.E.N.; ROSSONI, L.V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, 40(1), p.56-66, 2003.

DAVIES, D.E.; WICKS, J.; POWELL, R.M. Airway remodeling in asthma: new insights. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 3, p. 215-225, 2003.

DE BIASI, S.; RUTIONI, A. Glutamate and subst P coexixt in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Procediments Natural Academic Science USA**, v.85, p.7820-7824, 1988.

DE FELIPE, C.; HERRERO, J.F.; OBRIEN, J.A.; PALMER, J.A.; DOYLE, C.A.; SMITH, A.J.H.; LAIRD, J.M.A.; BELMONTE, C.; CERVERO, F.; HUNT, S.P. Altered nociception, analgesia and agression in mice lacking the receptor for a substance P. **Nature**, v. 392 p.394-397, 1988.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W. & KEPLER, D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, v.230, p.330-332, 1985.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; BENZONI, J. AND PETERFALVI, M. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Archive International Pharmacodynamic**, v.30, p.224, 1976.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v.61, p.17-24, 1980.

DEWHIST, F. E.; GOODSON, J. M. Prostaglandin Synthetase Inhibition by Eugenol, Guaiacol and Other Dental Medicaments. **Journal of Dental Research**, v.53, p. 104, 1974.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediator of the acute inflammatory resposse induced in rats in differents sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, p. 15-29, 1971.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** , v.23, p. 297-300, 1971.

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

DICKENSON, A.H.; SULLIVIAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. **Pain**, v. 30, p. 349–360, 1987.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M. New concepts on pathogenesis of fever. **Review of Infectious Diseases**, v.10, p.168-169, 1988.

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

DRAY A. E PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurocience**, v.16, p. 99-104, 1993.

DRAY, A. Agonist and Antagonist of nociception. **Proceedings of the 8 th World Congress on Pain**, v. 8, p. 279-312, 1997.

DRAY, A.; URBAN, L. & DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.15, p. 190-197, 1994.

DRUKARCH, B.; SCHEPENS, E.; STOOF, J.C.; LANGEVELD, C.H. Anethole dithiolethione prevents oxidative damage in glutatione- depleted astrocytes. **European Journal Pharmacology** ,v. 329 (2-3), p. 259-262, 1997.

DUARTE, I.D.G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the system in acetic acid – induced writhing in mice. **Brazilin Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.

DUBINSKY, B.; GEBRE-MARIAM, S.; CAPETOLA, R.J.; ROSENTHALE, M.E. The antalgic drugs: human theraphetic correlates of their poteny in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agent Actions**, v. 20, p. 50-60, 1987.

DUBOIS, E.F. Why are fevers over 106 °F rare? **American Journal of Medical Sciences**, v.217, p.361-8, 1949.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p.161-174, 1977.

DUNDEE, J.W. Comparative analysis of intravenous anesthetics. **Anesthesiology.**, v.35, p.137-148, 1971.

ECCLES, J.C.; SCHMIDT, R.F.; WILLIS, W.D. Pharmacological studies on presynaptic inhibition. **Journal of physiology**, v. 168, p. 500-530, 1963.

EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithyienyl-butenylamines and dithyienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapies**, v.3, p.544-547, 1953.

ESCOBAR, R.G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Review Cubana Estomatology**, v.39, 2002.

FENG, J.; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. **Neuropharmacology**, v.26, p.1775-1778, 1987.

FERNANDEZ, H.N.; HENSON, P.M.; OTONI, A. & HUGLI, T.E. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a e C5a leukotrans *in vitro* and under stimulated *in vivo* conditions. **Journal of Immunology**, v.120, p.109-115, 1978.

FRANCIS, A.R.; SHETTY, T.K.; BHATTACHARYA, R.K. Modification of the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and N-methyl-N' nitro-N-nitrosoguanitine by certain phenolic compounds. **Cancer Letter**, v.45, p.177-182, 1989.

FRANKLIN, K.B.J.; ABBOTT, F.V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. **Neuromethods**, v. 13, p. 145-216, 1989.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.F.; RODRIGUES, H.M.S.L.; MOURÃO, R.H.V.; ANDRADE, M.R., ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory analgesic, and toxicity aguda of sida cardiologia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.273-278, 2000.

FRIELD, H.P.; TILL, G.O.; TRENTZ, O. & WARD, P.A. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **American Journal of Phatology**, v.135, p.203-217, 1989.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of Eugenol- related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, p. 39-54, 2002.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.101, p.10-12, 1990.

GENTLE, M.J. Cutaneous sensory afferents recorded from the nervus intramandibularis of *Gallus gallus* var domesticus. **Journal Comp. Physiology**, v.164, p.763 – 774, 1989.

GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; RICCIARDOLO, M. L.; NADEL, J. A. New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. **Canadian Journal of Pharmacology**, v.73, p.843-847, 1995.

GIRALDELO, C.M.; ZAPPELLINI, MUSCARA, M.N.; DE LUCA, I.M.; HYSLOP, S.; CIRINO, G.; ZATZ, NUCCI, R. ;ANTUNES, G.D. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v.257, p. 87-93, 1994.

GREISBACHER, T.; LEGAT, F. J. Effects of FR 173657, a non-peptide B2 antagonist, on kinin – induced and peripheral oedema formation and bronchoconstriction. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.120, p.933 – 939, 1997.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v.81, p.8-11, 1998.

GUPTA, M.; MAZUNDER, V.K.; SAMBATH KUMAR, R.; GOMATTI, Y.; RAJESHWAR, Y.; KOKOTI, B.B.; SELVAN, TAMIL, V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animals models. **Journal of Ethopharmacology**, v.98, p.267-273, 2005.

GURNEY, B. F. Eugenol: utility versus toxicity. **Oral Hygiene**, v.55, p. 74-82, 1965.

GYRES, K. E KNOLL, J. Inflammation and writhing syndrome inducing effect of PGE1, PGE2 and the inhibition of these actions. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v.27, p. 257-264, 1975.

GYRES, K.; TORMA, Z. The use of writhing test in mice for screening different types of analgesics. **Arch. Inc. Pharmacodyn.**, v. 267, p. 131-140, 1984.

HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacology Therapies**, v.56, p. 131 – 190, 1992.

HAMMEL, H.T.; MAGGERT, J.; KAUL, R.; SIMON, E.; SIMON-OPPERMANN, C.H. Effects of altering spinal cord temperature on temperature regulation in the Adelie penguin. *Pygoscelis adeliae*. **Pflugers Archiv**, v.362, p.1-6, 1976.

HANDY, R.L.; MOORE, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity, **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.123, p.1119-1126, 1998.

HEAPY, C. G.; SHAW, J. S.; FARMER, S. C. Differential sensitivity of antinociceptive assays to the bradykinin antagonist. **Journal of Pharmacology**, v.108, p. 209-213, 1993.

HEAPY, C.G.; JAMIESON, A. AND RUSSELL, N.J.W. Afferent C – fibre and A – delta activity in models of inflammation, **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.90, p. 164, 1987.

HELFMANN, W.; JANNES, P.; JESSEN, C. Total body thermosensitivity and its spinal fractions in the conscious goose. **Pflugers Archivs**, v.391, p.60-67, 1981.

HIGH, K.W. CGRP Knock-out mice new findings. **Scientific World Journal**, v.1, p. 18, 2001.

HOUGH, L.B. Cellular localization and possible functions for brain histamine: recent progress. **Progress in Neurobiology**, v. 30, p. 469-505, 1988.

HOUGH, L.B. Genomics meets histamine receptors: New subtypes, new receptors. **Molecular Pharmacology**, v.59, p. 415 – 419, 2001.

HOWARD, M. Fever: causes and consequences. **Neuroscience Biobehavioural Review**, v.17, p. 237-269, 1993.

HUANG, Y. C.; WU, B. N.; LIN, Y. T.; CHEN, I. J. Eugenodiol: A Third – Generation  $\beta$ -Adrenoceptor Blocker, Derived from Eugenol, With  $\alpha$ -Adrenoceptor Blocking and  $\beta_2$ -Adrenoceptor Agonist-Associated Vasorelaxant Activities. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.34, p. 10 – 20, 1990.

HUGHES, S. R.; WILLIAMS, T.J.; BRAIN, S.D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. **European Journal of Pharmacology**, v.191, p. 481-484, 1990.

HUME, W.R. Effects of Eugenol on constrictor responses in blood vessels of then rabbit ear. **Journal of Dental Research**, v. 62, p. 1013-1015, 1983.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B. AND HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesic. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.69-76, 1985.

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

IGONIN, A.A.; KUKES,V.G., AND PALTSEV, M.A. Sepsis: molecular mechanisms of systemic inflammation as a model for study of perspective therapeutic targets. **Molecular Medicine**, v.2, p.3-12, 2004.

ITO, Y.; SUZUKI, H.; KURIYAMA, H. Effects of sodium nitroprusside on smooth muscle cells of rabbit pulmonary artery and portal vein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 207, p.1022-1031, 2005.

JAIN, N.K.; KULKANI, S.K.; SINGH, A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. **European Journal of Pharmacology**., v.423, p. 85-92, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I . Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p. 203-209, 2001.

JUST, M.J.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; CUELLAR, M.J.; MANEZ, S.; BILIA, A.R.; RIOS, J.L. Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticosens*. **Planta Medica**, v.64, p. 404-407, 1998.

KATZ, L. B.; THEOBALD, H.D.; BOOKSTAFF, R.C. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenam and dextran in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Treated rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapies**, v. 230, p.670-677, 1984.

KHEIFETS, L.M.; BALLARON, J.B.; YOUNG, S.J. Edema and cell infiltration in the phorbol ester treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p.335-341, 1989.

KIM, H.; LEE, E.; KIM, C.; CHUNG, J.; KIM, S.; LIM, J.; SHIN, T. Antianafilactic properties of eugenol. **Pharmacological research**, v. 36, p.6, 1997.

KLIR, J.J.; HEATH, J.E. Thermoregulatory responses to thermal stimulation of the preoptic anterior hypothalamus in the red fox (*Vulpes vulpes*). **Comp. Biochemistry Physiology**, v. 109, p.557 – 566, 1994.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiology Review**, v. 71, p.93 – 127, 1991.

KLUGER, M.J.; KOZAK, W.; LEON, L.R.; SOSZYNSKI, D.; CONN, C.A. Fever and antipyresis. **Progress Brain Research**, v.115, p.465-75, 1998.

KOSTER, R. M., ANDERSON, M., DE – BEER, A. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.418 – 420, 1959.

KOZAM, G. The effect of eugenol on nerve transmission. **Oral Surgery**, v. 44 (5), p.799 - 805, 1977.

KULINSKY, V.I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v. 72, p. 595-607, 2007.

LA MONTTE, R.H.; THALHAMMER, J.G.; TOREBJÖRK, H.E. AND ROBINSON,C.J. Pheripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. **Journal of Neuroscience**, v.2, p.765-781, 1982.

LE BARS, D.; DICKENSON, A.H.; BESSON, J.M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. **Pain**, v.6, p. 283-304, 1979.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CODDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological. Rewiews**, v. 53, p. 597 – 652, 2001.

LEAL, L.K.A.M.; MATOS, M.E.; MATOS, F.J.A.; RIBEIRO, R.H.; FERREIRA, F.V.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive and antiedematogenic affects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, p. 221-227, 1997.

LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; DUARTE, P.G.I.B.; SANTOS, M.A.V.; MAGALHAÃES, P.J.C. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.80, p.1 – 6, 2002.

LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; GRACIE, J.A.; HUNTER, D.; CANETTI, C.A.; CAMPBELL, C.; CUNHA, F.Y.; MCINNES, I.A. A role for IL-18 in neutrophil activation. **Journal of Immunology**, v.167, p. 2879-2886, 2001.

LEVINE, J.D.; TAIOWO, Y. Inflammatory Pain. **Textbook of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v.85, p. 131-134, 2003.

LIN, Q.; PENG, Y.B. AND WILLIS, W.D. Glycine and GABA<sub>A</sub> antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. **Brain Reaerch**, v.654, p.286-302, 1994.

LIN, Y.T.; WU, B.N.; HORNG, Y.C.; HONG, S.J.; LO, Y.C.; CHENG, C.J; CHEN, I.J. Isoeugenol: A selective B1-adrenergic antagonist with tracheal and vascular smooth muscle relaxant properties. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.80, p.127-136, 1999.

LINGEN, M.W. Role of leucocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Archives of Phatology and Laboratory Medicine**, v. 125, p.67-71, 2001.

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

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOUX, J.L.; SMITH, S.; SALEM, H. Comparative analgesic testing of various compounds in mice using techniques. **Arzneimittelforschung**, v.28, p.1644-1647, 1978.

MACFARLENE, B.V.; WRIGHT, A.; O' CALLAGHAN, J.; BESSON, H.A. Chronic neurophatic pain and its control by drugs. **Pharmacology Therapeutics**, v. 75, p. 1-19, 1997.

MACKOWIAK, P.A.; BOULANT, J.Á. Fever: Basic Mechanisms and Management. New York: Lippincott-Raven, 1997.

MANSUY, D.; SASSI, A.; DANSETTE, P.M.; PLAT, M. A new potent inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo, the hepatoprotective drug antisylldithiolthione. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 135, p. 1015-1021, 1986.

MARCINKIEWIEZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 947-951, 1995.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU M. AND KIM S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide- eugenol. A clinically oriented review Oral. **Surgery Oral and Medical Oral Pathology**, v.73, p. 729-737, 1992.

MARNILA, P.; TIISKA, A.; LAGERSPETZ, K.; LILIUS, E. – M. Phagocyte activity in the frog *Rana temporaria*: Whole blood Chemiluminescence method and the effects of temperature and thermal acclimation. **Comp. Biochemistry Physiology**, v.111, p. 609- 614, 1995.

MCGREEN, P.L. e MCGREER, E.G. Autotoxicity and Alzheimer Diseases. **Archives of Neurology**, v.57, p.789-790, 2000.

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rats is produced by activation of N- methyl- D – aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, v.71, p. 327 – 335, 1996.

MELLER, S.T.; CUMMINGS, C.P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**, v.60, p. 367 – 374, 1994.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Spinal mediators of hyperalgesia. **Drugs**, v.47(5), p.10 – 20, 1994.

MELLO, A.C.; CARLINI, E.A.; DESSLER, K.; GREEN, J.P.; KANG, S.; MARGOLIS, S. Behavioral observations on compounds found in nutmeg. **Psychopharmacology**, v. 31, p. 349-363, 1973.

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

MENSE, S. Basic neurobiology mechanisms of pain and analgesic. **American Journal of Medicine**, v.75, p. 4-14, 1983.

MERCER, J.B.; SIMON, E. A comparison between total body thermosensitivity and local thermoensitivity in mammals and birds. **Pflugers Archive**, v.40, p. 228-234, 1984.

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

MOBARAKEH, J.I.; TAKAHASHI, K.; SAKURADA, S.; KURAMASU, A.; YANAI, K. Enhanced antinociceptive effects of morphine in histamine H<sub>2</sub> receptor gene knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 51, 612-622, 2006.

MOLNAR, E.J. Residual Eugenol from Zinc Oxide-Eugenol compounds. **Journal of Dental Research**, v. 46 (4), p. 645-649, 1967.

MONTE, F.J.Q.; JAFFAR, M.; CARDOSO, J.H.L. Relaxante and antiespasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta Médica**, v.66 (1), p.408-411, 2000.

MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; HART, S. L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v.102, p. 198-202, 1991.

NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. **Free Radical Research**, v.20, p. 235-266, 1994.

NAKATANI, Y., YAMASHITA, K. Ryodoraku acupuncture. **Ryodoraku Research institute**. Tokio: Seiwa, p. 90-170. 1977.

NECKER, R. Response of trigeminal ganglion neurons to thermal stimulation of the beak in pigeons. **Journal Comp. Physiology**, v.78, p.307 – 314, 1972.

NECKER, R. Thermal sensitivity of different skin areas in pigeons. **Journal Comp. Physiology**, v.116, p. 239 – 246, 1977.

NECKER, R., RAUTEMBERG, W. Effect of spinal deafferentation on temperature regulation and spinal thermosensitivity in Pigeons. **Pflugers Archive**, v.360, p. 287-299, 1975.

NEWMANN, S.; DOUBELL, T. P. LESLIE, T. WOOLF, C. J. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. **Nature**, v. 384, p.364, 1996.

NISHIJIMA, H.; UCHIDA, R.; KAMEYAMA, K.; KAWAKAMI, N.; OHKUBO, T.; KITAMURA, K. Mechanisms Mediating the Vasorelaxing Action of Eugenol, a Pungent oil, on Rabbit Arterial Tissue. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 79, p. 327-334, 1999.

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

OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of Eugenol and Guaiacol. **Journal of Dental Research** v.76, p. 848 – 851,1997.

OLIVEIRA FILHO, R.M.; NAHAS, M.S.; VALLE, L.B.; ISSAO, M. Ações farmacológicas do eugenol. **Arschieve Curandi Odontol.**,v. 2, p.3-13, 1975.

OPAL, S. M. Interactions between coagulation and inflammation. **Scand Journal of Infectious Diseases**, v. 35, p. 545-554, 2003.

ORTNER, M.J.; CHINGNELL, C.F. Effect of concentration on the binding of compound 48/80 to rat mast cells: a fluorescence microscopy study. **Immunopharmacology**, v. 3, p. 187-191, 1981.

OZEKI, M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. **Compportament, Biochemistry and Physiology** , v.50, p. 183 – 191, 1975.

RABELO, M.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; MIRANDA, A. V.; MATOS, F. J. A.; CRIDDLE, D. N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiata) in mice. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 521-524, 2003.

RAKOTONIRAINY, M.S. & LAVÉDRINE, B. Screening for antifunga (activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, n.2, p. 141 – 147, mar/2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M. Farmacologia. Tradução de Patrícia Josephine Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.

RANGE, H.P.; BEVAN, S., DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: wall, P. D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3 rd Ed. Edinburg, Churchill Livingstone, p. 57-78, 1994.

REDDY, B.S. Chemoprevention of colon cancer by dietary administration of naturally-occurring and related synthetic agents. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 400, p.931-936, 1997.

REDDY, B.S. Chemoprevention of colon cancer by minor dietary constituents and their synthetic analogues. **Preventive Medicine**, v. 25, p. 48-50, 1996.

REITER, M.; BRANDT, W. Relaxant Effects on Tracheal and ileal Smooth Muscle of the guinea pig. **Arzneim-Forsch. Drug Research** ,v. 35, p. 408-414, 1985.

ROCHA E SILVA, M. O. Brief history of inflammation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vane, J.R.; Ferreira, S. H. (eds), New York: Springer – Verlag, pp: 6-25, 1978.

ROMPELBER, C. J.; PLOEMER, J. H. ; JESPERSEN, S.; VAN DER GREEF, J.; VERHAGEN, H.; VAN BLODEREN, P. J. Inhibition of rat, mouse and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. **Chemistry and Biological Interaction**., v. 5; 99 (1-3), p.85-97, 1996.

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

ROTH J. Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress. **Progress in Brain Research**, v.115, p.177-92, 1998.

ROTH, J.; ZEISBERGER, E.; VYBIRAL. S.; JANSKY. L. Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. **Front Bioscience**, v. 9, p.816-26, 2004.

ROWLEY, D.A.; BENDITT, E.P. 5- Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. **Journal of Experimental Medicine**, v.103, p.399-415, 1956.

RUSSO, C.M., BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Reviews in Medicine**, v.49, p.1234-133, 1998.

SAKURADA, S.; ORIT, T.; FURUTA, S.; WATANABE, H.; MOBARAKEH, J.I.; YANAI, K.; WATANABE, T.; SATO, T.; ONODERA, K.; SAKURADA, C.; SAKURADA, T. Intrathecal histamine induces spinally mediated behavioral response through tachykinin NK1 receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 74, p. 489–493, 2003.

SAKURADA, S.; ORITO, T.; SAKURADA, C.; SATO, T.; HAYASHI, T.; MOBARAKEH, J.I.; YANAI, K.; ONODERA, K.; WATANABE, T.; SAKURADA, T. Possible involvement of tachykinin NK1 and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 29–34, 2002.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; BOURDON, D.M.; STEM, M.K; CURRIE, M.G.; MANING, P.T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan – induced rat paw oedema. **European Journal of Pharmacology**, v. 303, p.217-220, 1996.

SAMPSON, A.P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clinic Experimental Allrgy**,v.30 (Suppl 1), p. 22-27, 2000.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat, **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 114, p.323-328, 1995.

SCHIFFMAN, E.; CORCORAN, B.A. & WALL, S.M. N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. **Proceedings of the National Academy of the USA**, v.72, p.1059-1062, 1975.

SCHMIDT, I. Effect of central thermal stimulation on the thermoregulatory behavior of the pigeon. **Pflugers Arch.**, v.363, p.271-272, 1976.

SCHMIDT, I.; SIMON, E. Negative and positive feedback of central nervous system temperature in thermoregulation of pigeons. **American Journal of Physiology**, v.243, R 363-R 372, 1982.

SEIMONEIT, K.D.; ZIPF, H.F.; DITTMANN, E.C. Untersuchungen Zur endoanästhetischen und hypnotisch narkoptischen Wirkung von 2-methoxy-4-allylphenoxyessigsäure- N, N-diäthylamid und verwandten phenolderivaten. **Archives Internationales de Pharmacodynamic**, v. 164, p.30-46, 1996.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyl – eugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**, v.14, p. 367 – 377, 1976.

SENO, N. E DRAY, A. Capsaicin-induced activation of fine afferent fibres from rat skin in vitro. **Neuroscience**, v. 55, p. 563-569, 1993.

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

SHIBATA, M. OHKUBO, T.; TSURUDA, K. TAKAHASHI, H. Mode of action phenolic dental medicaments through substance P release. **Japanese Journal of Oral Biology**, v. 36: p. 49-59; 1994.

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

SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Experimental Biological and Medical**, v. 95, p.729-731, 1957.

SILVA, J.; ABEDE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.; MATOS, F.J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283, 2003.

SIMBIRTSEV, A.S. **Immunologiya**, v.26, p.368-377, 2005.

SPLETTSTOESSER, W. D. & SCHULL-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes – the enemy within. **Microscopy Research and Technique**, v.57, p. 441-455, 2002.

STAMFORD, J.A. Descending control of pain. **Brazilian Journal Anesthesiology**, v.75, p. 217-227, 1995.

STICHT, F. D.; SMITH, R. M. Eugenol: some pharmacologic observations. **Journal of Dental Research**, v. 50 (6), p. 1531-5, 1971.

STOHS, S.J.; LAWSON, T.A.; ANDERSON, L.; BULDING, E. Effects of oltipraz, BHA, ADT and cabbage on glutathione metabolism, DNA damage and lipid peroxidation in old mice. **Mech Aglin Dev.**, v. 37 (2), p.137-45, 1986.

SUZUKI, Y. SUGIYAMA, K.; FUTURA, H. Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.39 (3), p.381-386, 1985.

TABERNERO, A.; SCHNEIDER, F.; POTENZA, M.A. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immune-localization and influence on vascular tone. **Intensive Care Medicine**, v.29, p.262-270, 2003.

TAIRA, J.; IKEMOTO, T.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A.; MAKINO, K. Essential oil phenyl propanoids. Useful as. OH scavengers ? **Free radical Research communication**, v. 16, p. 197-204, 1992.

TATRO, J.B. Endogenous antipyretics. **Clinic Infection Diseases**, v. 31, p. 190-201, 2000.

TITA, B.; ABDEL-HAQ, H.; VITALONE, A.; MAZZANTI, G.; SASO, L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmacology**, v.56, p. 341-343, 2001.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOL, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TORTORA, G.J. e GRABOWSKI, D.R. Principios da Anatomia e fisiologia. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2002.

VAN WAUVE, J.P.; GOOSENS, J.G. Arabinolactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H<sub>1</sub>- antihistamines, 5-HT – serotonin antagonists and eipoxygenase blockers. **Agents Action**, v.28, p.78-82, 1989.

VANDER WENDE, C.; MARGOLIN, S. Aanlgesic tests based upon experimentally in deced acute abdominal pain in rats. **Fedn Procediments**, v.15, p. 494, 1956.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti – inflamatory drugs. **Scand. Journol of Rhermatology.**, v.25, p. 9 – 21, 1996.

VANE,J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of actions of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research**, v.44, p.1-10, 1995.

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

VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinociceptive effect of the essential oil from cymbopogon citratus in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 323-327, 2000.

VINERGAR, R.; SCHREIHER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.166, p. 96-103, 1969.

VOGEL, H. G.; VOGEL, W. H. **Drug Discovery and evaluation, pharmacological assays.** Heidellberg: Springer, Berlin, 1997.

VON EULER, U. S.; GADDUM, J.H. Na unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **Journal of Physiology**, v.72, p.74-86, 1931.

WALKER, A.; WARD, C.; TAYLOR, E.L.; DRANSFIELD, I.; HART, S.P.; HASLETT, C.; ROSSI, A.G. Regulation of neutrophil apoptosis and removal of apoptotic cell. **Current Drug Targets Inflammation and Allergy**, v.4, p.447-454, 2005.

WALTING, K.J. **The sigma – RBI Handbook of Receptor classification and Signal Transduction**. Natick, USA, 2006.

WHEELER, D. Regulation temperature. **Surgery**, v.24, p.12, 2006.

WIE, M.B.; WON, H.; LEE, K.H.; SHIN, J.H.; LEE, J.C.; SUH, H.W.; SONG, D.K.M.; KIM, Y.H. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. **Neuroscience Letters**, v. 255, p. 93-96, 1997.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain, **Neurochemistry International**, v.45, p.389-395, 2004.

WILLIS, W.D.; COGGESHALL, R.E. **Sensory mechanisms of the the Spinal Cord**. Plenum Press, New York, 1991.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. **Journal of clinical Neuropsychology**, v.14, p. 2-31, 1997.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin – induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Experimental Biological and Medical**, v.111, p.544-547, 1962.

WON, H.M.; LEE, C.J.; KIM, H.Y.; SONG, K.D.; SUH, W.H.; OH, S.Y.; KIM, H.J.; SHIN, K.T.; LEE, J.Y.; WIE, B.M. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampol neurons from global ischemia in gerbils. **Neuroscirnce Letters**, v. 245, p.101-104, 1998.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapies**, v.80, p.300 – 307, 1944.

WRIGHT, D.E.; WHITE, F.A.; GERFEN, R.W.; SILOS-SANTIAGO, I. and SNIDER, W.D. The guidance molecula semaphoring III is expressed in regions of spinal cord and periphery

avoided by growing sensory axons. **Journal of Comportamental Neurology**, v.361, p. 321-333, 1995.

WU, B. N.; HWANG, T. L.; LIAO, C. F. AND CHEN, I. J. Vaninolol: a new selective beta B-adrenergic antagonist derived from vanillin. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 101-109, 1994.

YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleennamine in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 235, p. 683-689, 1985.

YOO, C. B.; HAN, K. T.; CHO, K. S.; HA, J; PARK, H. J.; NAM, J. H.; KIL, V. H.; LEE, K. T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species – mediated apoptosis in HL – 60 humam promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 225, p. 41 – 52, 2005.

ZELENKA, M.; SCHAFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural infection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v.116, p.257-263, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)