

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

HUMBERTO HUGO NUNES DE ANDRADE

Estudo não clínico do mecanismo antinociceptivo do álcool cinâmico

JOÃO PESSOA – PB

2023

HUMBERTO HUGO NUNES DE ANDRADE

Estudo não clínico do mecanismo antinociceptivo do álcool cinâmico

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Área de concentração: Psicofarmacologia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

COORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

JOÃO PESSOA – PB

2023

HUMBERTO HUGO NUNES DE ANDRADE

Estudo não clínico do mecanismo antinociceptivo do álcool cinâmico

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Área de concentração: Psicofarmacologia.

BANCA EXAMINADORA:



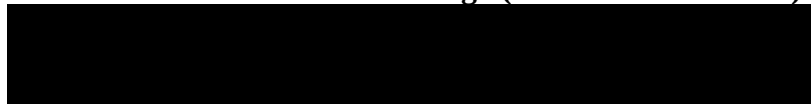
Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Presidente)



Prof.ª Dr.ª Hilzeth de Luna Freire Pessoa (Examinadora Interna)



Prof. Dr. Joao Euclides Fernandes Braga (Examinador Interno)



Prof. Dr. Renan Marinho Braga (Examinador Externo)



Documento assinado digitalmente

FRANKLIN FERREIRA DE FARIAS NOBREGA

Data: 02/02/2023 15:58:57-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega (Examinador Externo)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A553e Andrade, Humberto Hugo Nunes de.

Estudo não clínico do mecanismo antinociceptivo do
álcool cinâmico / Humberto Hugo Nunes de Andrade. -
João Pessoa, 2023.

114 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Coorientação: Mirian G. da Silva Stiebbe Salvadori.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia - Inovação tecnológica. 2.
Nocicepção. 3. Fenilpropanoide. 4. Modelo animal. 5.
Óleo essencial. 6. Estudos in silico. I. Almeida,
Reinaldo Nóbrega de. II. Salvadori, Mirian Graciela da
Silva Stiebbe. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

“Na vida, vitórias e derrotas acontecerão.

O que nunca é aceitável é desistir.”

Magic Johnson

*Aos meus pais, **Humberto Nunes de Andrade e***

Maria Minervina Lúcia de Andrade,

Por tudo que sou hoje, dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha **família** pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, uma referência não só como pesquisador, mas também como pessoa. Agradeço pela paciência e pelos sábios ensinamentos que sempre me acompanharão e servirão de referência na minha vida pessoal e profissional. Dentre as incontáveis qualidades, destaco; o compromisso, a ética, o respeito, a sabedoria e a humildade. Foi um privilégio e a honra ser seu orientando.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. **Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori** pela gentil, solícita e valiosa dedicação na construção e desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente pela confiança e competência na condução do mesmo. Um modelo de professor e ser humano que tive o privilégio compartilhar minha formação.

A colaboradora Profa. Dra. **Adriana M. Fernandes de Oliveira Golzio**, pela amizade, apoio, companheirismo, paciência e valiosa contribuição através de análises que agregaram extremo valor a esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Damião Pergentino de Sousa** do Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB, pela colaboração direta, desde a indicação e fornecimento da substância estudada, às contribuições nas publicações.

Ao Prof. Dr. **Marcus Tullius Scotti** e a Dr^a **Mayara dos Santos Maia** do laboratório de quimioinformática da UFPB, pela colaboração direta na realização dos estudos *in silico*.

Ao Prof Dr. **João Euclides Fernandes Braga**, pela amizade e incentivo durante toda minha formação. Foi uma honra e privilégio compartilhar todos esses anos com você.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (UFPB/UFRPE/UFRN/UFC), pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A secretária do DITM, **Adriana Tiyoko Ura** pela gentil, solícita e valiosa dedicação nos serviços prestados.

Aos professores que fazem parte do laboratório de Psicofarmacologia, pela convivência e valiosos ensinamentos compartilhados.

A todos os amigos da minha turma do doutorado, pelo companheirismo e incentivo. Em especial a **Arthur Pontes, Sonaly Lima e Rebecca Ruanny**, pela amizade construída e companheirismo nas viagens, disciplinas, seminários, congressos, etc.

Aos membros da banca examinadora, **Hilzeth de Luna Freire Pessoa, João Euclides Fernandes Braga, Renan Marinho Braga e Franklin Ferreira de Farias Nóbrega** pela disponibilidade, por aceitarem o convite e pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Psicofarmacologia, **Hugo Fernandes, Anne Portela, Diego Caldas, Letícia Aderaldo e Higor** pela colaboração na parte experimental e pela amizade construída.

Aos Pós-graduandos do Laboratório de Psicofarmacologia, **Alefe Monteiro, Renan Braga, Ryldene Marques, Poliane Calixto, Thallita Nascimento, Aline Kelly, Davison Assis, Érika Guedes, Pablo Raif, Jéssica Cabral, Aline Matilde, Ana Paula Nunes, Jaislânia e Humberto Neto**, pela constante ajuda, ensinamentos e amizade construída na vivência laboratorial.

Ao senhor **Josué Fernandes Cordeiro**, funcionários do Laboratório, pelos serviços prestados.

A **José Crispim e Roberta Parentoni**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

A Unidade de Produção Animal (UPA) Prof. Dr. **Thomas George** do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

A todos os meus amigos que sempre se fizeram presentes, me incentivaram e proporcionaram muitas alegrias; **Gabriel Chaves, Flávia Maiele, Kaenio Almeida, Giovanna Carvalho, Rayssa Paola, Alan Pinheiro, Gustavo Yamaguchi**.

Aos animais utilizados nesta pesquisa. Meu respeito.

À Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (Brasil) pela doação de parte das drogas utilizadas nesta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal da Paraíba pelo apoio institucional.

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

ANDRADE, H. H. N. **Estudo não clínico do mecanismo antinociceptivo do álcool cinâmico**. 2023. 116f. **Tese** (Doutorado em Desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamento) – UFPB / CCS, João Pessoa/PB.

RESUMO

No Brasil a prevalência de dor (aguda e/ou crônica) varia de 23,02 a 76,17%. O tratamento farmacológico para o controle da dor é composto, basicamente, por analgésicos periféricos, fármacos adjuvantes e analgésicos de ação central, que derivaram, em parte, da fitoterapia. O uso de plantas e seus derivados com finalidades terapêuticas têm ocorrido de forma extensiva e crescente em todo o mundo. Dentre os produtos de origem natural, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas de produtos químicos voláteis extraídos de plantas. Os principais constituintes químicos existentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e fenilpropanoides. O álcool cinâmico (AC) é um fenilpropanoide encontrado na casca de *Cinnamomum verum* J.Presl (canela). No presente estudo foi avaliado o efeito antinociceptivo do AC em modelos de nocicepção *in vivo* e por meio de estudos *in silico* e o possível envolvimento das vias do glutamato, óxido nítrico e TRPV1. Inicialmente, camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) foram tratados intraperitonealmente com AC nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg, e submetidos a modelos de nocicepção químicos e térmicos, e foi avaliado a coordenação motora. O AC não causou comprometimento motor nos animais no teste do rota rod. Quanto ao efeito antinociceptivo, o AC inibiu as contorções abdominais induzida por ácido acético, em todas as doses testadas, bem como o comportamento nociceptivo induzido por formalina, na primeira fase (neurogênica) e na segunda fase (inflamatória). O AC apresentou uma boa interação com a enzima cicloxigenase 2 (COX2) no estudo de docking molecular. O AC apresentou atividade antinociceptiva no teste do glutamato, corroborando com o resultado *in silico*, onde houve interação do AC com o receptor glutamatérgico NMDA, também foi eficaz em atenuar a nocicepção térmica, no teste da placa quente e inibir a nocicepção no teste da capsaicina. O AC também foi capaz de reduzir a expressão de óxido nítrico (método de Griess). O AC apresenta efeitos antinociceptivos associados à antagonização dos receptores NMDA, TRPV1 e diminuição do óxido nítrico, o efeito anti-inflamatório está associado a bloqueio da COX2.

Palavras Chaves: Nocicepção, Fenilpropanoide, Modelo animal, Óleo essencial, Estudos *in silico*

ANDRADE, H. H. N. **Non-clinical study of the antinociceptive mechanism of cinnamic alcohol**. 2023. 116f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamento) – UFPB / CCS, João Pessoa/PB.

ABSTRACT

In Brazil, the prevalence of pain (acute and/or chronic) ranges from 23.02 to 76.17%. Pharmacological treatment for pain control basically consists of peripheral analgesics, adjuvant drugs and centrally acting analgesics, which were derived, in part, from phytotherapy. The use of plants and their derivatives for therapeutic purposes has been extensive and growing all over the world. Among the products of natural origin, essential oils stand out, which are mixtures of volatile chemical products extracted from plants. The main chemical constituents in essential oils are monoterpenes and phenylpropanoids. Cinnamic alcohol (CA) is a phenylpropanoid found in the bark of *Cinnamomum verum* J.Presl (cinnamon). In the present study, the antinociceptive effect of AC was evaluated in models of in vivo nociception and through in silico studies and the possible involvement of glutamate, nitric oxide and TRPV1 pathways. Initially, male Swiss mice (*Mus musculus*) were treated intraperitoneally with AC at doses of 6.25 mg/kg, 12.5 mg/kg and 25 mg/kg, and subjected to chemical and thermal models of nociception, and the motor coordination. CA did not cause motor impairment in the animals in the rota rod test. As for the antinociceptive effect, AC inhibited the abdominal writhing induced by acetic acid, in all tested doses, as well as the nociceptive behavior induced by formalin, in the first phase (neurogenic) and in the second phase (inflammatory). AC showed a good interaction with the enzyme cyclooxygenase 2 (COX2) in the molecular docking study. AC showed antinociceptive activity in the glutamate test, corroborating the in silico result, where there was interaction of AC with the NMDA glutamatergic receptor, it was also effective in attenuating thermal nociception in the hot plate test and inhibiting nociception in the capsaicin test. AC was also able to reduce the expression of nitric oxide (Griess method). AC has antinociceptive effects associated with the antagonization of NMDA and TRPV1 receptors and a decrease in nitric oxide, the anti-inflammatory effect is associated with COX2 blockade.

Keywords: Nociception, Phenylpropanoid, Animal model, Essential oil, In silico studies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito Nociceptivo	29
Figura 2. Tipos de Neurônios Sensoriais primários.....	30
Figura 3. Circuito nociceptivo; liberação de substâncias algogênicas	32
Figura 4. Via descendente inibitória da dor.....	33
Figura 5. Fatores externos e internos geradores de EROs e o papel do EROs desencadeando a inflamação.....	35
Figura 6. Mecanismos de sensibilização neuronal promovido por EROs.....	36
Figura 7- Estrutura química do álcool cinâmico (A), aldeído cinâmico (B) e ácido cinâmico(C). Fonte: Pubchem 2020.	42
Figura 8. Esquema experimental do teste do rota rod.	55
Figura 9- Esquema experimental do teste de contração abdominal induzida pelo ácido acético	56
Figura 10. Esquema experimental do teste da formalina.	58
Figura 11. Esquema experimental do teste da placa quente.	59
Figura 12. Esquema experimental do teste da capsaicina.....	60
.Figura 13. Esquema experimental do teste do glutamato	61
Figura 14. Esquema experimental da quantificação de nitrito pelo método de Griess... 62	
Figura 15. Sobreposição da pose do redocking e estrutura do ligante cristalográfico. A – Ligante cristalográfico do NMDA e B- ligante cristalográfico da COX2.....	65
Figura 16. Interações 2D e 3D entre o AC, o MK-801 e a proteína NMDA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro; as ligações de Van der wals são destacadas em verde claro; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.	67
Figura 17. Interações 2D e 3D entre o AC, o ibuprofeno e a proteína COX2. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro; as ligações de Van der wals são destacadas em verde claro; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.	54
Tabela 2. Valores de energia de ligação analisadas nas enzimas selecionadas no estudo usando o AC e os medicamentos (MK-801 e ibuprofeno).	66
Tabela 3. Outras proteínas estudadas.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação da dor quanto aos mecanismos fisiopatológicos. 27

Quadro 2 - Fenilpropanoides com atividades antinociceptiva e/ou Anti-inflamatória. .. 41

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SBOLOS

°C	Grau celsius
δ	Delta
µm	Micrmetro
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µmol	Micromol
nM	Nanomol
nm	Nanometro
m/s	Metro por segundo
%	Porcentagem
g	Grama
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
µL	Microlitro
kcal/mol	Quilocaloria por mol
vs	versus
AC	lcool cinâmico
AINEs	Antiinflamatórios não esteróides
ATP	Trifosfato de adenosina

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX	Enzima ciclooxygenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies de nitrogênio reativo
Glu	Glutamato
GCs	Guanilil ciclase
HO ₂	Hidroperoxila
i.p	intraperitoneal
IASP	International Association for the Study of Pain
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
K	Potássio
KA	Ácido caínico
LC	Locus Coeruleus
LOOH	Peróxidos lipídicos
MVD	Molegro Virtual Docker
NMDA	N-metil-d-aspartato

NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
OEs	Óleos essenciais
OH	Radical hidroxila
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₃	Ozônio
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAG	Região periaquedutal
PDB	Protein Data Bank
PG	Prostaglandinas
RMV	Medula rostroventral
rpm	Rotações por minuto
RMSDs	Desvios da raiz quadrada média
RO/LO	Alcoxila
ROO/LOO	Peroxila
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema Nervoso Central
TRP	Potencial receptor transitório
TRPA	Receptor de Potencial Transitório Anquirina
TRPC	Receptor de Potencial Transitório Canônico

TRPM	Receptor de Potencial Transitório Melastatina
TRPML	Receptor de Potencial Transitório Mucolipina
TRPP	Receptor de Potencial Transitório Policistina
TRPV	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	1
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
2.1 Considerações sobre a dor.....	25
2.1.1 Classificação e Epidemiologia	25
2.1.2 Dor aguda e dor crônica	26
2.2 Dor e Nocicepção.....	28
2.3 Dor e Estresse Oxidativo.....	34
2.4 Antioxidantes	37
2.5 Determinação de nitrito por espectrofotometria	37
2.6 Tratamento Farmacológico da dor.....	38
2.7 Considerações gerais sobre produtos naturais/óleos essenciais	39
2.8 Atividade Antinociceptiva dos Fenilpropanoides	40
2.9 Álcool Cinâmico	42
2.10 Docking molecular	43
2.11 Modelos animais para avaliação do potencial antinociceptivo de produtos naturais.	44
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 MATERIAIS.....	49
4.1.1 Substâncias	49
4.1.2 Preparação do Álcool cinâmico	50
4.1.3 Animais.....	50
4.1.4 Condições experimentais e procedimentos éticos	50

4.2 MÉTODOS	53
4.2.1 Estudo <i>in silico</i>	53
4.2.2 Docking molecular	53
4.2.2.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0	53
4.2.3 Estudo <i>in vivo</i>	54
4.3.1 Teste do Rota Rod	55
4.3.2 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	56
4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva pelo teste da formalina	57
4.3.4 Teste da Placa Quente	58
4.3.5 Teste de nocicepção induzida por capsaicina	59
4.3.6 Teste da nocicepção induzida pelo glutamato	60
4.3.7. Determinação de nitrito por espectrofotometria.....	62
4.4 Análise estatística.....	63
5. RESULTADOS	65
5.1 Docking molecular	65
5.2 Rota Rod	71
5.3 Teste do Ácido Acético.....	72
5.4 Teste da Formalina.....	73
5.5 Placa Quente	75
5.7 Teste da nocicepção induzida pelo glutamato.....	77
5.8 Estresse Oxidativo (quantificação de nitrito por espectrofotometria)	78
6. DISCUSSÃO.....	80
7. CONCLUSÕES Conforme os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que o Álcool Cinâmico:	90
8. PERSPECTIVAS	91
9. REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO 1	111



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dor desempenha papéis fisiológicos importantes, como informar sobre estímulos potencialmente perigosos ou chamar a atenção para tecidos inflamados (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005). A dor pode ser classificada quanto ao tempo de duração, diferenciando-a em dor aguda ou dor crônica (curta e longa duração, respectivamente), e quanto às características fisiopatológicas como dor inflamatória e dor neuropática (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

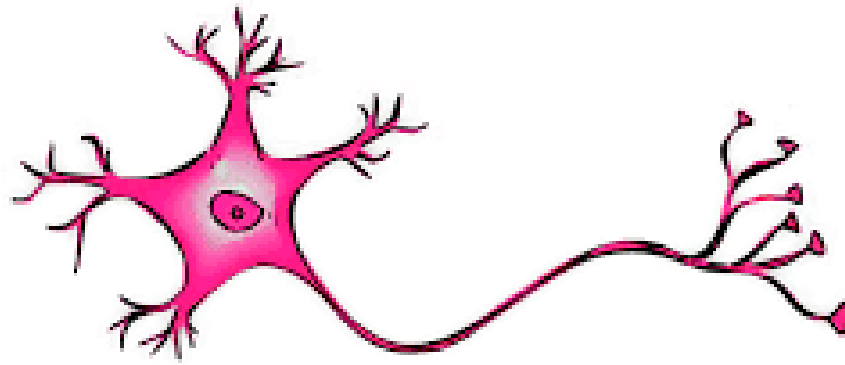
O componente fisiológico da dor é chamado de nocicepção, que é a detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos, as quais transmitem sinais ao sistema nervoso central, influenciados pela inflamação e por estímulos ambientais físicos ou químicos (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Apesar da diversidade de substâncias e do avanço no tratamento para controle da dor, ainda existe uma grande necessidade de analgésicos mais eficazes e com menos efeitos adversos (BENEDITO, 2013). Os desafios para o alívio/tratamento da dor tornaram-se um ímpeto para a pesquisa de medicamentos alternativos e complementares. Atualmente, grande parte dos medicamentos terapêuticos comumente disponíveis para dor, como opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), derivaram da fitoterapia. (HEBERT; BARICE; HENNEKENS, 2014).

O uso de plantas e seus derivados com finalidades terapêuticas têm ocorrido de forma extensiva e crescente em todo o mundo. Dentre os produtos de origem natural, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas de produtos químicos voláteis extraídos de plantas. Os principais constituintes químicos existentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e fenilpropanoides. Sua diversidade de efeitos farmacológicos é provavelmente devido à variabilidade químico-estrutural que os constituintes dos óleos essenciais apresentam (DE SOUSA, 2011). Estudos recentes têm demonstrado a eficácia desses constituintes em diversas atividades biológicas em modelos animais, incluindo a atividade analgésica (SARMENTO-NETO *et al.*, 2015). O gênero *Cinnamomum spp. Schaeff.* tem demonstrado aspectos farmacológicos não clínicos de seus constituintes, com atividades no sistema nervoso central e ênfase no potencial anti-inflamatório e antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2021).

Cinnamomum cassia (Lauraceae) e *Cinnamomum* spp. Schaeff. são espécies de árvores de folha perene, comum na Coréia, China e no Japão, conhecidas comumente por “canela-aromática” e utilizadas na culinária no mundo inteiro. Seus extratos contêm vários componentes ativos, como: aldeído cinâmico, álcool cinâmico e ácido cinâmico (MONTEIRO et al., 2021; PARK et al., 2005).

O álcool cinâmico (AC) é um fenilpropanoide de fórmula molecular $C_9H_{10}O$, de cor variando de branca a amarelo sólido, naturalmente encontrado no óleo essencial da casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) e de outras árvores/arbustos do gênero *Cinnamomum* (PUBCHEM, 2021). Os derivados cinâmico, aldeído, álcool e ácido cinâmico têm se destacado por apresentarem atividades em nível de SNC, (MONTEIRO et al., 2021; PARK et al., 2005). Sendo promissor a investigação da possível atividade antinociceptiva do AC e o mecanismo de ação envolvido.



REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações sobre a dor

2.1.1 Classificação e Epidemiologia

De acordo com a Internacional Association for the Study of Pain (IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada um dano real ou potencial ao tecido (LOESER; TREEDE, 2008). Refere-se a uma experiência pessoal que sofre influência de graus distintos por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Embora a dor geralmente desempenhe um papel adaptativo, pode ter efeitos adversos na função e no bem-estar social e psicológico (RAJA et al., 2020). A dor patológica pode ser classificada como dor inflamatória (nociceptiva) (somática ou visceral) ou neuropática (sistema nervoso). É importante destacar a caracterização temporal da dor, diferenciando-a em dor aguda (curta duração) ou dor crônica (longa duração) (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A dor neuropática é definida pela IASP, como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do Sistema Nervoso Central (SNC) e/ou Periférico (SNP). Podendo ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores (CARDOSO, 2012; GALLUZZI, 2007).

Na dor nociceptiva, as vias se encontram preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores de tecidos cutâneos (Dor somática) ou profundos (Dor visceral), sejam por estímulos térmicos, químicos ou mecânicos (CARDOSO, 2012). A dor visceral e a dor somática geralmente são subagudas e podem vir acompanhadas de respostas autonômicas ou comportamentais específicas (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Outro tipo de dor é a dor mista, que se caracteriza por ambos os tipos de dor, por exemplo, dor nociceptiva resultante do crescimento do tumor e das metástases e dor neuropática resultante da compressão do tumor em estruturas neurais. Um exemplo de dor mista é a dor oncológica (CARDOSO, 2012).

No Brasil a prevalência de dor (aguda e/ou crônica) varia de 23,02 a 76,17%, apresentando média nacional de 45,59% da população. Levando-se em consideração às classificações de mecanismos da Associação Internacional para o Estudo da Dor

(International Association for the Study of Pain - IASP), a dor nociceptiva obteve prevalência de 36,70%, a neuropática foi de 14,5%. (AGUIAR et al., 2021). Nos Estados Unidos 50,2 milhões de adultos (20,5%) relataram sentir algum tipo de dor. Os locais de dor mais comuns foram nas costas, no quadril, joelho ou pé. Tais achados indicam que um ou mais em cada cinco adultos sofrem de dor (YONG; MULLINS, 2022). Estudo realizado com adultos com mais de 25 anos, em 52 países, evidenciou que a prevalência global ponderada de dor foi em média 27,5% (variando de 9,9% a 50,3%) (ZIMMER; FRASER; GROL-PROKOPCZYK, 2021).

A dor se faz presente na vida do ser humano nas mais diferentes faixas etárias. Estudos evidenciam prevalência de dor em crianças e adolescentes, com uma diversificação substancial, principalmente; dor de cabeça: 8-83%; dor abdominal: 4-53%; dor nas costas: 14-24%; dor musculoesquelético: 4-40%; dores múltiplas: 4-49%; outras dores: 5-88%. (KING et al., 2011). Estudo realizado em 22 países com adultos jovens (15-34 anos), identificou uma taxa de prevalência de dor crônica de 11,6%, sugerindo que 1 em cada 9 jovens adultos experimentam dor crônica (MURRAY et al., 2021). Já na população idosa, estima-se que 36,6% de idosos na Índia eram frequentemente incomodados pela dor e 25,2% experimentaram dor limitando a atividade habitual (MOHANTY; AMBADE; UPADHYAY, 2022). Nos EUA a prevalência de dor neuropática foi de 14,6% entre idosos residentes em asilos (MBRAH et al., 2022).

Estudo recente demonstrou uma prevalência de sintomas de dor pós-COVID de origem musculoesquelética em pacientes que sobreviveram a infecção (síndrome respiratória aguda grave pós covid), como: mialgia (5,65% a 18,15%), dor articular (4,6% a 12,1%) e dor no peito (7,8% a 23,6%) em diferentes períodos de seguimento durante o primeiro ano de pós-infecção. A amostra incluiu 14.639 pacientes (FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS; NAVARRO-SANTANA, 2022).

2.1.2 Dor aguda e dor crônica

A dor aguda inicia-se com uma lesão ou injúria, induzindo o surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas. Substâncias algogênicas são liberadas no local, estimulando terminações nervosas (nociceptores) de fibras mielinizadas finas ou amielínicas; sua evolução natural mira manter o dano tecidual o mais controlado possível, porém, em decorrência da ativação de várias vias neuronais de modo prolongado, o

caráter da dor pode se modificar e a dor aguda cronificar-se (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012).

Diferentemente das dores agudas, a dor crônica pode estar associada com a continuação da patologia ou persistir após a recuperação da doença ou lesão. A dor crônica é mais que um sintoma, é a doença que perdura; não desaparece após a cura da lesão ou está relacionada a processos patológicos crônicos. A literatura aponta um tempo igual ou superior a três meses de permanência da dor (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012). A dor também pode ser classificada quanto às características fisiopatológicas (quadro 1) (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Quadro 1 - Classificação da dor quanto aos mecanismos fisiopatológicos.

Tipo	Subtipo	Características	Exemplos
Nociceptiva	Somática	Constante, muito bem localizada, que se exacerba com movimentos e alivia com o repouso.	Osteoartrose, artralguas, metástase óssea, infiltração de tecidos moles.
	Visceral	-Em aperto ou com sensação de pressão. Frequentemente mal localizada e referida.	Câncer ou metástases abdominais. Infiltração visceral pós-quimioterapia (cistite hemorrágica, mucosite)
		- Intermitente, cólica associada a reações autonômicas (náuseas, sudorese) pobremente localizada.	-Tumores que cursam com obstrução de vísceras ocas do TGI
Neuropática (ou neurogênica)	Central	Deaferentação	Dor do membro fantasma, Neuropatia periférica diabética (DPN), Neuralgia pós-herpética (NPH).
		Disfunção Autonômica	Síndrome Complexa Regional tipo I e II
	Periférica	Polineuropatias	Neuropatia diabética, neuropatia pós-quimioterapia e radioterapia
		Mononeuropatias.	Invasão de plexo braquial, neuralgia

			trigeminal.
--	--	--	-------------

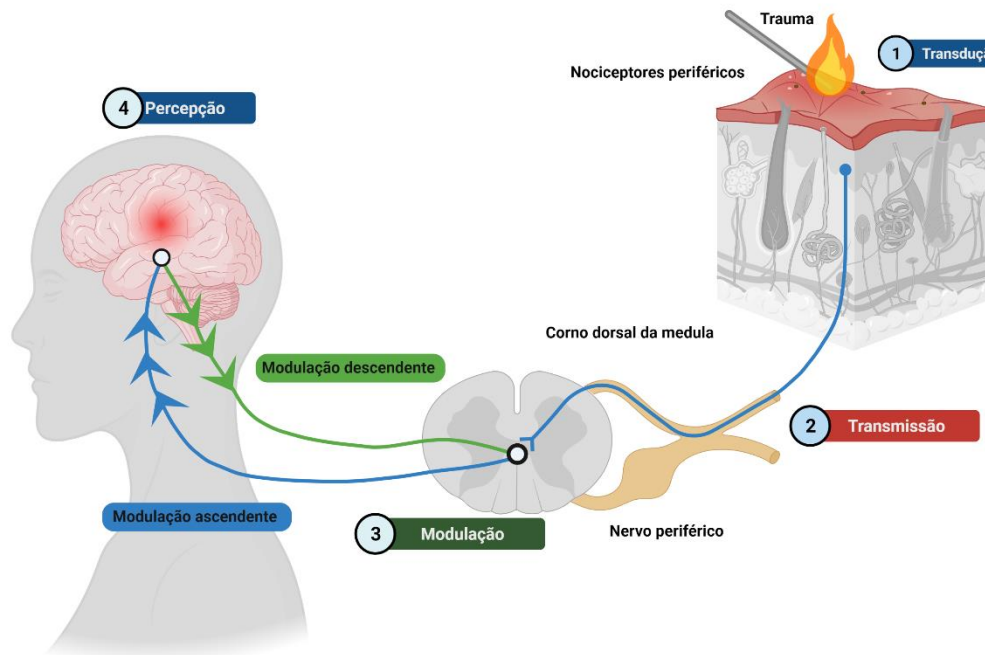
(CARDOSO, 2012; GALLUZZI, 2007; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; PASERO; MCCAFFERY, 2010).

Outro tipo de dor é a dor psicogênica, a qual está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (FÜRST, 1999).

2.2 Dor e Nocicepção

Dor e nocicepção são fenômenos diferentes. A dor não está relacionada apenas à atividade em neurônios sensoriais. A expressão verbal é um dos vários comportamentos para manifestar a dor; incapacidade de se comunicar não nega a possibilidade de que um ser humano ou um animal sente dor (COHEN; QUINTNER; VAN RYSEWYK, 2018; RAJA et al., 2020).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que é a detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos, do tipo A δ (delta) e C, as quais transmitem sinais ao sistema nervoso central, influenciados pela inflamação e por estímulos ambientais físicos ou químicos. A nocicepção consiste dos processos de transdução, transmissão, modulação e percepção de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. Esses processos se dão a partir de três neurônios: neurônio de primeira ordem com origem na periferia e prolongando-se para a medula espinhal, neurônio de segunda ordem (medula espinhal) e o neurônio de terceira ordem estende-se para o córtex cerebral (CHEN; SEHDEV, 2019; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Figura 1. Circuito Nociceptivo

Fonte: Autor (adaptado de Golan, 2009).

O primeiro processo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transdução (figura 1), que consiste na transformação dos estímulos agressivos (térmicos, mecânicos ou químicos) em potenciais de ação. Esses potenciais são transmitidos para o SNC através das fibras nervosas periféricas. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (gânglio da raiz dorsal) e são liberados por terminações das fibras nervosas (periféricas e centrais) produzindo o sinal doloroso periféricamente e também de eventos que levam às percepções centrais (BASBAUM et al., 2009; CHEN; SEHDEV, 2019).

O tecido danificado libera e produz inúmeros fatores que, por sua vez, ativam terminações nervosas. Esses fatores são substâncias algogênicas (ácido araquidônico, citocinas, serotonina, noradrenalina, bradicinina, histamina, substância P, fator de crescimento nervoso, globulina, quinases proteicas, prostaglandinas, leucotrienos, entre outros), em decorrência do processo inflamatório ou traumático, ocorrendo uma amplificação da sensação dolorosa (figura 3) (BASBAUM et al., 2009; MARQUES, 2004).

A liberação dessas substâncias estimula os canais transdutores, tendo como principal exemplo os canais de potencial receptor transitório (TRP), que funcionam semelhante ao canal de potássio fechado por tensão, e assim, ajudam a iniciar potenciais receptores, induzindo um potencial de ação nas fibras nervosas (BASBAUM et al., 2009; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

O segundo estágio na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transmissão. A informação do estímulo nocivo é transmitida, principalmente através de neurônios nociceptivos aferentes primários (tipo A δ e C) que conduzem o estímulo em diferentes velocidades. As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras C (polimodais) transmitem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, em uma velocidade muito mais lenta em virtude de não possuírem bainha de mielina (figura 2). Os nociceptores têm seus corpos celulares que vão do gânglio da raiz dorsal até as camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, onde há liberação de mediadores como glutamato, acetilcolina e substância P, para a retransmissão da mensagem (figura 3) (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Figura 2. Tipos de Neurônios Sensoriais primários

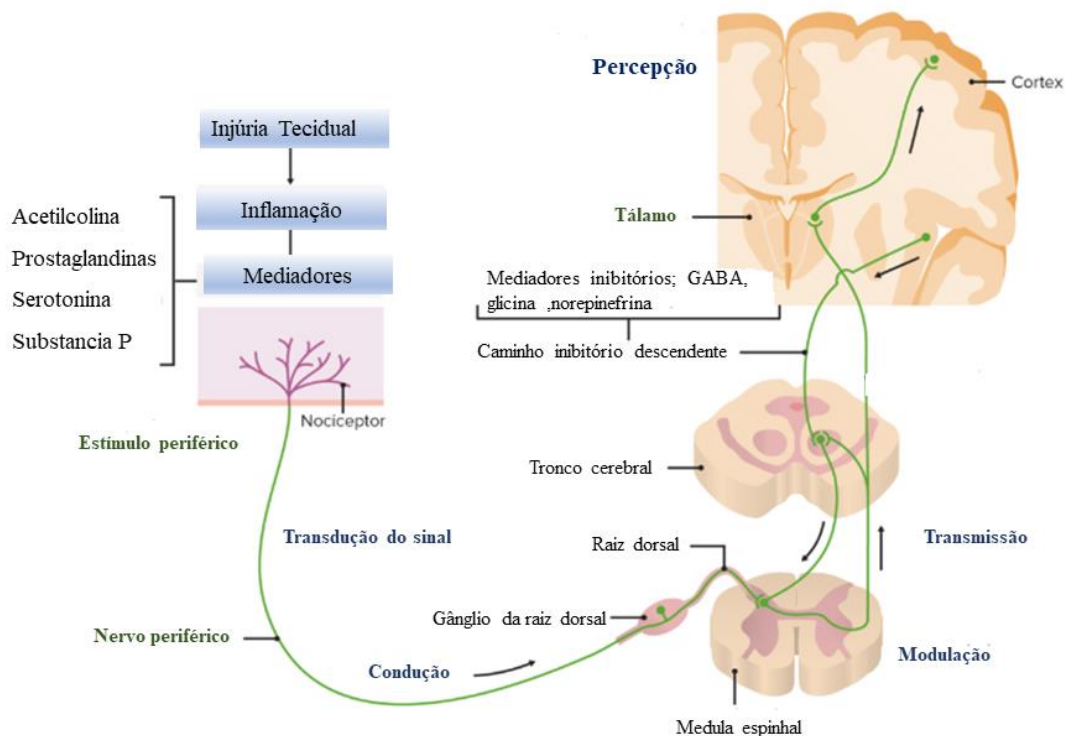
Tipos de Fibras	A α e A β	A δ I e II	C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro (μm)	10	2 – 6	0,4 – 1,2
Velocidade de Condução (m/s)	30 - 100	1,2 – 30	0,5 – 2
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção	Térmico, mecânico e químico	Térmico, mecânico e químico

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

As fibras aferentes nociceptivas terminam predominantemente no corno dorsal da medula espinhal. Assim, a informação nociceptiva é transmitida da medula espinhal para o tronco encefálico e ao tálamo, que a seguir, transmitem sinais ao córtex, hipotálamo e sistema límbico (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; GOLAN et al., 2009).

O terceiro aspecto do processamento do estímulo nocivo é a modulação. A modulação envolve o mecanismo de supressão da dor, que é desencadeada pelas próprias vias nociceptivas. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos inibindo seletivamente tais sinais recebidos, modificando assim a transmissão do sinal para centros superiores (FERNANDES; GOMES, 2011; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; YAKSH, 2006).

Estudos destacam o importante papel do corno dorsal da medula espinhal na modulação da transmissão do sinal nociceptivo. Em 1965, Melzack e Wall propuseram o efeito dessa influência através da teoria da comporta, que ainda possui grande validade na comunidade científica. De acordo com esse modelo, a dor só é percebida quando os neurônios nociceptivos não específicos (T), que são responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo para estruturas supraespinhais, são ativados. Quando ocorre ativação das fibras de grande diâmetro ($A\alpha$ e $A\beta$), há ativação dos interneurônios inibitórios, que podem ser GABAérgicos ou glicinérgicos, localizados na substância gelatinosa (SG), impedindo a ativação do neurônio T. Esse interneurônio pode ser inibido pela ativação das fibras nociceptivas de pequeno diâmetro ($A\delta$ e C). Dessa forma, a ativação das fibras $A\alpha$ e $A\beta$ aumenta a ativação inibitória do interneurônio, fechando a comporta e bloqueando a propagação para as vias supraespinhais, enquanto a ativação das fibras $A\delta$ e C, pela ativação dos interneurônios inibitórios, podem abrir a comporta, facilitando a transmissão do sinal nociceptivo. (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; CALVINO; GRILO, 2006; BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; YAKSH, 2006). Portanto, a medula espinhal não executa somente a recepção e transmissão dos impulsos sensoriais, mas também um elevado grau de modulação central, envolvendo abstração local, integração, seleção e dispersão apropriada dos impulsos sensoriais (FERNANDES; GOMES, 2011; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; YAKSH, 2006).

Figura 3. Circuito nociceptivo; liberação de substâncias algogênicas

Fonte: adaptado de STANLEY OISETH (2022).

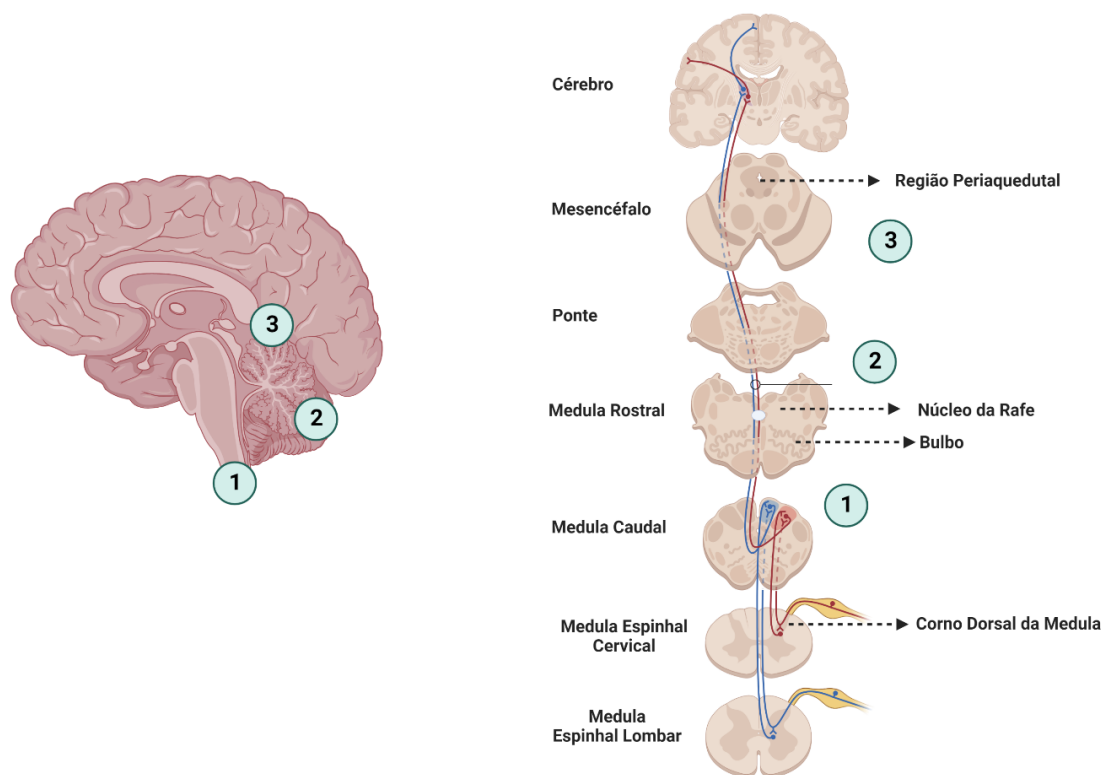
A região do corno dorsal da medula espinhal está organizada anatomicamente em lâminas numeradas de I a V (BASBAUM, A.; JESSEL, 2000) e recebem os estímulos oriundos das fibras aferentes primárias. Tais estímulos são processados por interneurônios excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA ou glicina), levando a informação para áreas cerebrais (via ascendente da dor). As projeções ascendentes visam o tálamo e as projeções colaterais visam os núcleos mesencefálicos. Os axônios presentes nesses neurônios de projeção, passam através dos tratos espinotalâmicos contralaterais e realizam sinapses com neurônios localizados no tálamo onde estão presentes outras projeções para o córtex somatosensitivo (BASBAUM et al., 2009; BASBAUM, A.; JESSEL, 2000).

As vias descendentes inibitórias para a dor (figura 4) controlam os impulsos no corno posterior, partindo da amígdala e do hipotálamo rumo à região periaquedutal cinzenta (PAG). A região periaquedutal, passa pelo Locus Coeruleus (LC) e projeta-se para a medula rostroventral (RMV). A medula rostroventral projeta-se para o corno da

medula espinhal. A Inibição da dor por essa via se dá devido à mediadores químicos (serotonina, as catecolaminas e os peptídeos endógenos) produzidos pelos neurônios (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; RANG; DALE, 2012; TODD, 2010).

A PAG está diretamente envolvida na supressão da dor. A PAG recebe várias aferências de várias estruturas do encéfalo, muitas das quais são responsáveis pela transmissão de informações relacionadas ao contexto emocional. Os neurônios da PAG enviam axônios descendentes a várias regiões localizadas na linha média do bulbo, especialmente para os núcleos da rafe. Esses neurônios bulbares projetam os axônios, por sua vez, para os cornos dorsais da medula espinhal, onde podem deprimir de maneira eficiente a atividade dos neurônios nociceptivos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002).

Figura 4. Via descendente inibitória da dor



Fonte: Autor. Criado com BioRender.com

2.3 Dor e Estresse Oxidativo

A hiperalgesia é o resultado de um estado persistente de sensibilização aferente periférica, durante a inflamação aguda/crônica, que posteriormente leva à sensibilização espinhal através da liberação do glutamato e da produção de radicais livres (espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ILARI et al., 2020).

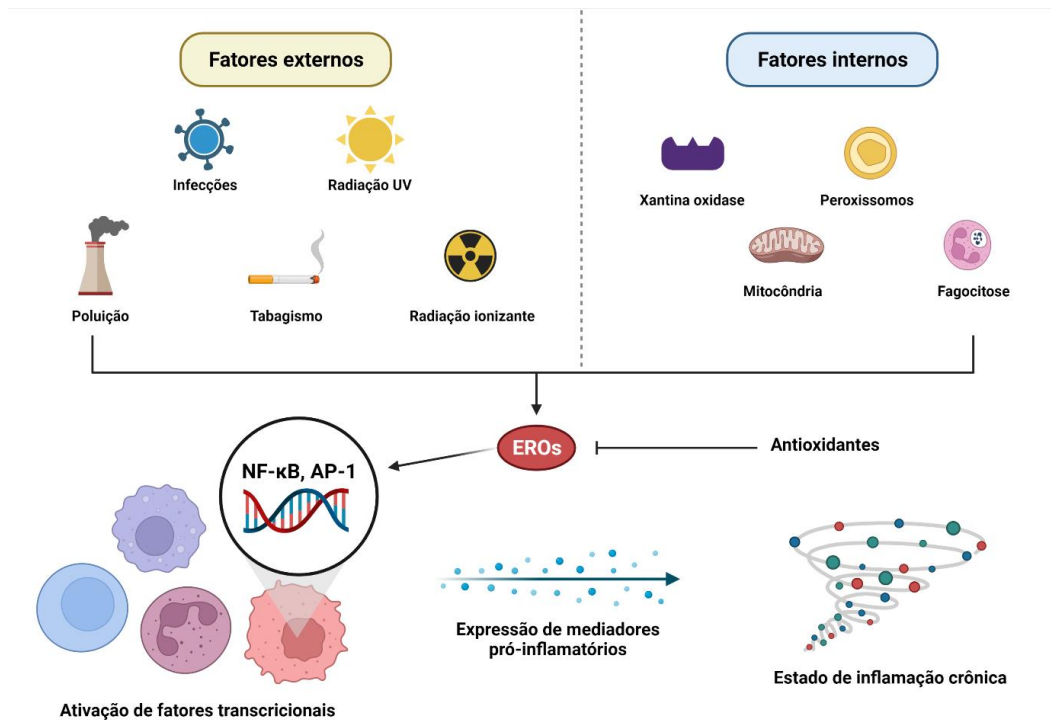
O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis celulares mais elevados de EROs e ERNs e os sistemas de defesa antioxidante celular. O estresse oxidativo é reconhecido por desempenhar um papel central na fisiopatologia de diferentes doenças (BURTON; JAUNIAUX, 2011) como; Esclerose lateral amiotrófica, Doença de Huntington, Alzheimer, Parkinson, doenças vasculares, envelhecimento e na dor (MARIANI et al., 2005; TAHA; BLAISE, 2012). O estresse oxidativo afeta predominantemente o cérebro, e esta vulnerabilidade é devida, principalmente, ao intenso metabolismo aeróbico e perfusão sanguínea, o que gera grande quantidade de EROs/ERNs (ILARI et al., 2020).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, na via do ácido úrico (enzima xantina oxidase), na inflamação e em fagócitos, no processo de isquemia e nos exercícios físicos. Fatores externos (como tabagismo, poluição, radiação, medicamentos, pesticidas, solventes industriais, dentre outros) influenciam nos níveis de radicais livres (figura 5) (GUAN; LAN, 2018; KUMAR; PANDEY; LIU, 2015). EROs e (ERNs) são moléculas muito reativas, que se apresentam de duas maneiras (A/B):

(A) *Radicais livres* – caracterizado por apresentar um ou mais elétrons desemparelhados. Ex: dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$), óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet/\text{LOO}\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) alcóxila ($\text{RO}\bullet/\text{LO}\bullet$). (GULCIN, 2020; KIM et al., 2015; VALKO et al., 2007).

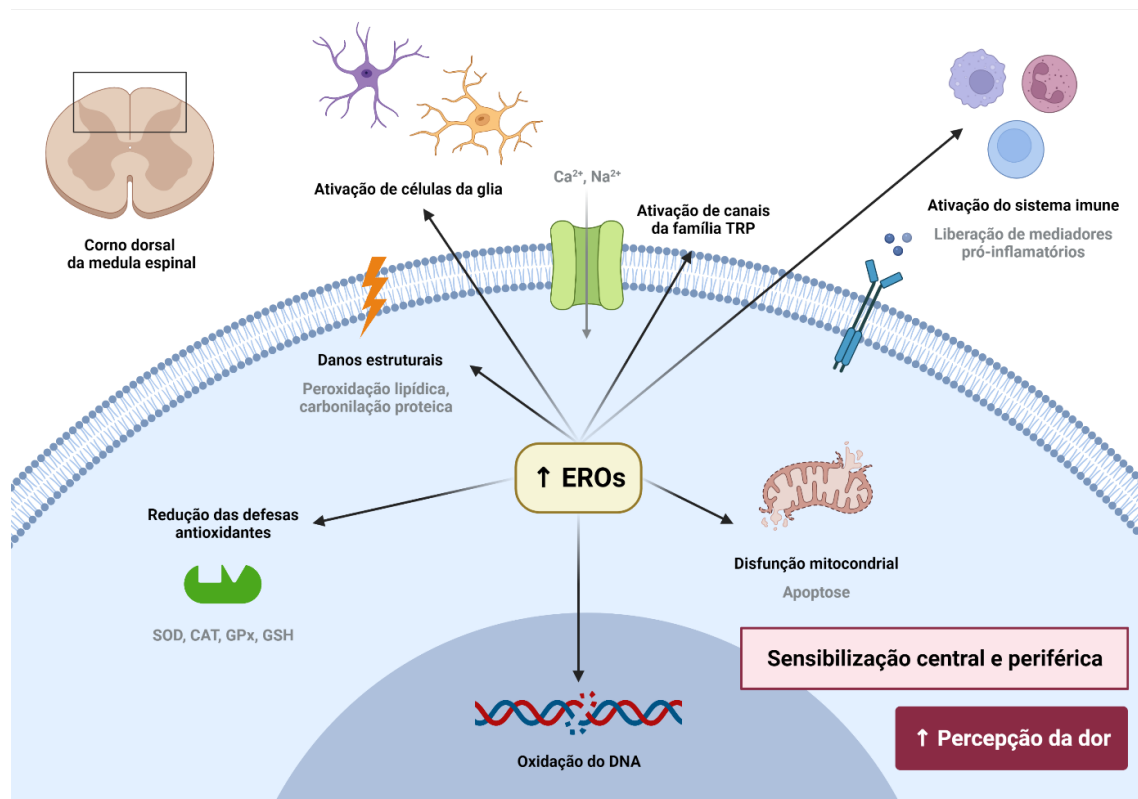
(B) *Não radicais livres* – não possuem elétrons desemparelhados. Ex: ozônio (O_3), ácido hipocloroso (HClO), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxidos lipídicos (LOOH), peroxinitrito (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GULCIN, 2020; KIM et al., 2015; VALKO et al., 2007).

Figura 5. Fatores externos e internos geradores de EROs e o papel do EROs desencadeando a inflamação.



Fonte: Autor. Criado com BioRender.com

Em condições normais, as ERO intracelulares são benéficas, agindo na proteção contra patógenos invasores, e os níveis de ERO se mantêm controlados por várias atividades enzimáticas. Em condições patológicas, os níveis de ERO intracelulares aumentam devido ao desequilíbrio na produção ou remoção destas espécies/radicais, causando danos celulares que vão desde o inchaço citoplasmático até a morte. Sendo assim, a remoção de ERO que se encontra em excesso é muitas vezes importante para restaurar as condições normais (KIM et al., 2004), e podem prevenir os achados característicos associados à dor inflamatória e outras etiologias diferentes de dor (ILARI et al., 2020).

Figura 6. Mecanismos de sensibilização neuronal promovido por EROs.

Fonte: Adaptado de Carrasco (2018). Criado com BioRender.com.

O estresse oxidativo pode interferir em processos fisiológicos como inflamação e percepção da dor. A expressão gênica pró-inflamatória induzida por EROs promove a ativação de leucócitos e síntese exagerada de citocinas e mediadores inflamatórios, conduzindo o organismo a um estado de inflamação crônica. As EROs podem ativar a expressão gênica através da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou diretamente por meio de fatores transcricionais, como NF-KB (RANNEH et al., 2017).

Devido ao seu alto teor em fosfolipídios e mitocôndrias axonais, e de uma fraca defesa antioxidante neuronal, os nervos dos mamíferos são extremamente suscetíveis a radicais livres. Em virtude dessas limitações, as EROs podem atuar por diferentes vias para promover a sensibilização periférica/central, impactando na forma como será conduzido o estímulo nocivo. Além de promover redução nas defesas antioxidantes, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e dano ao DNA, o estresse oxidativo no SNC também promove ativação de células da glia e leucócitos. O aumento de cálcio intracelular é peça chave na etiologia da dor neuropática, e a ativação direta de canais da

família dos receptores de potencial transitório (TRP) por EROs permite o influxo, desta forma, contribuindo para a sensibilização neuronal (figura 6) (CARRASCO et al., 2018).

2.4 Antioxidantes

Um antioxidante é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas e reduzir efeitos nocivos das ERO, retardam o progresso de muitas doenças crônicas, bem como a peroxidação lipídica. Estudos científicos relatam os variados benefícios de antioxidantes em processos como envelhecimento, estresse, apoptose, infestação de patógenos e doenças neurológicas (GULCIN, 2020).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos (superóxido dismutase – SOD, glutational peroxidase e catalase) ou não-enzimáticos (vitaminas C e E, glutational, carotenoides, flavonoides e outros) (GULCIN, 2020b; KAPOOR et al., 2019).

O excesso de radicais livres durante o estado de dor é geralmente inativado por antioxidantes, que inibem a oxidação de outras moléculas, removendo diretamente radicais livres (pró-oxidantes) e fornecendo proteção máxima para sítios biológicos (ILARI et al., 2020). Os humanos ingerem antioxidantes diretamente de frutas e vegetais frescos e secos, que contêm uma grande quantidade de flavonoides (GULCIN, 2020).

2.5 Determinação de nitrito por espectrofotometria

O método mais usado para a análise de nitrito é baseado na reação de Johann Peter Griess. A reação de Griess foi realizada pela primeira vez em 1879 e tornou-se a técnica mais comum para a detecção de nitrito. Na reação de Griess, o nitrito reage com ácido sulfanílico sob condições ácidas para formar um íon diazônio, o qual se acopla com a α -naftilamina formando um corante azo vermelho-violeta, solúvel em água (SILVA; KORN; DE ANDRADE, 2007; TSIKAS, 2007).

Outros reagentes também podem ser usados na reação de Griess, para a reação de diazotação e acoplamento, a saber, sulfanilamida e N-(1-naftil) etilenodiamina (NED). NED apresenta várias vantagens sobre componentes de acoplamento, tais como N,N-dimetil-1-naftilamina em termos de reprodutibilidade, maior rapidez de acoplamento, aumento na sensibilidade e aumento da solubilidade ácida do azo corante (TSIKAS, 2007).

A reação de Griess modificada usando sulfanilamida e NED é atualmente a reação mais usada para determinação quantitativa de nitrito (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 2014; TSIKAS, 2007). A metodologia de Griess tem ampla aplicações tanto para determinação de nitrito como para nitrato. Tendo como partida a diazotação de uma amina aromática pelo nitrito em meio ácido com subsequente reação de acoplamento, fornecendo um corante altamente colorido no qual a concentração de nitrito pode ser calculada. Dependendo do reagente selecionado, a absorção máxima para o produto colorido é geralmente encontrada no intervalo de 500 a 600 nm (nmol) (MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001; RIDER; MELLON, 1946; SILVA; KORN; DE ANDRADE, 2007).

2.6 Tratamento Farmacológico da dor

O tratamento farmacológico para o controle da dor é composto, basicamente, por três grupos de drogas analgésicas:

- I) Analgésicos periféricos representados pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs);
- II) Fármacos adjuvantes, como os antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antipsicóticos;
- III) Analgésicos de ação central como os opioides.

Os AINEs fazem parte de um grupo heterogêneo de compostos, que apresentam um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional. São ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados e se ligam, significativamente, à albumina plasmática. O mecanismo de ação dos AINEs, seus efeitos terapêuticos e colaterais resultam principalmente da inibição da enzima COX, diminuindo a síntese das prostaglandinas (PG) e reduzindo a intensidade do processo inflamatório (MONTEIRO et al., 2008; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). Os AINEs apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. São principalmente indicados para o tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas como, osteoartrite, artrite psoriática e artrite reumatoide. Também têm indicação para o tratamento de dor leve e moderada devido as suas propriedades analgésicas prolongadas

e diminuem a temperatura corporal elevada sem provocar dependência química (MONTEIRO et al., 2008; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). São exemplos de AINEs o diclofenaco, ibuprofeno, Piroxicam, nimesulida, etc.

O segundo grupo é dos fármacos adjuvantes que são usados como analgésicos, particularmente para tratar estados dolorosos neuropáticos, que respondem mal aos analgésicos convencionais e trazem importantes problemas clínicos. Esse grupo inclui os seguintes; antidepressivos tricíclicos, particularmente imipramina e amitriptilina. Estes fármacos atuam centralmente, inibindo captura da noradrenalina e são altamente eficazes em aliviar dor neuropática em alguns casos, mas não em todos, sua ação é independente de seus efeitos antidepressivos; Antiepilépticos, como a carbamazepina e gabapentina são vezes eficazes na dor neuropática (COSTA et al., 2007; JAHAMUNNA ABRANTES ANDRADE et al., 2008).

O terceiro grupo são os analgésicos de ação central tais como os fármacos opioides, a exemplo da morfina e da codeína. São úteis no tratamento de dor viscerais difusas, dores associadas ao câncer e na analgesia pré e pós-cirúrgica. O mecanismo de ação destes fármacos envolve a ativação dos receptores opioides μ (mu), δ (delta) e κ (kappa). O uso de opioides, como a morfina, em tratamento doloroso é limitado pelos diversos efeitos indesejados, e também o uso prolongado pode ocasionar tolerância com consequente redução da analgesia em uma dose fixa. Outra desvantagem é a possibilidade de acarreta em síndrome de abstinência ao findar o uso (MCDONALD; LAMBERT, 2013; MIZOGUCHI et al., 2012).

2.7 Considerações gerais sobre produtos naturais/óleos essenciais

O tratamento da dor inclui medidas farmacológicas e não-farmacológicas. Antes da revolução da medicina moderna, várias civilizações utilizavam plantas com propriedades curativas, práticas que até hoje são comuns em diversos países, inclusive no Brasil (PIMENTEL et al, 2015)

Uma Grande parcela dos fármacos em uso clínico atualmente ou são de origem natural ou foram sintetizados quimicamente a partir de produtos naturais. As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas. Vários metabólitos secundários ou especiais se sobressaíram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros

medicamentos que se encontram disponíveis para comercialização no mercado, ressaltando a importância do estudo com produtos naturais como estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

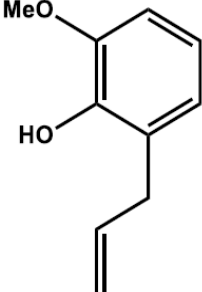
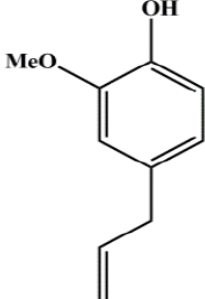
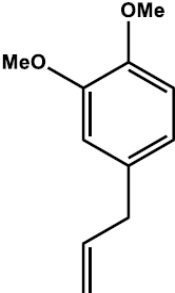
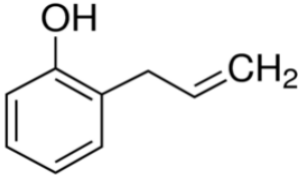
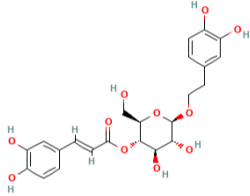
O uso de plantas e seus derivados com finalidades terapêuticas têm ocorrido de forma extensiva e crescente em todo o mundo. Dentre os produtos de origem natural, destacam-se os óleos essenciais (OEs), que são substâncias voláteis extraídas de plantas aromáticas geralmente encontradas em países de clima temperado e tropical. São líquidos de origem natural, contendo misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com aroma acentuado, podendo ser obtidos de todas as partes das plantas, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes ou cascas. Apresentam aplicações na área alimentícia, na agricultura, na saúde e na indústria de cosméticos representando um importante produto no campo industrial (LEITE et al., 2020).

Os principais constituintes químicos existentes nos óleos essenciais são os terpenos e fenilpropanoides. Sua diversidade de efeitos farmacológicos é provavelmente devido à variabilidade químico-estrutural que os constituintes dos óleos essenciais apresentam. Estudos recentes têm demonstrado a eficácia desses constituintes em diversas atividades biológicas em modelos animais, incluindo a atividade antinociceptiva (DE SOUSA, 2011; SARMENTO-NETO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014).

2.8 Atividade Antinociceptiva dos Fenilpropanoides

Os OEs são formados por uma mistura complexa de diferentes compostos que são classificados em terpenóides, sesquiterpenos e fenilpropanoides (DE SOUSA, 2011). Os fenilpropanoides representam um grande grupo de compostos orgânicos produzidos por plantas para protegê-las de infecções, radiações ultravioletas e herbívoras. Eles são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico. O grupo ácido carboxílico do ácido cinâmico é reduzido, gerando os fenilpropanoides (SÁ et al., 2014). Há relatos na literatura científica evidenciando a participação de vários fenilpropanoides com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (quadro 2).

Quadro 2 - Fenilpropanoides com atividades antinociceptiva e/ou Anti-inflamatória.

Nome	Estrutura química	Atividade	Autor
Orto-eugenol		Antinociceptiva	(FONSÊCA et al., 2016).
Eugenol		Antinociceptiva	(DANIEL et al., 2009).
Metileugenol		Antinociceptiva	(YANO et al., 2006)
2 alilfenol		Antinociceptiva	(ASSIS, 2016).
Calceolarioside		Antinociceptiva	(PIERETTI et al., 2022)

2.9 Álcool Cinâmico

O AC é um álcool primário que compreende um núcleo aciclílico com um substituinte hidroxila na posição 1 e um substituinte fenilo na posição 3 (geometria da ligação C = C não especificada). Faz parte do grupo dos fenilpropanoides, apresenta fórmula molecular C₉H₁₀O, de cor branca para amarelo, naturalmente encontrado no óleo essencial da casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) e de outras árvores/arbustos do gênero *Cinnamomum* (PUBCHEM, 2021).

A canela é uma especiaria comum usada por várias culturas no mundo todo há muito tempo. É obtida a partir da casca interna das árvores do gênero *Cinnamomum*, uma planta tropical perene que possui duas variedades principais; *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*. Além de ser bastante utilizada na culinária, na medicina ayurvédica nativa a canela é tida como alternativa no tratamento de doenças respiratórias, digestivas e ginecológicas. Os óleos voláteis obtidos da casca, folha e raiz diferem consideravelmente na composição química, o que sugere que também podem variar em seus efeitos farmacológicos (RANASINGHE et al., 2013).

Seus extratos contêm diversos componentes ativos, como AC, aldeído cinâmico e ácido cinâmico (Figura 7).

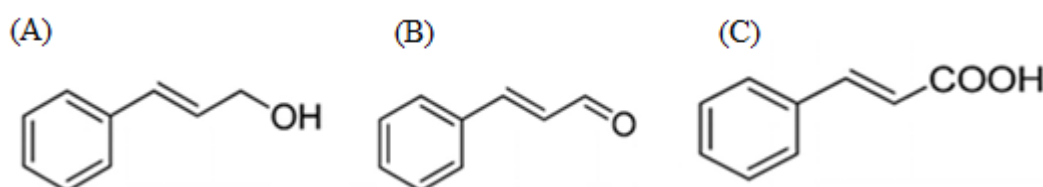


Figura 7. Estrutura química do álcool cinâmico (A), aldeído cinâmico (B) e ácido cinâmico(C). Fonte: Pubchem 2020.

Os derivados cinâmicos são dotados de importantes propriedades farmacológicas. Em nível de SNC, estudos não clínicos descreveram que o AC é um composto capaz de promover efeitos ansiolítico-símile e antinociceptivo (ANDRADE et al., 2020), antidepressivo-símile (SAKINA; DANDIYA, 1990), anti-neuroinflamatório (GUNAWARDENA et al., 2015) e neuroprotetor (CREWS STAVINOHA; ANIL VATTEM, 2015). Os efeitos antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório também foram relatados (MONTEIRO et al., 2021). Esses estudos, portanto, fundamentam novas pesquisas que investigam as potencialidades antinociceptiva e anti-inflamatória do AC.

2.10 Docking molecular

Nas últimas décadas, o uso de metodologias *in silico* como quimioinformática, modelagem molecular e a inteligência artificial aumentaram significativamente. As abordagens *in silico* permitem a triagem virtual de milhões de compostos em um tempo acessível, reduzindo os custos iniciais de identificação de acertos e melhorando as chances de encontrar os candidatos a fármacos desejados (PINZI; RASTELLI, 2019). As metodologias de acoplamento visam prever o modo de ligação experimental e a afinidade de uma pequena molécula dentro do local de ligação do receptor alvo de interesse. O acoplamento molecular consiste em três principais objetivos conectados: previsão de pose, triagem virtual e estimativa de afinidade vinculante (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014)

Uma metodologia de acoplamento bem sucedida deve ser capaz de prever corretamente a pose de ligante nativa dentro do local de ligação do receptor e as interações moleculares físico-químicas associadas (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). O docking molecular é um exemplo de um dos métodos *in silico* bem sucedidos, baseados em estrutura, ajudando a prever as interações que ocorrem entre moléculas e alvos biológicos (PINZI; RASTELLI, 2019; SALMASO; MORO, 2018).

Para a realização de um cálculo de docking é necessário obter a estrutura alvo, que geralmente consiste em uma grande molécula biológica (proteína, DNA ou RNA). Tais macromoléculas podem ser obtidas do Protein Data Bank (PDB), que fornece acesso a coordenadas atômicas 3D (TORRES et al., 2019).

Em geral, existem dois objetivos principais em estudos de docking, primeiro: a energia de afinidade do ligante pela proteína correta, segundo; a predição da pose do ligante. Com a predição da pose entre duas moléculas (proteína-ligante ou proteína-proteína), dentro de um sítio de ligação e a estimação do cálculo da sua afinidade de ligação (KASTRITIS et al., 2011) é possível observar as interações entre o ligante e os resíduos pertencentes ao sítio de ligação do receptor, como por exemplo, ligações de Hidrogênio e interações eletrostáticas e de van der Waals. (KITCHEN et al., 2004; PINZI; RASTELLI, 2019; TORRES et al., 2019)

O método de docking precisa de dois componentes principais: A primeira etapa é a aplicação do algoritmo que representa pequenas espécies químicas (ligantes) no sítio ativo de dada proteína, com o intuito de detectar a melhor pose do ligante (TORRES et al., 2019). Em segundo momento, são utilizadas funções de scoring para avaliar os modos de interação entre o ligante e a proteína, direcionando a busca para conformações de ligante com maior afinidade pelo receptor.(HUANG; GRINTER; ZOU, 2010; WANG; LU; WANG, 2003)

As funções de scoring podem ser divididas em três classes principais: baseada em campo de força, empírica e baseada em estruturas conhecidas (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010; WANG; LU; WANG, 2003). O método baseado em estruturas conhecidas se baseia na análise estatística da interação de pares de átomos a partir do complexo proteína-ligante com estruturas tridimensionais disponíveis. O método baseado em campo de força utiliza os campos de força clássicos e consiste no somatório de termos de energia. Os métodos empíricos são baseados na correlação da energia livre de ligação com uma soma ponderada de variáveis não relacionados. (PINZI; RASTELLI, 2019; SALMASO; MORO, 2018; TORRES et al., 2019)

2.11 Modelos animais para avaliação do potencial antinociceptivo de produtos naturais.

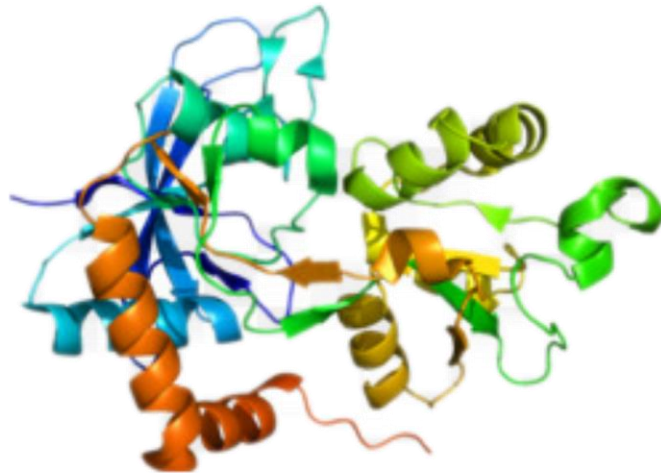
Há milhares de anos, as plantas são utilizadas como agente terapêutico, em diversas formulações, seja na forma de drogas brutas como chás, pós e outras formulações de ervas. Com o isolamento de compostos ativos, como por exemplo, o isolamento da morfina do ópio no início do século XIX, foi possível a utilização destes compostos na forma de medicamento. A descoberta de drogas de plantas medicinais levou ao isolamento de drogas primitivas como cocaína e codeína, dentre outras (BALUNAS; KINGHORN, 2005)

Existem uma grande variedade de produtos naturais, no entanto, apenas uma pequena parte tem suas caracterizações fitoquímicas e potencial biológico estudados. Fazendo com que seja necessário cumprir algumas etapas (extração, isolamento, identificação e obtenção de análogos estruturais dos metabólitos biologicamente ativos), associado ao conhecimento toxicológico e o potencial farmacológico da substância são

indispensáveis para obtenção de novos agentes terapêuticos. Por fim, trazendo a necessidade da realização de ensaios biológicos (ALMEIDA JUNIOR, 2019).

Apesar do grande quantitativo de fármacos disponíveis para o tratamento da dor, há uma incessante e necessária busca por novos compostos com atividade efetiva, tendo em vista as limitações existentes nos tratamentos disponíveis no mercado, como os efeitos adversos. A dor apresenta diferentes vias de sinalização, o que faz com que seja necessário a utilização de diferentes modelos experimentais que diferencie uma possível atividade nociceptiva de um composto natural por mecanismos centrais ou periféricos (resposta inflamatória) (ALMEIDA JUNIOR, 2019; SILVA et al., 2013).

Os modelos experimentais mais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais, são subdivididos em modelos de nocicepção por estímulos químicos (contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, dor orofacial induzida pela formalina) térmicos (teste de retirada da cauda (tail-flick), teste da placa quente (hot-plate) e mecânicos (teste de Randall-Selitto, teste de Von Frey). Essas metodologias são bastantes utilizadas por serem modelos simples, rápidos, confiáveis, reprodutíveis e sensíveis para fármacos com efeito antinociceptivos (SILVA, et al. 2013; ALMEIDA, 2019).



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antinociceptiva do álcool cinâmico em estudos *in vivo* (modelos animais) e *in silico* (docking molecular), bem como os mecanismos envolvidos em tais atividades.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar estudo computacional de predição (docking molecular);
- ✓ Verificar a coordenação motora e possíveis sinais de relaxamento muscular em animais tratados com o álcool cinâmico no teste do rota-rod;
- ✓ Analisar a atividade antinociceptiva do álcool cinâmico em modelos de nocicepção químico (teste da formalina, teste do glutamato, teste da capsaicina e teste do ácido acético) e térmico (teste da placa quente).
- ✓ Avaliar a participação da via do glutamato, TRPV1 e óxido nítrico no efeito antinociceptivo do álcool cinâmico.



MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias

Álcool cinâmico (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);

Ácido fosfórico (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Água destilada (LTF/UFPB);

Cloridrato de morfina (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Capsaicina (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

DMSO (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Etanol (LTF / UFPB – Brasil);

Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);

Glutamato (Merck /Sigma-Aldrich Products – E.U.A);

MK-801 (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Sulfanilamida (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

N-(1-Naftil)etilenodiamina (Merck /Sigma-Aldrich Products - EUA);

Solução salina (NaCl);

Tween 80 (Vetec – Brasil).

4.1.2 Preparação do Álcool cinâmico

A substância utilizada foi o álcool cinâmico (AC) (Sigma-Aldrich Products – Cinnamyl alcohol 0.98; CAS No.: 104-54-1), cedida pelo professor Dr. Damião Pergentino de Sousa do Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB. Peso molecular 134,178 g / mol, ponto de ebulição 250,0 ° C / 760 mmHg, Densidade 1,0397 a 35 ° C, solúvel em água e glicerol (PUBCHEM, 2021).

Minutos antes do início do teste, o AC foi solubilizado em Tween 80 (Polissorbato 80) a 1% e em solução salina (NaCl 0,9%), utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do camundongo. O AC foi preparado nas doses de 6,25mg/kg; 12,5 mg/kg e 25 mg/kg para administração pela via intraperitoneal (i.p.) (ANDRADE et al, 2020). Como controle negativo, utilizou-se Tween 80 a 1% em solução salina (NaCl 0,9%) ou água destilada (CLARK, MCCRACKEN, ANNA 1971).

As demais substâncias, em suas respectivas doses, foram dissolvidas em água destilada ou solução salina (NaCl 0.9% + Tween 80 a 1%) ou DMSO + álcool 99%. Todas as doses das substâncias foram injetadas no volume de 0,1 mL/ 10g de animal pela via intraperitoneal. As únicas exceções foram a formalina, capsaicina e o glutamato as quais foram injetadas na proporção 20µL/pata (intraplantar).

4.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos, entre dois e três meses de vida, pesando entre 25-35 g, provenientes da Unidade de Produção Animal UPA/IPeFarM/UFPB. Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas de polietileno, contendo, no máximo, 8 camundongos por caixa, os quais permaneceram sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas cada, com livre acesso a uma ração tipo pellets (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno.

4.1.4 Condições experimentais e procedimentos éticos

Todos os procedimentos experimentais (*in vivo*) foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (Psifarm/IPeFarM) no período compreendido entre as 13:00 e as 17:00 horas. Os animais foram pesados, separados em grupos de no 8 por gaiola e transferidos para o local de

realização dos testes, um dia antes, a fim de permitir sua ambientação e minimizar o estresse provocado pela exposição a um novo ambiente.

As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixo teor (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

Todo protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba-Brasil, sob certificado CEUA nº 1648220719 (ID 000783).

Os testes *in silico* (docking molecular) foram realizados no Laboratório de Quimioinformática, da Universidade Federal da Paraíba, com a colaboração do professor Dr. Marcus Tullius Scotti.

Fluxograma Experimental

Estudo *in silico*

Docking molecular

Estudo *in vivo*

Teste do Rota Rod

Atividade Antinociceptiva	Mecanismo de Ação
---------------------------	-------------------

Teste do Ácido Acético

Teste do Glutamato

Teste da Formalina

Teste da Capsaicina

Teste da Placa Quente

Quantificação de Nitrito

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Estudo *in silico*

O estudo *in silico* de possíveis alvos terapêuticos é uma alternativa necessária antes de procedimentos experimentais *in vivo*, uma vez que permite uma rápida análise e compreensão dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade farmacológica e consequentemente redução nos gastos no processo da descoberta de novos fármacos (BALAKRISHNAN; RAJ; KANDAKATLA, 2015).

4.2.2 Docking molecular

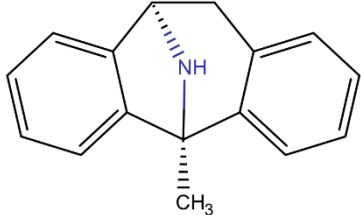
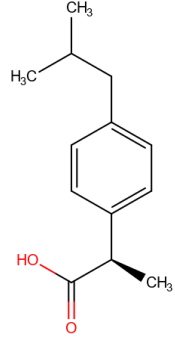
O docking molecular foi utilizado para investigar o mecanismo de ação do composto AC na a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória através da afinidade de ligação do AC e as enzimas selecionadas no estudo. Para isso, foi obtido estruturas 3D de duas enzimas do *Homo sapiens* do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1977). Após a busca no banco de dados (tabela 3), duas proteínas foram selecionadas, e as informações detalhadas sobre elas podem ser visualizadas na tabela 1. Inicialmente, todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado para verificar o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece a pose mais próxima à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for aproximado a 2,0 Å.

4.2.2.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0

Usamos o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) com os parâmetros predefinidos no mesmo software. Medicamentos foram usados como padrão para definir o sítio ativo das enzimas selecionadas e comparar os resultados de energia de ligação com o AC. Em seguida, os compostos foram importados em formato SDF (Standard Database Format) para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score e Rerank score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corre. A função de

pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas e ligações de hidrogênio internas.

Tabela 1. Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	PDB ID	Medicamento	Resolução
NMDA	5I2N	 MK-801	2.12 Å
COX2	5KIR	 Ibuprofeno	2.70 Å

4.2.3 Estudo *in vivo*

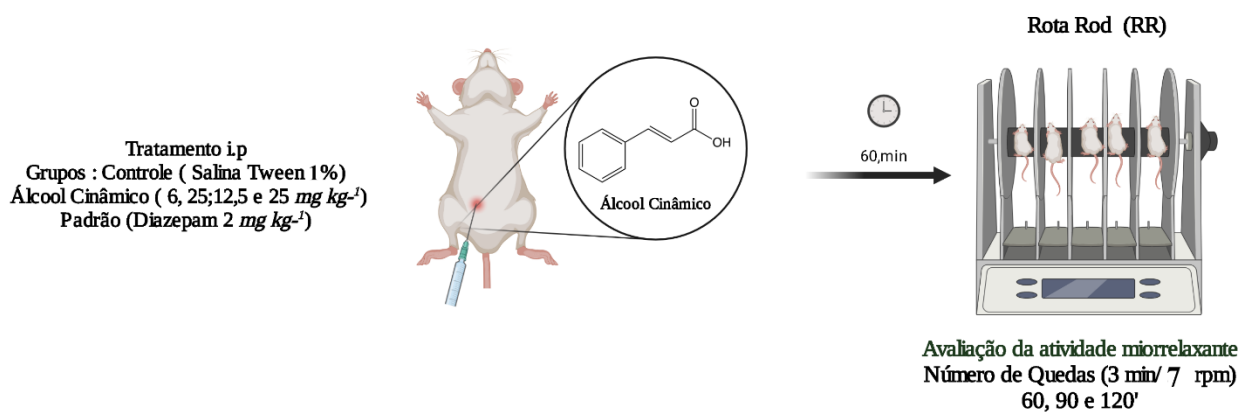
Na psicofarmacologia o uso de modelos animais é uma estratégia para análise de causas genéticas, ambientais e farmacológicas que podem apresentar sintomas homólogos a de humanos com determinado distúrbio. Podendo-se desta maneira investigar os possíveis efeitos e mecanismos de ação de substâncias específicas no Sistema Nervoso Central (SNC) (ALMEIDA JUNIOR, 2019; BOURIN, 2015).

4.3.1 Teste do Rota Rod

O teste do rota-rod, foi inicialmente descrito por (DUNHAM; MIYA, 1957), e tem como intuito avaliar uma possível atividade miorelaxante ou neurotóxica de substâncias com perfil depressor no SNC. Esta metodologia avalia a coordenação motora por meio da capacidade do camundongo em caminhar/equilibrar-se sobre uma barra giratória em uma velocidade constante (ALMEIDA, 2006; PRITCHETT; MULDER, 2003). Um dia antes da realização do teste os animais foram pré-selecionados, onde foram considerados aptos para o teste aqueles que permaneciam na barra giratória (7 r.p.m.) por, pelo menos, 3 minutos em três tentativas.

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, posteriormente os animais foram tratados com o álcool cinâmico (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg, i.p), o grupo controle recebeu salina e Tween 80 a 1%, e o grupo padrão recebeu diazepam 2 mg/kg. i.p. Após 60 minutos, os animais foram colocados no aparelho. Para cada animal foi registrado o tempo de permanência total na barra, em um período de até 3 minutos, sendo o limite máximo de três quedas para cada animal (DUNHAM; MIYA, 1957). Os animais foram avaliados nos tempos de 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos (figura 8).

Figura 8. Esquema experimental do teste do rota rod.

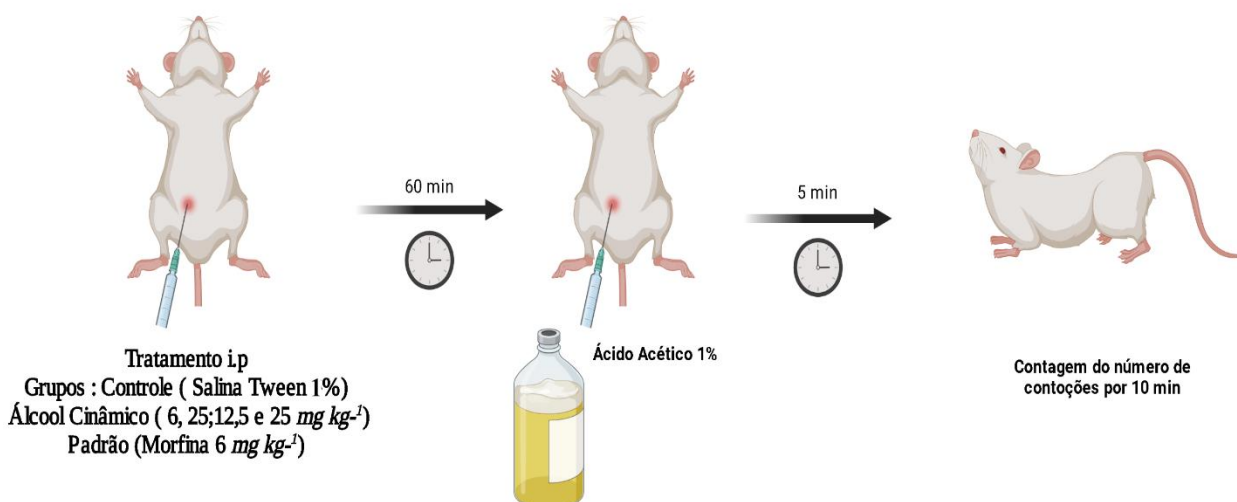


4.3.2 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é bastante utilizado na triagem de substâncias com potencial efeito antinociceptivo (ALMEIDA JUNIOR, 2019). A administração intraperitoneal do ácido acético causa uma resposta dolorosa visceral no abdômen caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, citocinas e eicosanoides) e ativação de neurônios nociceptivos (MING-TATT et al., 2012; REJÓN-ORANTES et al., 2013), essa irritação no peritônio é caracterizada pela contração abdominal e pelo alongamento das patas traseiras (figura 9) (COLLIER et al., 1968).

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n=8) e pré-tratados com veículo, álcool cinâmico (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg, i.p.) ou morfina (6 mg/kg, i.p.). Após sessenta minutos dos tratamentos iniciais, administrou-se uma solução de ácido acético 1% na cavidade peritoneal que provocou uma contorção abdominal. Após 5 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado pelos 10 minutos seguintes. O efeito antinociceptivo foi exibido pela inibição em relação ao número de contorções do grupo controle (KOSTER, 1959).

Figura 9. Esquema experimental do teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético



4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva pelo teste da formalina

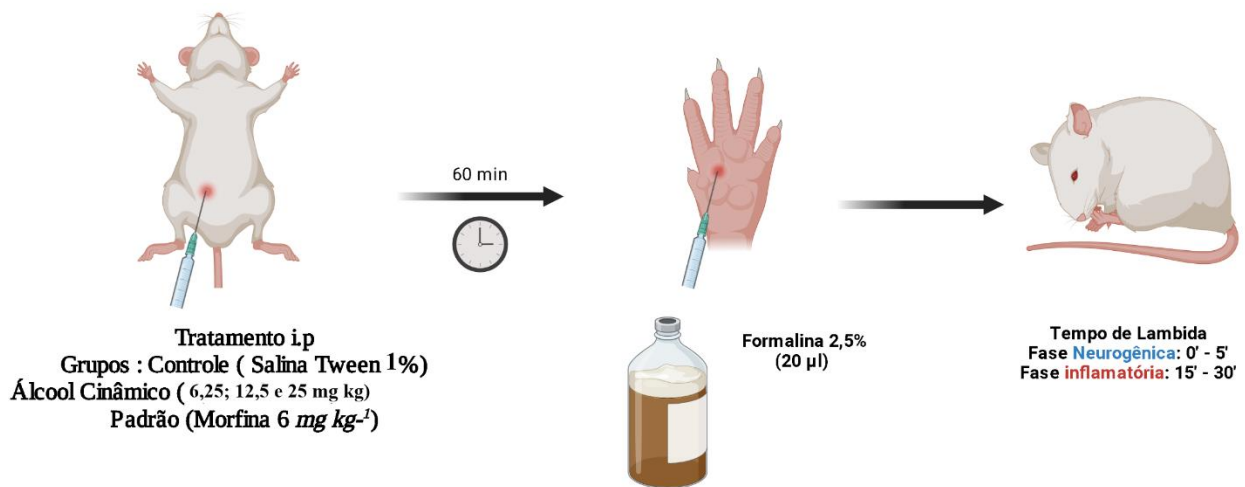
O teste da formalina foi proposto por (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Nesta metodologia administra-se 20µL de uma solução de formalina 2,5% na região subplantar da pata posterior direita do animal, o que induz à estimulação dos nociceptores, sendo a redução do tempo de lambida da pata considerado indicativo de resposta antinociceptiva (ALMEIDA JUNIOR, 2019). O teste é composto por duas fases, uma neurogênica e outra inflamatória (SHIBATA et al., 1989).

A primeira fase ocorre nos cinco primeiros minutos após a injeção da formalina e, provavelmente, é resultante da estimulação direta dos nociceptores, levando a uma resposta neurogênica. A inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam em nível central. Em seguida, há um período chamado de interfase (5-15 min), que é caracterizado pelos mecanismos endógenos de supressão da dor (GAUMOND; SPOONER; MARCHAND, 2007). A segunda fase (15-30 minutos) é caracterizada por um processo inflamatório, gerada tanto pela estimulação de nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Foram utilizados cinco grupos de 8 camundongos, onde administrou-se pela via intraperitoneal os tratamentos, grupo veículo e os três grupos experimentais com álcool cinâmico (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg), o grupo controle positivo foi tratado com a droga padrão do teste, morfina a 6 mg/kg.

Transcorridos 60 minutos dos tratamentos, injetou-se a solução de formalina 2,5% na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos (figura 10), em seguida, esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo de lambida da pata que recebeu a formalina nas duas fases do teste.

Figura 10. Esquema experimental do teste da formalina.



4.3.4 Teste da Placa Quente

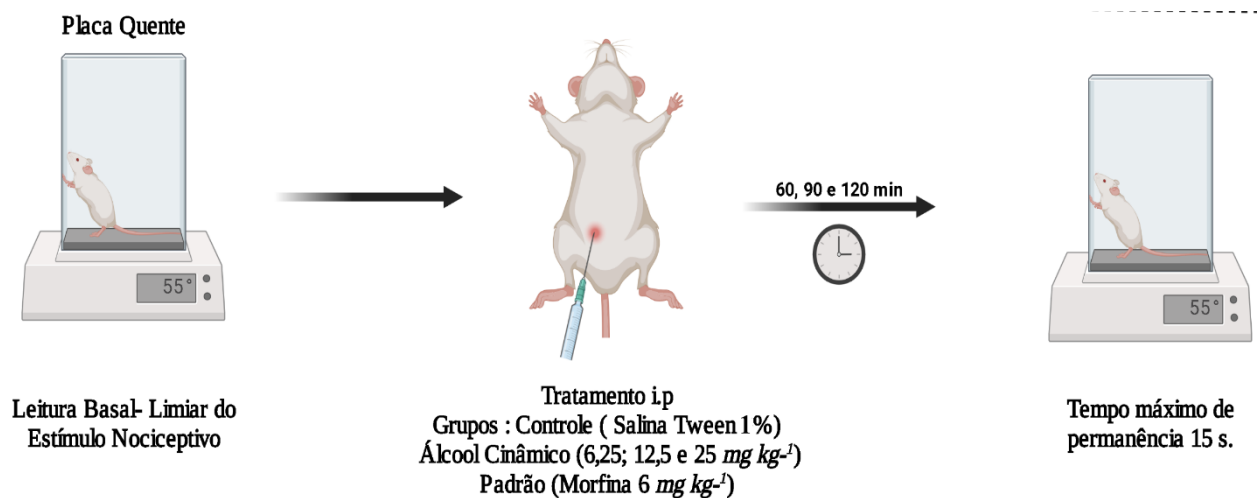
O teste da placa quente foi descrito inicialmente por Woolfe e Macdonald (1944) e modificado por Eddy e Leimbach (1953), o teste consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, o animal é colocado sobre uma superfície metálica (55°C) sendo contabilizado o tempo em segundos até o mesmo apresentar o comportamento de tentativa de pular, sendo essa resposta indicativa de nocicepção (ALMEIDA JUNIOR, 2019).

O estímulo térmico do teste da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais já que são respostas nociceptivas integradas supraespinhalmente (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI; CHIBA, 2002). Esse estímulo é caracterizado por uma ativação dos nociceptores (fibras C e A σ) responsáveis por conduzir o impulso nervoso ao corno dorsal da medula espinhal e aos centros corticais (DICKENSON, 1997).

Uma hora antes do início do teste os animais foram pré-selecionados, onde não houve administração de qualquer substância, no intuito de se avaliar a sensibilidade dos mesmos ao estímulo térmico, sendo considerados aptos os animais que apresentassem a resposta indicativa de nocicepção no período inferior a 8 segundos, quando colocados sobre a placa (leitura basal). Para este experimento, cinco grupos de 8 camundongos, receberam pela via intraperitoneal (i.p) os tratamentos, o grupo veículo, os três grupos

experimentais com AC (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg) e o grupo controle positivo foi tratado com a droga padrão do teste, morfina a 6 mg/kg. Posteriormente, após os respectivos tratamentos, os animais foram submetidos à avaliação decorridos 60, 90 e 120 minutos dos tratamentos iniciais (figura 11). O tempo máximo de permanência na placa foi de 15 segundos, para minimizar danos teciduais (PARK; CHA; JEON, 2011).

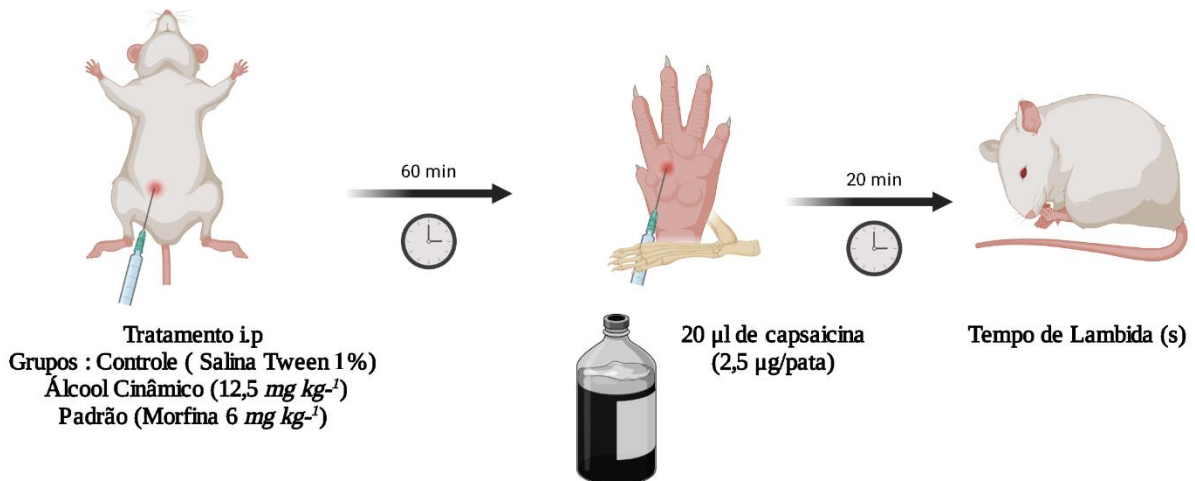
Figura 11. Esquema experimental do teste da placa quente.



4.3.5 Teste de nocicepção induzida por capsaicina

O teste de nocicepção induzida por capsaicina seguiu o procedimento utilizado por Santos e Calixto (1997). Foi administrado 20 μ l de capsaicina (2,5 μ g/pata feita com DMSO, álcool 99% e água destilada, na proporção 8:1:1) sob a pele da superfície dorsal da pata traseira direita dos camundongos. Os animais foram observados individualmente por 20 minutos após a injeção de capsaicina. O tempo gasto lambendo a pata injetada foi cronometrado e foi considerado como indicativo de dor. Os animais foram tratados com AC 12,5 mg/kg, controle (veículo) ou Morfina 6 mg/kg (i.p), uma hora antes de receber a injeção intraplantar de capsaicina (figura 12).

Figura 12. Esquema experimental do teste da capsaicina.



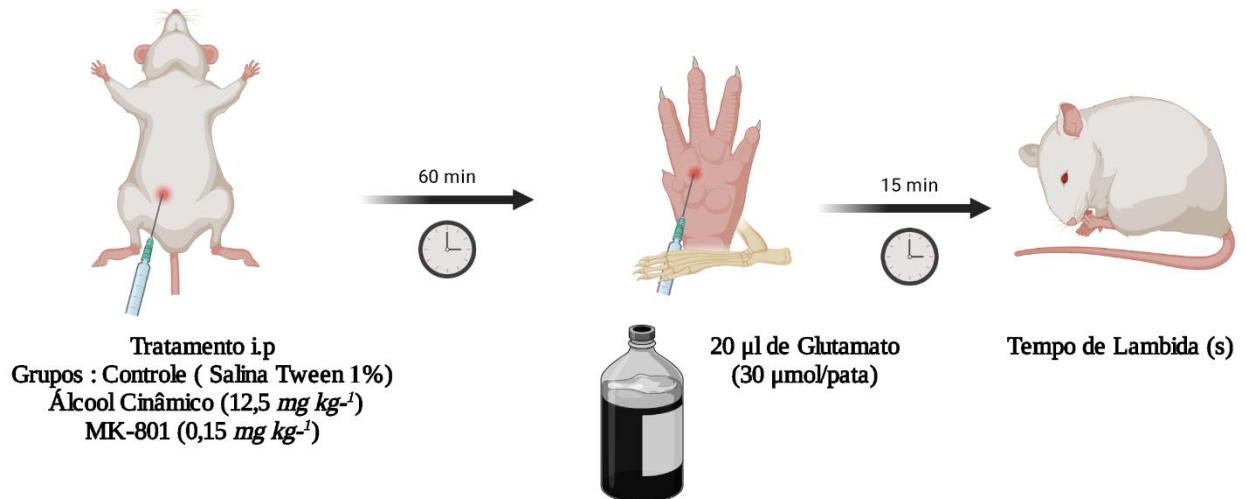
4.3.6 Teste da nocicepção induzida pelo glutamato

O glutamato é o principal aminoácido excitatório liberado pelo sistema nervoso central e periférico em respostas nociceptiva. Utilizamos o teste do glutamato como modelo de dor periférica e central. O procedimento foi descrito anteriormente por Beirith; Santos; Calixto (2002). Um volume de 20 µL de glutamato (30 µmol / pata) foi injetado por via intraplantar na superfície dorsal da pata traseira direita do camundongo. Os animais foram observados individualmente por 15 minutos após a injeção de glutamato, pois estudos anteriores sugeriram que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato a 30 µmol/pata é evidente durante os primeiros 15 minutos após a injeção, mas quase ausente depois (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Com a administração do glutamato há uma ativação direta das fibras aferentes primárias, culminando numa liberação de mediadores inflamatórios e neuropeptídios, bem como ativação dos receptores glutamatérgicos (BORDI; UGOLINI, 1999). A literatura aponta que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato está relacionada a receptores de NMDA e não-NMDA localizados na região espinhal, supraespinhal e periférica (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). A quantidade de tempo gasto lambendo a pata injetada foi registrada com um cronômetro e foi considerada indicativa de nocicepção.

Os grupos de camundongos (n=8) foram pré-tratados por veículo, álcool cinâmico (12,5 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.). Após uma hora das administrações, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µL de uma solução de glutamato (30

$\mu\text{mol/pata}$) na pata posterior direita e, logo em seguida, foram colocados individualmente em caixas de observação. O parâmetro observado foi o tempo de lambida da pata que foi registrado por 15 minutos após a injeção do glutamato (figura 13).

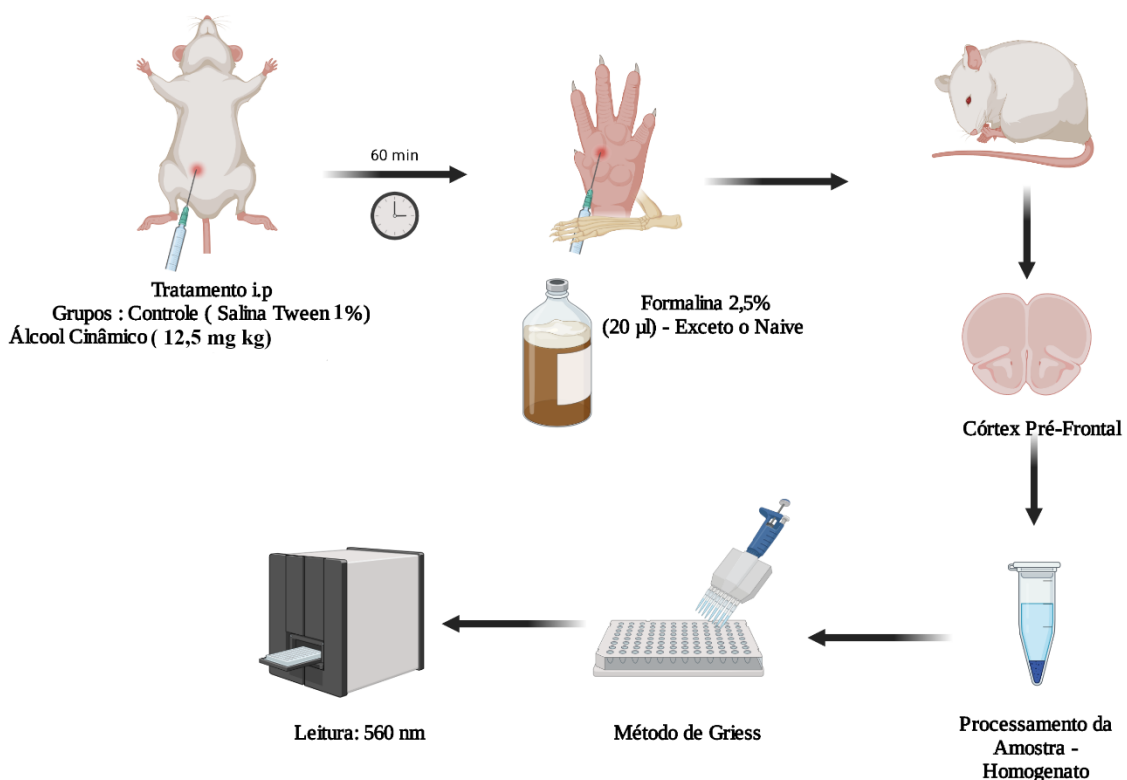
Figura 13. Esquema experimental do teste do glutamato



4.3.7. Determinação de nitrito por espectrofotometria

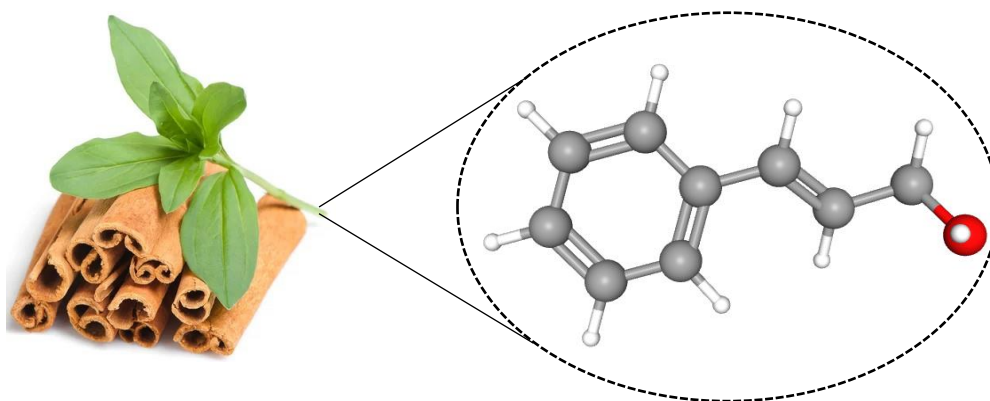
Para determinação de nitrito utilizamos quatro grupos de camundongos (n=8), o grupo naïve (não recebeu tratamento), grupo AC (12,5 mg/kg i.p) e Salina (NaCl 0,9%). Passado uma hora após os respectivos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de nocicepção induzido por formalina (com exceção do grupo naïve), findado o teste, foi coletado o córtex pré-frontal dos camundongos. Os níveis de nitrito na região cerebral do camundongo foi determinado pela reação de Griess (GREEN AND GOLDMAN, 1981; RADENOVIC AND SELAKOVIC, 2005). O homogenato foi centrifugado (800g/10min), o sobrenadante foi coletado e adicionado o reagente de Griess (sulfanilamida 1 %/ N-(1-Naftil)etilenodiamina 0.1% / ácido fosfórico 5% / água destilada, 1:1:1:1) e incubado, em temperatura ambiente, por 10min (figura 14). A concentração de nitrito foi expressa em nM de nitrito/g de tecido e absorbância das amostras foi determinada a 560nm (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005).

Figura 14. Esquema experimental da quantificação de nitrito pelo método de Griess.



4.4 Análise estatística

A partir do teste de normalidade (D'agostino test) os dados *in vivo* foram analisados usando análise de variância unilateral (ANOVA “one way”), teste de Tukey para comparação entre as médias. Os dados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão (DP) e os valores foram considerados significativos quando apresentaram um nível de significância de 95%, ou seja (p) menor que 0,05 ($p < 0.05$).



RESULTADOS

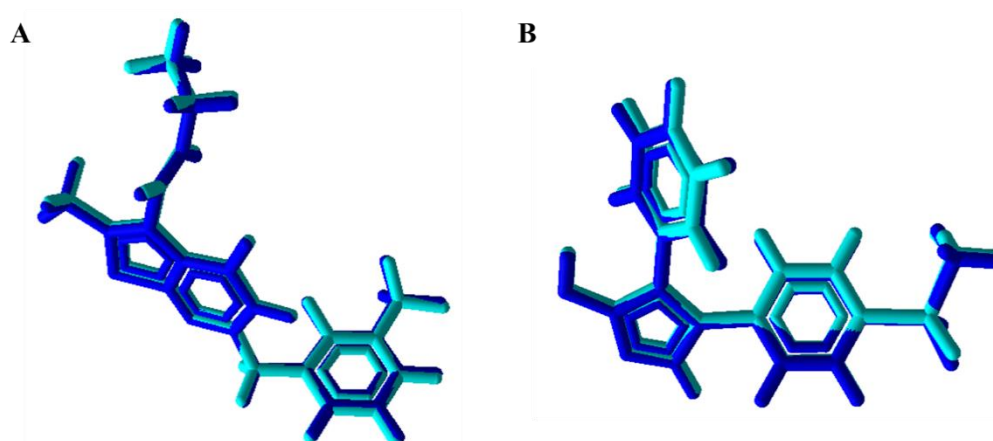
5. RESULTADOS

5.1 Docking molecular

O AC foi submetido ao acoplamento molecular nas proteínas NMDA e COX2 para investigação mecanismo de ação do álcool cinâmico. Os resultados de docking foram gerados usando a função de pontuação Moldockscore e Rerankscore. Valores mais negativos indicaram melhores previsões. Foi considerado um bom resultado quando o composto AC obteve valores de energia de ligação próximo ao medicamento em pelo menos uma função de pontuação.

Os resultados de docking gerados pelas funções de pontuação foram validados pelo *redocking* do ligante cristalográfico com todas as proteínas investigadas. Os desvios da raiz quadrada média (RMSDs) das poses obtidas no *redocking* foram calculadas em comparação com a estrutura cristalina. Os valores RMSD inferiores a 2 Å indicam um grau ideal de confiabilidade do acoplamento. Durante a análise de *redocking*, observamos que os valores RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo. O ligante cristalográfico do NMDA apresentou RMSD 0.11 Å e o ligante complexado à COX2 apresentou RMSD 0.22 Å (Figura 15). Os valores foram considerados satisfatórios e o Docking considerado confiável.

Figura 15. Sobreposição da pose do redocking e estrutura do ligante cristalográfico. A – Ligante cristalográfico do NMDA e B- ligante cristalográfico da COX2.



Os resultados de docking podem ser visualizados nas tabelas 2 e 3. O AC obteve bons resultados nas duas proteínas investigadas quando comparados com os resultados obtidos pelos fármacos. Para a proteína NMDA, observamos que o AC obteve valor de

energia Rerankscore superior ao MK-801, com valores -65.09 kcal/mol para o AC e -3.10 kcal/mol para o MK-801 (tabela 2). Porém, quando comparado com os valores de Moldock score, o medicamento apresentou uma maior afinidade de ligação. Para a enzima COX2, o AC obteve valores de energia de ligação próximos aos valores do ibuprofeno.

Tabela 2. Valores de energia de ligação analisadas nas enzimas selecionadas no estudo usando o AC e os medicamentos (MK-801 e ibuprofeno).

Proteína	AC		Fármaco	
	Moldock score	Rerank score	Moldock score	Rerank score
NMDA	-80.36	-65.09	-99.56	-3.10
COX2	-64.53	-53.96	-92.85	-79.22

Analizamos as interações detalhadamente formadas pelo AC com as proteínas investigadas. O composto AC conseguiu formar uma ligação estável de hidrogênio com a Pro129, uma interação de van der Waals com a Tyr144 e três interações hidrofóbicas com a Pro141, Thr242 e His273 com o sítio ativo da proteína NMDA. Enquanto que o MK-801 formou interações mais fracas quando comparadas com o AC (Figura 16). Foram observadas quatro interações hidrofóbicas com os aminoácidos Pro129, Pro141, Tyr144 e His273, além de uma interação estérica com o resíduo Thr242. Enquanto que na enzima COX2, o composto AC formou duas ligações de hidrogênio com os resíduos Leu352 e Ser353, três interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val349, Val523 e Ala527 e uma interação de van der Waals com o aminoácido His90 com o sítio ativo da enzima. O ibuprofeno formou nove interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val349, Ala527, Leu352, Arg513, Phe518, His90, Ala516, Ile517 e Val523 (Figura 17).

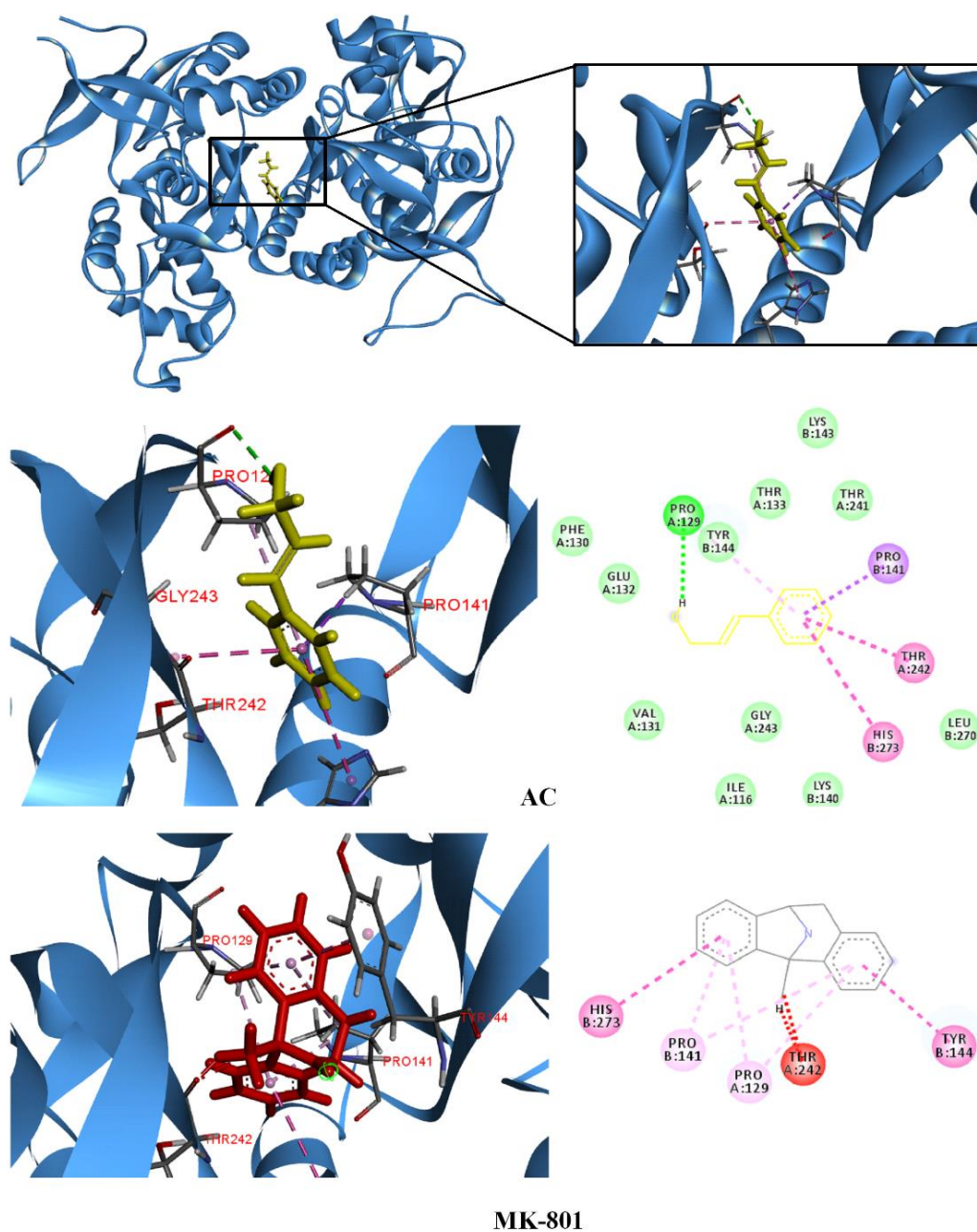


Figura 16. Interações 2D e 3D entre o AC, o MK-801 e a proteína NMDA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro; as ligações de Van der Waals são destacadas em verde claro; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

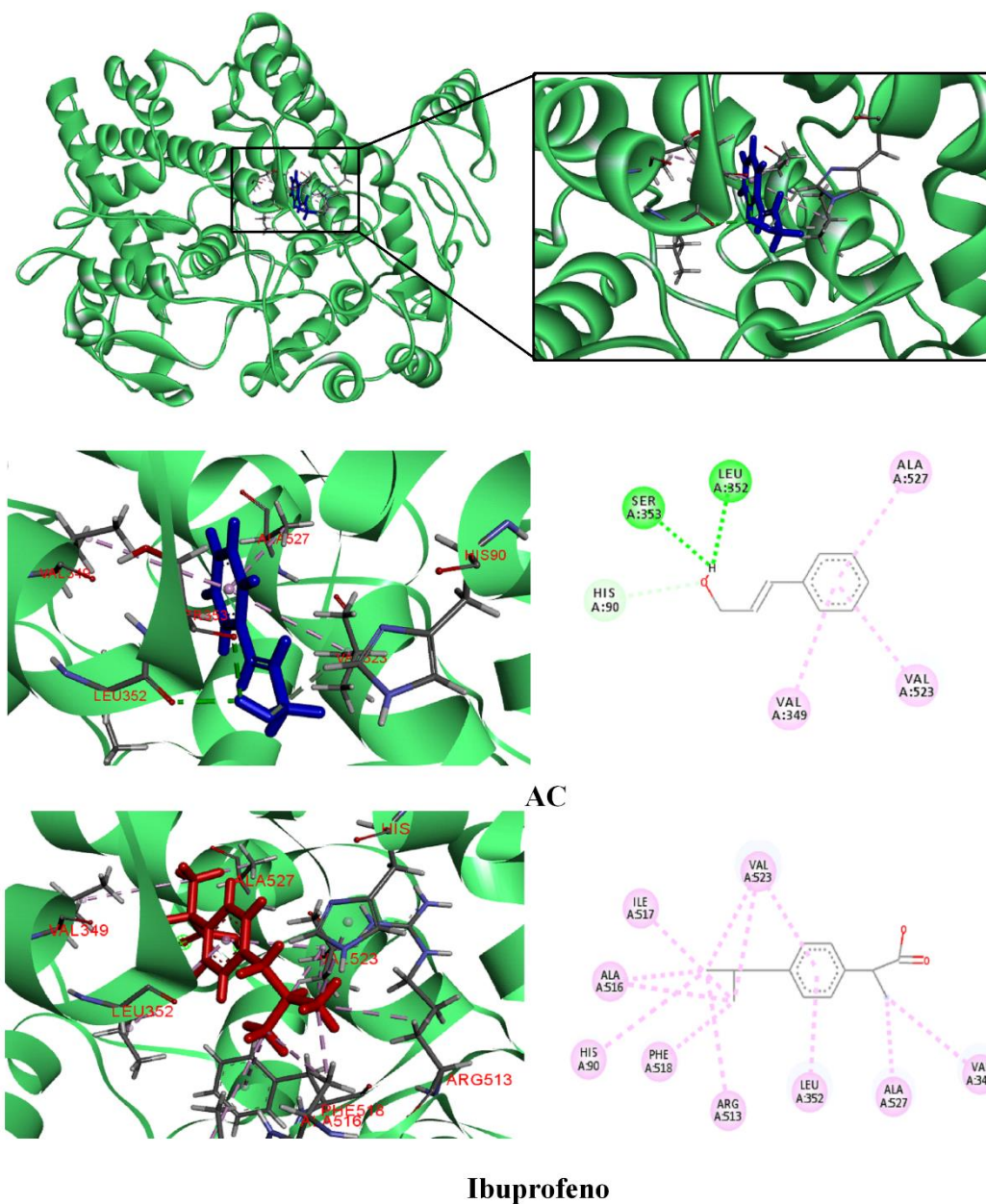


Figura 17. Interações 2D e 3D entre o AC, o ibuprofeno e a proteína COX2. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro; as ligações de Van der Waals são destacadas em verde claro; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

Tabela 3. Outras proteínas estudadas

Molécula PDB	Receptor	Agonista/ Energia de ligação	Antagonista/ Energia de ligação	Conclusão
4DJH	K (kappa) opioide	Nalbufina (-111,52) Morfina (-92,5) AC (-67,74)	-----	O AC não foi um bom agonista
6PT2	σ (delta) opioide	leu-encefalina (-121,82) AC (-44,09)	-----	O AC não foi um bom agonista
5C1M	μ (mu) opioide	Morfina (-78,95) AC (-47,98)	-----	O AC não foi um bom agonista
5WEK	NMDA (GluA2)	-----	AP5 (-86,36) Cetamina (-55,54) AC (-62,9)	O AC foi um bom antagonista
4NF5	NMDA (GluN1 e GluN2A)	-----	AP5 (-83,32) Cetamina (-65,1) AC (-55,22)	O AC foi um bom antagonista
6FQH	AMPA (GluA2)	-----	NBQX (-117,32) CNQX (-98,71) AC (-54,92)	O AC não foi um bom antagonista
3D7D	AMPA (GluR2)	-----	NBQX (-131,26) CNQX (-108,24) GYKI 52466 (-113,49) AC (-73,25)	O AC não foi um bom antagonista
4F1Y	KAINATO (GluA3)	-----	NBQX (-113,49) CNQX (-119,14) AC (-70,96)	O AC não foi um bom antagonista
3KS9	Grupo 1 (mGluR1)	-----	DL-AP3 (-71,54) AC (-47,98)	O AC não foi um bom antagonista
4OO9	Grupo 1 (mGluR5)	-----	MTEP (-101,46) Acamprosate (-80,64) AC (-78,57)	O AC foi um bom antagonista
4XAS	Grupo 2 (mGluR2)	LY354740 (-114,82) DCG-IV (-121,47) AC (-72)	-----	O AC não foi um bom agonista

6B7H	Grupo 2 (mGluR7)	LY354740 (-125,26) LY3441495 (-172,73) AC (-73,8)	-----	O AC não foi um bom agonista
6BT5	Grupo 3 (mGluR8)	1S 3R-ACPD (-96,84) L-AP4 (-100,78) AC (-73)	-----	O AC não foi um bom agonista
3VGA	A2A (adenosina)	CGS-21680 (-162,72) ligante PDB (-134,09) AC (-58,47)		O AC não foi um bom agonista
6OL9	M5 (muscarínico)	ligante PDB (-162,69) AC (-60,36)		O AC não foi um bom agonista
6D9H	A1 (adenosina)	RPia(R(-)N6-(2-fenilisopropil) (-66,26) AC (-38,52)		O não AC foi um bom agonista
4MQT	M2 (muscarínico)	ligante PDB (-135,55) AC (-73,14)	Atropina (-121,89) AC (-59,57)	O não AC foi um bom agonista

5.2 Rota Rod

No teste do Rota Rod os camundongos que tratados com AC nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg não apresentaram alterações significativas no tempo de permanência na barra giratória (coordenação motora), em relação aos animais do grupo controle. Esta constatação se deu nos três tempos de observação, ou seja, aos 60' (6,25 mg/kg: $135 \pm 26,7$ vs. $165 \pm 15,2$), (12,5 mg/kg: $135 \pm 26,3$ vs. $165 \pm 15,2$), (25 mg/kg: $139 \pm 21,6$ vs. $165 \pm 15,2$) [F (4, 35)] = 38,3 $P < 0,0001$], 90' (6,25 mg/kg: 144 ± 15 vs. $150 \pm 6,1$), (12,5 mg/kg: $157 \pm 13,7$ vs. $150 \pm 6,1$), (25 mg/kg: $155 \pm 16,3$ vs. $150 \pm 6,1$) [F (4, 35)] = 10,5 $P < 0,0001$], 120' (6,25 mg/kg: $163 \pm 12,3$ vs. $174 \pm 6,3$), (12,5 mg/kg: $161 \pm 12,5$ vs. $174 \pm 6,3$), (25 mg/kg: $158 \pm 15,9$ vs. $174 \pm 6,3$) [F (4, 35)] = 3,9, $P < 0,0090$]. Esses resultados diferem dos observados na substância de referência (padrão), diazepam 2 mg/kg, nos tempos 60' ($42,7 \pm 13,6$) e 90' ($105 \pm 31,7$) (gráfico 1).

Rota rod

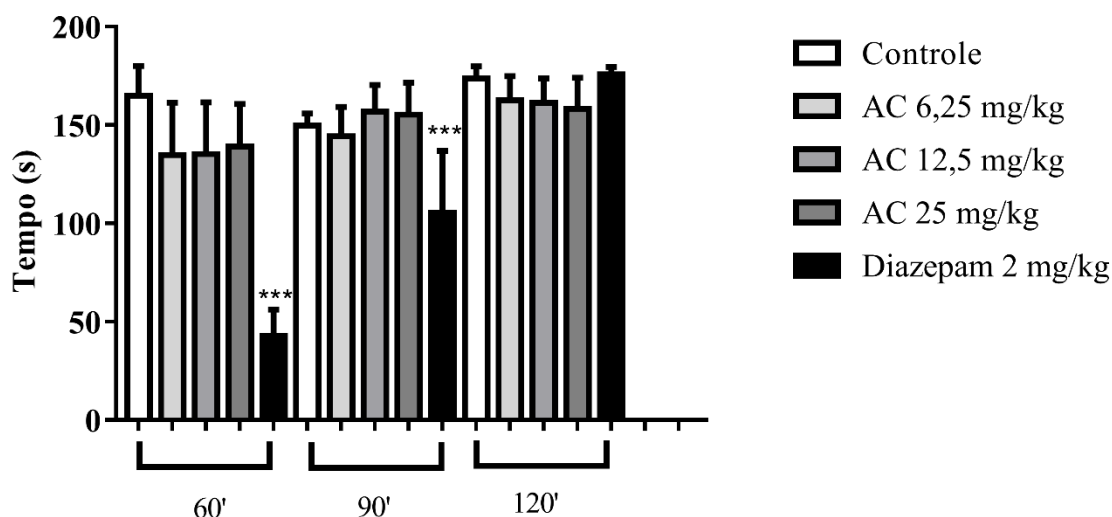


Gráfico 1 - Efeito do álcool cinâmico nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória no teste do Rota Rod. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). *** $p < 0,001$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

5.3 Teste do Ácido Acético

No teste do Ácido Acético, os camundongos tratados com AC nas doses de 6,25 mg/kg ($4,3 \pm 6,1$), 12,5 mg/kg ($2,5 \pm 3,9$) e 25 mg/kg ($0,6 \pm 0,8$) reduziram o número de contorções abdominais (81,9%; 89,3% e 97,2% respectivamente) em comparação ao grupo controle ($23,8 \pm 0,8$) ($p < 0.001$). Os resultados obtidos foram semelhantes aos da substância de referência (padrão), morfina, na dose 6 mg/kg ($0,3 \pm 0,6$) [$F(4, 35) = 41.7$, $P < 0,0001$] (gráfico 2).

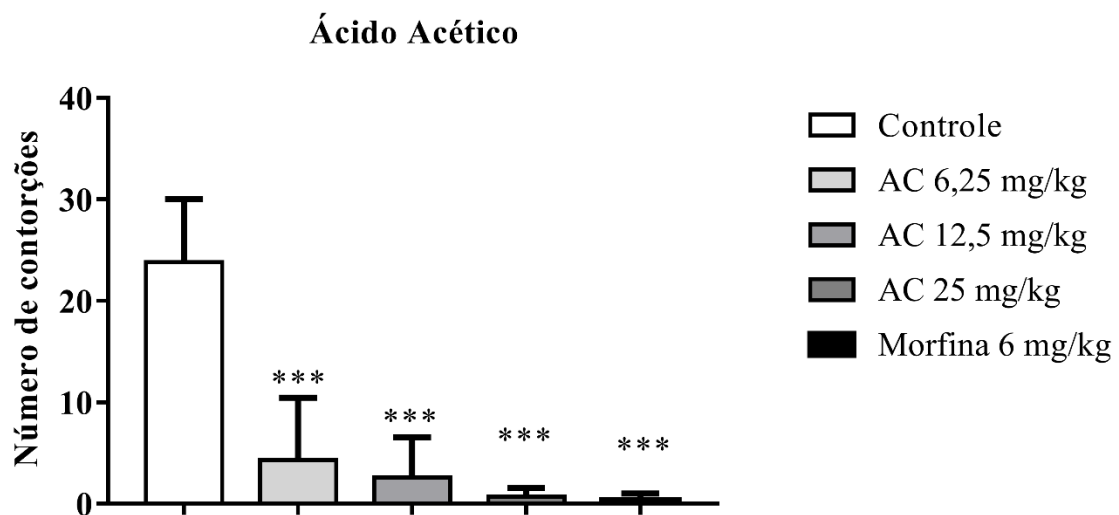


Gráfico 2 - Efeito do álcool cinâmico nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p.) sobre o número de contorções abdominais no teste do Ácido Acético. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). *** $p < 0,001$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações

5.4 Teste da Formalina

Na primeira fase do teste (fase aguda ou neurogênica), correspondente aos cinco primeiros minutos após a administração intraplantar da solução de formalina, foi possível observar que os animais tratados com AC nas doses de 6,25 mg/kg ($41,3 \pm 12,5$ p<0,05), 12,5 mg/kg (33 ± 12 p<0,01) e 25 mg/kg ($29,5 \pm 4,6$ p<0,001) diminuíram significativamente o tempo de lambida da pata ($47,1\%$; $62,9\%$ e $67,5\%$ respectivamente) em relação ao grupo controle ($63,1 \pm 14,4$). Os resultados obtidos foram semelhantes aos da substância de referência (padrão), morfina, na dose 6 mg/kg ($9,8 \pm 6$), $F(4, 35) = 25,3$, $P < 0,0001$] (gráfico 3).

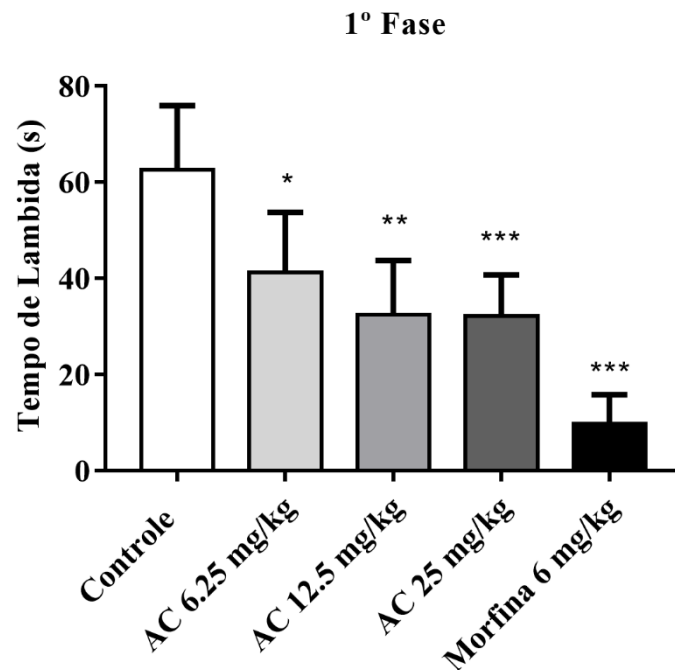


Gráfico 3. Efeito do álcool cinâmico nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p.) sobre o tempo de lambida na pata do camundongo na primeira fase do teste da formalina. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

Na segunda fase do teste (fase tardia ou inflamatória) que corresponde aos quinze minutos finais do experimento, o AC na dose 6,25 mg/kg ($197 \pm 74,5$) não reduziu o tempo de lambida na pata dos animais, quando comparados ao grupo controle ($245 \pm$

88,9). Os animais tratados com AC nas doses de 12,5 mg/kg (116 ± 26.4 , $p < 0,05$) e 25 mg/kg (113 ± 55 , $p < 0,05$) reduziram significativamente (49,8% e 48,7% respectivamente) o tempo de lambida na pata dos camundongos, resultado semelhante ao do grupo morfina 6 mg/kg ($5,17 \pm 3,6$, $p < 0,001$) [$F(4, 35) = 21,9$, $P < 0,0001$] (gráfico 4).

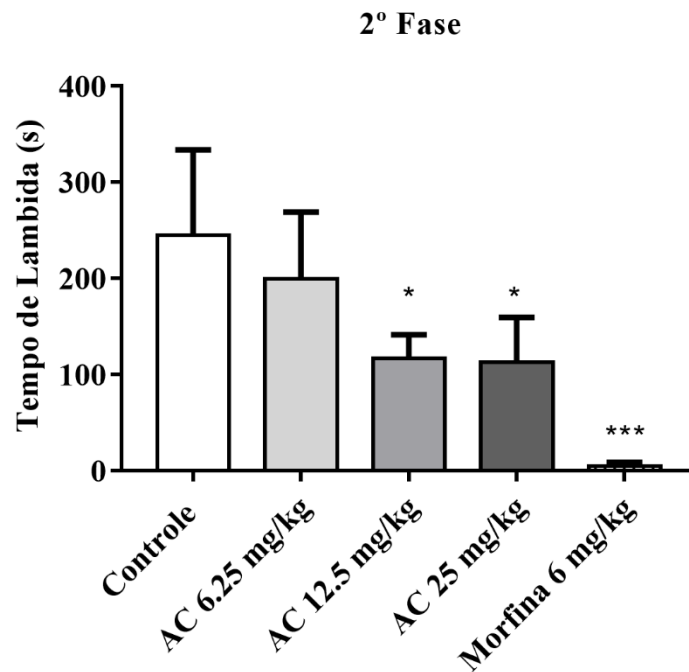


Gráfico 4. Efeito do álcool cinâmico nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p.) sobre o tempo de lambida na pata do camundongo no teste da formalina (2º fase). Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

5.5 Placa Quente

No teste da Placa Quente, os camundongos passaram inicialmente pelo teste, antes dos tratamentos, para que pudéssemos obter uma leitura basal (tempo zero) de cada grupo. Este teste é necessário para que possamos acessar o comportamento dos camundongos sem tratamento frente ao desafio da placa aquecida. Não foi observado diferença estatística entre os grupos: controle ($5,33 \pm 1$) vs. AC 6,125 ($6,58 \pm 1,5$) vs. AC 12,5 mg/kg ($6,42 \pm 0,8$) vs. AC 25mg/kg ($6,17 \pm 1,8$) vs. Morfina 6 mg/kg ($5,8 \pm 0,8$) [F (4, 35) = 1,17, $p < P=0,3399$]. Em seguida, após o tratamento com AC, a dose de 6.25 mg/kg, apresentou resultado significativo nos tempos de 60' (6,25 mg/kg: $10 \pm 3,1$) [F (4, 35) = 17,6 $p < 0,0001$], 90' (6,25 mg/kg: $10,5 \pm 4,2$) F (4, 35) = 17,7 $P < 0,0001$] e 120' (6,25 mg/kg: $11,4 \pm 3,9$) F (4, 35) = 13,6 $p < 0,0001$], aumentando a latência para saltar em relação ao grupo controle ($6,3 \pm 1,5$; $5,4 \pm 1,3$; $5,3 \pm 1,3$). A dose de 12,5 mg/kg também apresentou um aumento significativo na latência para o salto em comparação ao grupo controle, nos três tempos analisados, 60' (12,5 mg/kg: $10,9 \pm 2,7$), 90' (12,5 mg/kg: $9,3 \pm 3,4$), 120' (12,5 mg/kg: $9,1 \pm 3$). A dose de 25 mg/kg nos tempos de 60' (25 mg/kg: $9 \pm 2,5$), 90' (12.5 mg/kg: $9,1 \pm 3,4$), e 120' (25 mg/kg: $9,7 \pm 3,5$) também aumentou a latência para o salto, assim como a morfina (6 mg/kg) aumentou o a latência de reação em todos os tempos testados (60' 15 ± 0 ; 90' 15 ± 0 ; 120' 15 ± 0) (60' 15 ± 0 ; 90' 15 ± 0 ; 120' 15 ± 0) (gráfico 5).

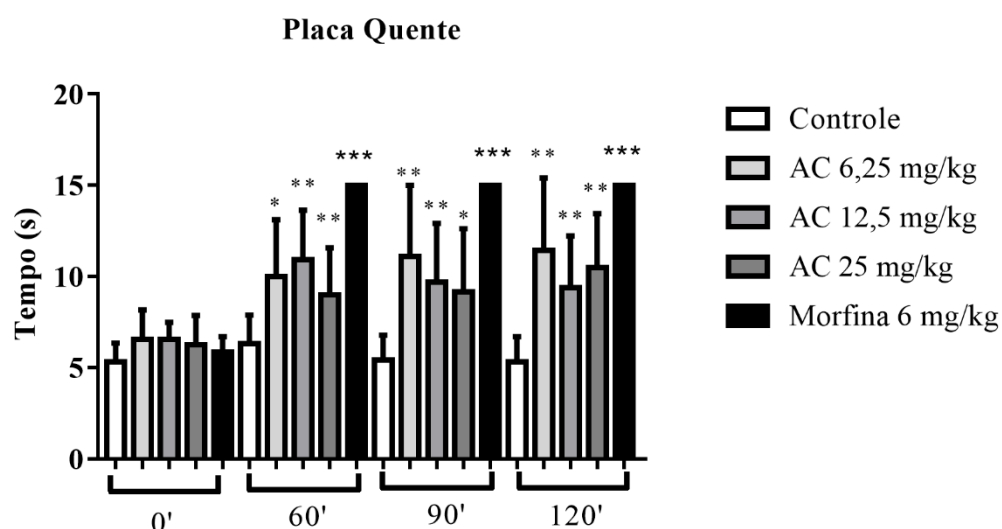


Gráfico 5 - Efeito do álcool cinâmico nas doses de 6,25 mg/kg; 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p.) sobre a latência de retirada da pata no teste da placa quente. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

5.6 Nocicepção induzida por capsaicina

No teste da capsaicina, os camundongos tratados com AC na dose de 12,5 mg/kg ($55,8 \pm 39,1$) reduziram o tempo de lambida (48,6 %) em comparação ao grupo controle ($124,9 \pm 57,3$) ($p < 0.001$). Os resultados obtidos foram semelhantes aos da substância de referência (padrão), morfina, na dose 6 mg/kg ($3,6 \pm 2,9$) [$F(2, 21) = 18,4$, $P < 0,0001$] (Gráfico 6).

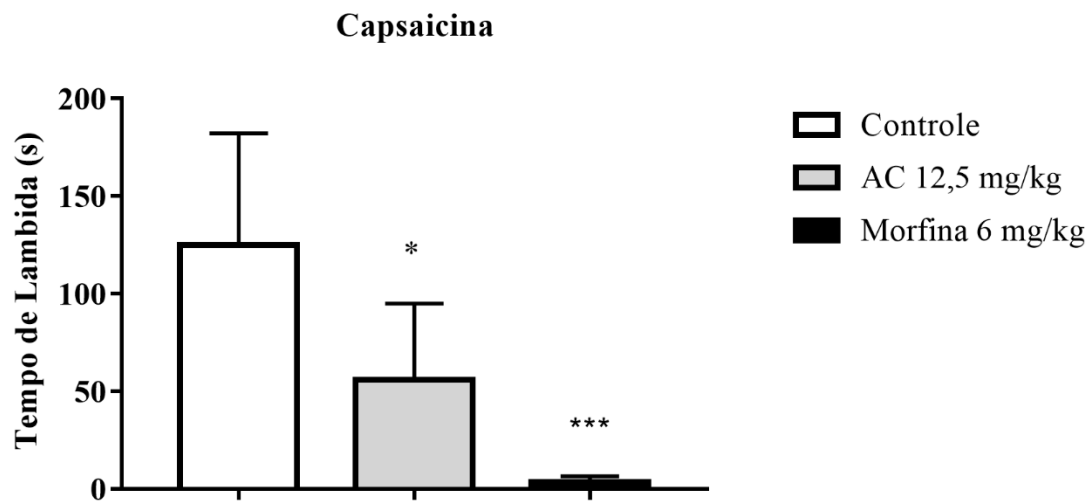


Gráfico 6. Efeito do AC na dose de 12,5 mg/kg (i.p.) sobre o tempo de lambida na pata do camundongo no teste da capsaicina. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP ($n=8$). * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

5.7 Teste da nociceção induzida pelo glutamato

No teste do glutamato os animais tratados com AC na dose de 12,5 mg/kg i.p ($55,2 \pm 13$) e MK-801 na dose de 0,15 mg/kg i.p ($25 \pm 25,4$) diminuiram o tempo de lambida da pata (43% e 83%) respectivamente, em relação ao grupo controle ($95,8 \pm 16,1$) após a administração intraplantar da solução de glutamato ($30 \mu\text{mol/pata}$) (Gráfico 7).

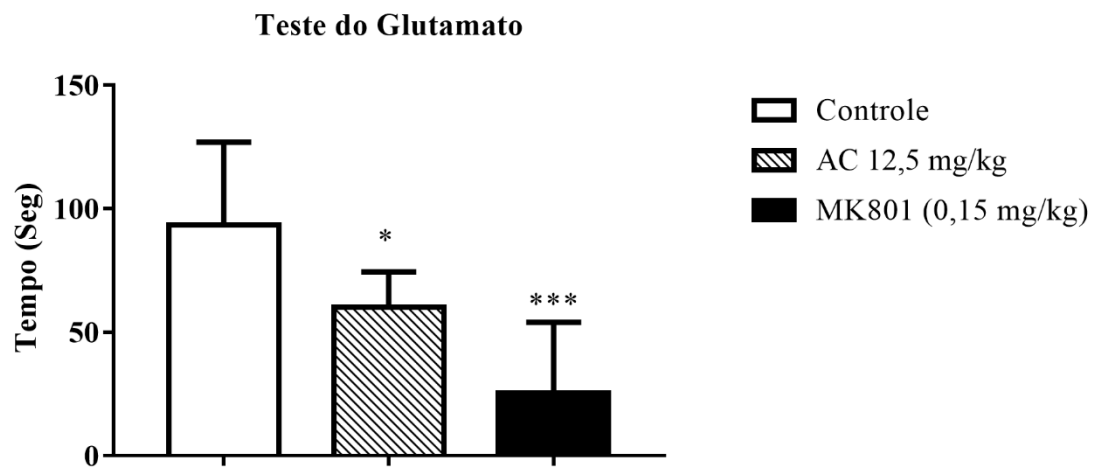


Gráfico 7 - Efeito do álcool cinâmico 12,5 mg/kg (i.p.), MK801 0,15mg/kg (i.p) sobre o tempo de lambida na pata no teste do glutamato. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.

5.8 Estresse Oxidativo (quantificação de nitrito por espectrofotometria)

Na reação de nitrito, foi possível observar que o AC na dose de 12,5 mg/kg reduziu ($213,2 \pm 40,81$, $p < 0,05$) significativamente os níveis de nitrito na região do córtex pré-frontal dos camundongos, em comparação ao grupo salina ($1258 \pm 977,3$). Não houve diferença em relação ao basal ($607,3 \pm 296,5$) [$F(3, 28) = 8,4$ $P=0,0004$] (gráfico 8).

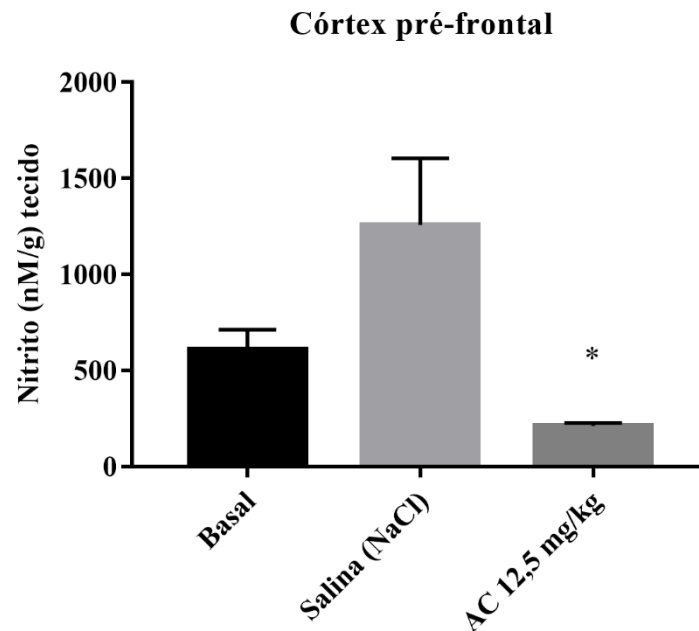
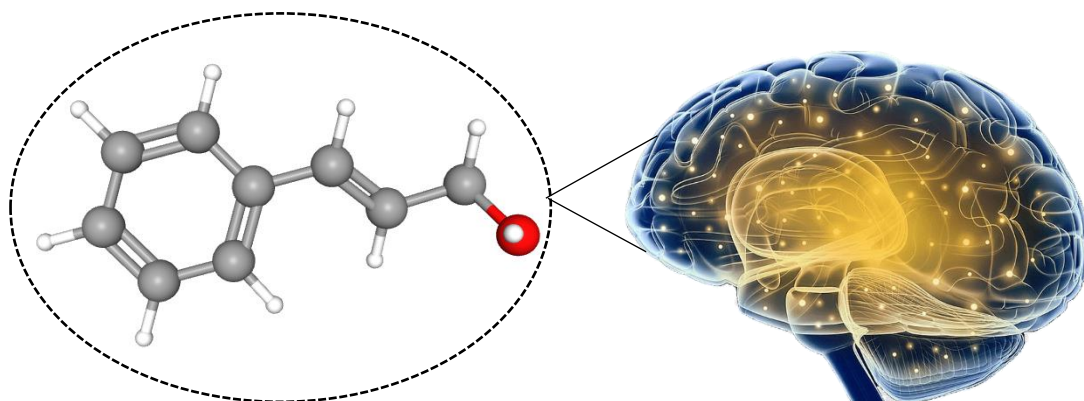


Gráfico 8 - Efeito do tratamento agudo do álcool cinâmico 12,5 mg/kg (i.p.) sobre os níveis de nitrito na região do córtex pré-frontal dos camundongos. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP (n=8). * $p < 0,05$ vs grupo controle. ANOVA “one way” – Tukey teste de múltiplas comparações.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, a humanidade tem utilizado muitos recursos disponíveis na natureza como alternativa para combater um largo espectro de doenças. As plantas constituíram a principal base para o desenvolvimento de vários produtos utilizados na medicina tradicional. Há um grande esforço feito por diversos centros de pesquisas para descobrir e comprovar as atividades biológicas das plantas medicinais e seus constituintes. Dentre esses componentes, o Álcool cinâmico (AC) e seus análogos se destacam por seus efeitos farmacológicos comprovados e por sua baixa toxicidade (ANDRADE et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; RODRIGUES, 2018).

No estudo de *docking* molecular realizado, observamos para a enzima ciclooxigenase 2 (COX2), que o AC obteve valores de energia de ligação próximos aos valores do ibuprofeno. A COX é uma enzima responsável pela ciclização e oxigenação do ácido araquidônico (AA), convertendo-o em prostaglandina G2 (PGG2), através a captura da molécula de oxigênio (PERRONE et al., 2010). A COX apresenta duas isoformas principais, COX-1 e COX-2. A COX-1 é responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxano em diversas células, como, as trato gastrointestinal e plaquetas sanguíneas. A COX-2 é expressa principalmente durante a inflamação (PAUL et al., 2021; TAIDI; MAURADY; BRITEL, 2022).

O encaixe molecular do araquidonato nos sítios ativos da COX-2 evidenciou que sua forma cristalina contém três regiões: 1) uma bolsa hidrofóbica definida por Tyr-385, Gly-526, Trp-387, Phe-518, Leu-384 e Ser- 530, que são responsáveis pela catálise de AA por Tyr-385, responsáveis por induzirem a oxigenação do substrato. 2) entrada do sítio ativo envolvido na fixação do substrato, delimitado com os resíduos hidrofílicos Arg-120 que é estabilizado por Tyr-355. 3) uma cadeia lateral responsável pela seletividade, limitada por His-90, Val-523, Arg-513, Leu-352, Ser-353 e Gln-192 (GOUDA et al., 2016; TAIDI; MAURADY; BRITEL, 2022).

Na análise de ancoragem molecular do AC com a COX2, o composto AC formou duas ligações de hidrogênio com os resíduos Leu352 e Ser353, três interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val349, Val523 e Ala527 e uma interação de van der Waals com o aminoácido His90 com o sítio ativo da enzima. O ibuprofeno (droga padrão)

formou nove interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val349, Ala527, Leu352, Arg513, Phe518, His90, Ala516, Ile517 e Val523. Todos os aminoácidos para a enzima COX2 foram observadas interagindo com o ligante cristalográfico (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016).

Nas interações formadas pelo composto AC com o NMDAR, foi possível observar uma ligação estável de hidrogênio com a Pro129, uma interação de van der Waals com a Tyr144 e três interações hidrofóbicas com a Pro141, Thr242 e His273 com o sítio ativo da proteína NMDA. Enquanto que o MK-801 formou interações mais fracas quando comparadas com o AC. Foram observadas quatro interações hidrofóbicas com os aminoácidos Pro129, Pro141, Tyr144 e His273, além de uma interação estérica e desfavorável com o resíduo Thr242. Os aminoácidos Pro129, Thr242 e Gly243 foram vistos interagindo com o ligante cristalográfico e o NMDA (IVANOVA; KARELSON; DOBCHEV, 2018; KIM; KIM; AHN, 2018; VOLGRAF et al., 2016).

Para a análise *in vivo* a via de administração escolhida para o estudo foi a intraperitoneal devido a sua alta absorção, podendo atingir o efeito esperado em tempo bem próximo ao alcançado pela via intravenosa e por ser considerada uma via com baixo impacto de estresse nos animais (SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2019). Segundo Andrade, et al, (2019) o AC apresenta uma DL50 (OECD 423) de 500mg/kg em camundongos. Baseado nesse estudo, escolhemos as mesmas doses (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg). A via de administração escolhida foi a intraoeritoneal.

Drogas com ação depressora sobre o sistema nervoso central podem reduzir a coordenação motora em animais, bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (BARS et al., 2001). Sabendo que os testes de avaliação de atividade antinociceptiva exigem respostas motoras dos animais, resultados falsos positivos poderiam ser obtidos, caso ocorresse perda da coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. Para descartar tal viés, foi realizado o teste do Rotarod, uma metodologia bastante utilizada nesta fase da pesquisa, visto que é possível detectar algum comprometimento motor causado por agentes farmacológicos (neurotoxicidade) e avaliar a integridade da coordenação motora dos animais (KIM et al., 2021).

O AC nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (i.p) não modificou a capacidade dos animais caminhar sobre a barra giratória, no tempo pré-estabelecido, o

que indica que o AC não causa comprometimento motor (relaxamento muscular) e, conseqüentemente, uma resposta falso-positiva no comportamento nociceptivo. Quando os animais tratados com a droga investigada, apresentam um desempenho semelhante aos animais do grupo controle, significa a falta de comprometimento motor (BLANCO et al., 2009). O AC não alterou a coordenação motora dos animais, sugerindo uma baixa neurotoxicidade das doses testadas (KIM et al., 2021). É importante a avaliação da função motora dos animais, após um tratamento, em modelos de nocicepção, para descartar resultados “falso-positivo” tendo em vista que alterações locomotoras podem levar a conclusões imprecisas, como por exemplo, um efeito “pseudo-antinociceptivo” (WILHELM et al., 2009).

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo de dor visceral amplamente utilizado na triagem de novas substâncias com potencial analgésico ou anti-inflamatório. A administração do ácido acético estimula a liberação de uma gama de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, serotonina, histamina, bradicinina substância P e histamina (BATISTA et al., 2016; MOHAMAD et al., 2010). O ácido acético em contato com o peritônio do animal ativa nociceptores somáticos e viscerais que inervam o peritônio, gerando uma inflamação nos órgãos subdiafragmáticos e nas paredes musculares subcutâneas, levando o animal a contrair os músculos abdominais e uma extensão dos membros inferiores (WHITTLE, 1964).

Nossos resultados mostraram que o AC reduz o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O que sugere participação do AC na atividade antinociceptiva/anti-inflamatória podendo estar relacionado à redução na liberação de mediadores inflamatórios ou bloqueio direto dos receptores. O fenilpropanoide Acetato de perilila, também obteve resultado semelhante no teste do ácido acético (BRAGA et al., 2022). O aldeído cinâmico, acetato cinâmico e o ácido cinâmico, derivados do AC tem atividade anti-inflamatória já relatada na literatura (MONTEIRO et al., 2021).

Um grande número de fármacos com atividades farmacológicas distintas são capazes de diminuir o número de contorções abdominais, demonstrando a não seletividade desse teste, o que faz com que a diminuição no número de contorções necessite de confirmação em outros modelos de nocicepção como, por exemplo, o teste da formalina (KAWAURA et al., 2011).

O teste da formalina é uma metodologia utilizada como modelo de dor persistente, apresentando boa correlação com a dor clínica (TJØLSEN et al., 1992). Inicialmente, este modelo era utilizado para análise da dor em ratos e gatos, adaptado posteriormente para camundongos (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Este modelo apresenta uma vantagem sobre os outros, pois tem o poder de discriminar a ação de compostos sobre dois tipos de dor, a dor neurogênica e a inflamatória, devido ao fato ser um modelo bifásico (GRIPP et al., 2020).

O parâmetro observado neste teste consiste na intensa atividade de lambar/friccionar a pata que recebeu o estímulo nocivo em dois períodos distintos. A primeira fase caracteriza-se por uma resposta neurogênica ou aguda (ação direta da formalina sobre os nociceptores) se inicia logo após a administração da formalina e tem duração de 5 minutos, há uma interfase que vai dos 5 aos 15 minutos, onde não se contabiliza o tempo de lambida. A segunda fase envolve respostas inflamatórias e consiste dos 15 aos 30 minutos após a administração do estímulo químico (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SALDANHA et al., 2019).

Após a administração da formalina na região intraplantar do camundongo, há uma estimulação das fibras nociceptivas aferentes, causando a liberação de substâncias como glutamato, GABA, substância P, serotonina, histamina e bradicinina (BATISTA et al., 2016; SHIELDS et al., 2010). O mecanismo de ação nociceptiva, na primeira fase do teste caracteriza-se pela excitação direta das fibras C sensoriais, através da ativação de receptores TRPA1, envolvendo, em parte, as fibras do tipo A δ e relacionado também a liberação de óxido nítrico e substância P (FISCHER et al., 2014; GRIPP et al., 2020). Fármacos que atuam na via opioide, caracterizam-se por agirem nesta fase neurogênica da nocicepção (RIZZI et al., 2017).

Findada a primeira fase, há um intervalo 10 minutos para iniciar a segunda fase do teste. Neste período, a resposta do animal ao estímulo doloroso (formalina) é suprimida, devido a uma diminuição da atividade das fibras C e ativação de processos inibitórios, como a liberação do neurotransmissor GABA. A segunda fase caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios, como: serotonina, prostaglandinas, bradicinina, histamina, aminas simpaticomiméticas, TNF- α e interleucinas (GRIPP et al., 2020; SALDANHA et al., 2020).

Uma característica da resposta nociceptiva à formalina é a sensibilidade diferente das duas fases do teste, a primeira fase que é essencialmente devido à estimulação transitória dos nociceptores resultando em dor nociceptiva é exclusivamente sensível aos opioides, já a segunda fase que está relacionada à resposta inflamatória persistente à formalina, é sensível aos analgésicos opioides e anti-inflamatórios (RIZZI et al., 2017).

Os resultados obtidos sugerem que AC apresenta tanto uma atividade antinociceptiva, como uma possível atividade anti-inflamatória, pois teve a capacidade de reduzir o limiar de dor nas duas fases do teste. Em concordância com o exposto, o fenilpropanoide acetato de perillal (BRAGA et al., 2022) também obteve resultado semelhante no teste da formalina diminuindo o parâmetro (tempo de lambida) nas duas fases observadas, caracterizando uma ação antinociceptiva central. Já o resultado envolvendo a atividade anti-inflamatória também foi observado com o fenilpropanoide metiluegenol, onde houve a diminuição do tempo de lambida na segunda fase do teste (ANNE SCHINK et al., 2018; YANO et al., 2006). Os resultados demonstrados no estudo de docking, mostra uma possível AC com a enzima COX-2, esse resultado somado a uma inibição da segunda fase do teste da formalina, nos dar a possibilidade de investigar mais a fundo uma possível atividade anti-inflamatória do AC.

Uma vez que o AC teve uma acentuada ação na primeira fase do teste da formalina, há um possível componente central envolvido nesse efeito, logo para elucidar o efeito antinociceptivo central do AC, realizamos o teste da placa quente que é um modelo utilizado para identificação de analgésicos com ação central. O teste da placa quente integra as vias supraespinhais, pois os ratos/camundongos com transecção espinhal não retiram os membros posteriores no teste da placa quente (GIGLIO et al., 2006). O animal é colocado em uma superfície de metal mantida a uma temperatura constante de 55°C, e a latência de resposta, que é o tempo necessário para observar um comportamento nocifensivo (retirada ou lambida das patas dianteiras e/ou traseiras e salto), é registrado pelo pesquisador (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

Embora, por vezes os animais retirem primeiro a pata dianteira, a retirada ou lambida da pata traseira é considerada um indicador mais confiável de nocicepção, pois comumente as patas dianteiras são usadas na exploração e não estão em contato constante com a superfície de metal. Tais comportamentos representam uma integração sensorial

supraespinal, uma vez que a estimulação térmica está associada com ativação das fibras Aδ e C que transmitem a informação dolorosa para o corno dorsal da medula espinal e posteriormente para os centros corticais. Se nenhum comportamento nocifensivo for observado, o animal deve ser retirado da placa quente após o tempo limite pré-estabelecido para evitar danos aos tecidos (BATISTA et al., 2016; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; WOOLFE; MACDONALD, 1944).

O AC aumentou a latência para resposta à placa quente, nas três doses testadas, nos tempos 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos, indicando um efeito antinociceptivo central o que ratifica o resultado encontrado na primeira fase do teste da formalina. Resultado semelhante foi visto com o fenilpropanoide acetato de peririla, encontrado por Braga et al., (2022), o que indica que o AC foi capaz de aliviar a nocicepção por estímulo térmico. Uma das características dos receptores de potencial transitório (TRP) é ser ativado por temperatura nociva. Baseado nessa característica realizamos o teste de nocicepção induzido por capsaicina para avaliar uma possível ação do AC nos TRP's, mais especificamente mediado pela inibição do canal de íons TRPV (Vanilóide) do tipo 1.

Os TRP constituem uma das maiores famílias de canais iônicos. Foram classificados (em mamíferos) baseados na homologia da sequência de aminoácidos, em 6 subfamílias: TRPA (Anquirina), TRPC (Canônico), TRPM (Melastatina), TRPML (Mucolipina), TRPP (Policistina), TRPV (Vanilóide) (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007).

Constituem a subfamília dos TRPV's, os canais TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4. O canal TRPV1 (receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1) é um dos mais importantes integradores de dor e estímulos inflamatórios e é considerado um alvo terapêutico no tratamento de condições de dor de várias etiologias. Tem importante participação na termorregulação e transmissão de sinais de dor da periferia para o cérebro. É ativado com o aquecimento acima de 43°C, acidificação do meio extracelular, e numerosos agonistas de várias naturezas, como por exemplo; a capsaicina (CARNEVALE et al., 2016).

Para constatar uma possível ação do AC na via TRPV1 realizamos o teste de nocicepção induzida por capsaicina, e foi possível observar que o AC foi capaz de reduzir

significativamente o tempo de lambida na pata do camundongo, sugerindo um efeito antinociceptivo do AC pela antagonização do canal TRPV1. Estudos apontam que antagonistas do TRPV1 causam analgesia a longo prazo (MAATUF; GERON; PRIEL, 2019; SINTSOVA et al., 2020). Outros fenilpropanoides como a calceolarioside (PIERETTI et al., 2022) e o Honokiol (KHALID et al., 2019) também apresentaram atividade antinociceptiva com ação em TRPV1.

Para desvendar o mecanismo da ação nociceptiva apresentada pelo AC, levamos em consideração a relevância de alguns alvos na fisiopatologia da nocicepção e realizamos inicialmente um estudo *in silico* de docking molecular, para analisar e identificar as melhores energias e interação ligante-alvo (receptor ou enzima). Dentre as vias investigadas (Opioides, Adenosinérgicas, Muscarínicas e glutamatérgicas) as melhores energias de ligação com o AC foi observada em alvos da via glutamatérgica, especificamente no receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDAR).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC). Existem duas principais classes de receptores que medeiam suas ações, são elas; receptores de glutamato ionotrópico controlado por ligante (iGlu) e receptores de glutamato metabotrópico acoplado à proteína G (GPCR) (mGlu). A ativação dos receptores mGlu são responsáveis por mediar a neurotransmissão modulatória mais lenta. Foram identificados oito subtipos de receptores mGlu e divididos em três grupos com diferentes vias intracelulares de ação. Grupo I (mGlu1 e mGlu5) são acoplados às proteínas G α_q e ativam a fosfolipase C (PKC); grupo II (mGlu2 e mGlu3) e o grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) são acoplados às proteínas G α_i e inibem adenilato ciclase. Os receptores mGlu também podem alterar as correntes do canal iônico através das subunidades G $\beta\gamma$. A ativação dos receptores iGlu, representado pelo ácido caínico (KA), N-metil-d-aspartato (NMDA), e o α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), gera eventos sinápticos rápidos que podem produzir mudanças duradouras na excitabilidade sináptica (CHIECHIO; NICOLETTI, 2012).

Os receptores NMDAR presentes no corno dorsal da medula há muito tempo são direcionados para o tratamento da dor neuropática devido a seu importante papel na plasticidade sináptica (DENG; CHEN; PAN, 2019). Os NMDARs estão localizados nos terminais nervosos pós-sinápticos (ZHOU; CHEN; PAN, 2011), e também estão

presentes nos terminais nervosos pré-sinápticos e podem modular poderosamente a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal no hipocampo (MCGUINNESS et al., 2010), hipotálamo (YE et al., 2011), amígdala (HUMEAU et al., 2003) e corpo estriado (ZHOU et al., 2018).

Para comprovar o resultado obtido no teste *in silico* realizamos o teste de nocicepção induzida por glutamato. O glutamato administrado na pata do animal (20 µl/30µmol /Glu) causa ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos específicos em sítios periféricos, espinhais e supraespinhais por um mecanismo dependente da ativação da via L-citrulina-óxido-nítrico (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; MILLER et al., 2011).

O AC reduziu significativamente o tempo de lambida na pata dos animais no teste do glutamato, evidenciando um efeito antinociceptivo, corroborando com os resultados *in silico*, sugerindo uma possível interação com a via glutamatérgica. O grupo tratado com MK801 também reduziu o efeito nociceptivo após a administração do glutamato. Outros fenilpropanoides apresentaram atividade antinociceptiva no teste do glutamato, como o 2-Allylphenol (NETO et al., 2019), e o orto-eugenol (FONSÊCA et al., 2016). No entanto mais estudos são necessários para esclarecer a ação do AC sobre os receptores do glutamato, uma vez que compostos da mesma classe podem possuir diferentes interações com o sistema glutamatérgico.

Evidências na literatura apontam que a ação antinociceptiva do tramadol inclui o bloqueio de receptores NMDA (HARA; SATA, 2007; MANOCHA; SHARMA; MEDIRATTA, 2005). Sabe-se também que a administração intraperitoneal de tramadol em ratos reduz nocicepção induzida por formalina que é parcialmente mediado pela liberação de glutamato (HARA; SATA, 2007; POZOS-GUILLÉN et al., 2006). A cetamina, um antagonista NMDAR, tem sido usado clinicamente para tratar dor neuropática (KIEFER et al., 2008). A injeção intratecal de antagonistas NMDAR (MK-801; AP5), reduz o comportamento de dor neuropática em animais submetidos a lesão nervosa periférica, demonstrando que os NMDARs desempenham um papel importante no desenvolvimento da sensibilização central e dor neuropática após lesão nervosa (DENG; CHEN; PAN, 2019).

Também investigamos a participação do óxido nítrico na antinocicepção induzida pelo AC, tendo em vista que o óxido nítrico (NO) é um importante mediador da nocicepção e está envolvido na sensibilização central (CURY et al., 2011). Nossos resultados evidenciaram que a administração aguda de AC foi capaz de reduzir os níveis de nitrito na região do córtex pré-frontal dos camundongos. O nitrito é um metabólito do NO e a produção de NO pode ser mensurada através da análise de quantificação da produção de nitrito (TSIKAS, 2009).

Evidências na literatura indicam que a participação da via NO-cGMP faz parte da atividade antinociceptiva de várias drogas. O NO pode aumentar dos níveis de GMP cíclico, por ativação de guanilil ciclase (GCs) em diferentes tipos de células, ativação de PKG e consequentemente abertura de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}). A abertura desses canais induz a hiperpolarização da membrana reduzindo a transmissão de potenciais de ação dos neurônios que produzem analgesia (VALLE-DORADO et al., 2022).

Normalmente, o estresse oxidativo é mantido sob o controle do sistema antioxidante endógeno. Durante um processo inflamatório, o estresse oxidativo aumenta consideravelmente sobrecarregando a capacidade dos antioxidantes endógenos se opor a ele. Esse desequilíbrio resulta em lesões mediadas pelo produto de estresse oxidativo e também pode mediar o aumento da dor inflamatória. (VALÉRIO et al., 2009) (PISOSCHI et al., 2021)

Por exemplo, a injeção de peroxicrita (LLARI, et al. 2020), formalina (HUNSK, FASME, HOLE, 1985) e carragenina (MORRIS, 2003) na pata de ratos ou camundongos induz hipernocicepção. Em contrapartida, a prevenção do aumento dos níveis de produtos de estresse oxidativo (radicais livres) no local do processo inflamatório ou mesmo na medula espinhal reduz a hipernocicepção (KEEBLE et al., 2009; NDENGELE et al., 2008). Durante o estado de dor, a redução do excesso de radicais livre é feita por antioxidantes, que removem diretamente os radicais livres, inibindo a oxidação de outras moléculas (MOLLACE et al., 2014). O ácido e-p-metoxicinnâmico (SO et al., 2002) e o α -asarone (LIMÓN et al., 2009) exerceram atividade neuroprotetora contra a toxicidade induzida pelo glutamato. A ação antioxidante de fenilpropanoides de origem sintética e

natural já foi demonstrada em outros estudos, corroborando com os resultados obtidos pelo AC (CUNHA et al., 2019).

7. CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que o Álcool Cinâmico:

- Não causa comprometimento motor nos animais no teste do Rotarod;
- Apresenta interação com o receptor glutamatérgico (NMDAR) e com a enzima Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), através do estudo *in silico* (docking molecular);
- Promove antinocicepção nos modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina), e no modelo de nocicepção térmica (teste da placa quente);
- Exerce sua atividade antinociceptiva com a participação do sistema glutamatérgico (teste do glutamato);
- Apresenta uma possível participação na via do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide subfamília V membro 1 (TRPV1), no teste da capsaicina;
- Apresenta efeito antioxidante por reduzir a expressão de nitrito (método de Griess);
- Pode apresentar uma atividade anti-inflamatória através da inibição da enzima COX2 (*in silico*).

Por fim, a presente tese demonstrou que o constituinte da canela (álcool cinâmico) apresenta efeito farmacológico sobre o sistema nervoso central, com potencial efeito antinociceptivo/analgésico, ausência de sinais de toxicidade em doses baixas, e também apresenta um possível efeito anti-inflamatório.

8. PERSPECTIVAS

Em vista dos resultados promissores frente aos modelos de nocicepção química e térmica, e no modelo de ancoragem molecular tem-se como perspectiva;

- Avaliar a atividade dos marcadores enzimáticos do estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) em hipocampo de camundongos pré-tratados com o AC e submetidos ao modelo de nocicepção;
- Realizar análises histomorfométricas em hipocampo de camundongos pré-tratados com o AC e submetidos ao modelo de nocicepção;
- Investigar o mecanismo de ação anti-inflamatória do AC;
- Realizar análises imuno-histoquímicas para a interleucina-1 β (IL-1 β) e Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em camundongos pré-tratados com o AC e submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina.

9. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. P.; SOUZA, C. P. DE Q.; BARBOSA, W. J. M.; SANTOS-JÚNIOR, F. F. U.; OLIVEIRA, A. S. DE. Prevalência de dor crônica no Brasil: revisão sistemática. **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**, v. 4, p. 257–267, 2021.
- ALMEIDA JUNIOR, S. DE. In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 2, n. 4, p. 386–389, 2019.
- ALMEIDA, R. Triagem farmacológica comportamental. *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 17, p. 179-188, 2006.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research**, 12. mar. 2004.
- ANDRADE, H. Estudo não clínico do perfil psicofarmacológico do álcool cinâmico. **Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.**, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/18875>>.
- ANDRADE, H. H. N. DE; MONTEIRO, Á. B.; BRAGA, R. M.; CRUZ, R. M. D. DA; SALVADORI, M. DA S. S.; et al. Anxiolytic and antinociceptive-like effects of cinnamic alcohol by possible GABAergic pathway modulation: In vivo and in silico studies. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51372–51389, 2020.
- ANNE SCHINK; KATERINA NAUMOSKA; ZORAN KITANOVSKI; et al. Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. **Food & Function**, v. 9, n. 11, p. 5950–5964, 2018. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/fo/c8fo01286e>>.
- ASSIS, D. B. **Efeito antinociceptivo do fenilpropanóide 2-alilfenol**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, PB. Universidade Federal da Paraíba, 2016.

BALAKRISHNAN, N.; RAJ, J. S.; KANDAKATLA, N. In silico studies on new Indazole derivatives as GSK-3 β inhibitors. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 295–299, 2015.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009

BARS, D. LE; GOZARIU, M.; REVIEWS, S. C.-P.; 2001, UNDEFINED. Animal models of nociception. **ASPET**, 2001. Disponível em: <<https://pharmrev.aspetjournals.org/content/53/4/597.short>>.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009. Cell. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837031/>>.

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

BATISTA, E. K. F.; TRINDADE, H. I.; LIRA, S. R. S.; et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/rbpm/a/yQQwSx9XzSNB9sx4CdDsXKv/?lang=pt>>..

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. **Artmed editora**. 3 ed. p 417, 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 219–228, 2002.

BENEDITO, R. B. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (s)-(-)-álcool perfílico em camundongos**. 2013. 108f. Tese

(Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia) – CCS/UFPB, João Pessoa, PB. 2013.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J. B.; et al. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 535–542, 1977.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 265–270, 2009.

BORDI, F.; UGOLINI, A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 1, p. 55–79, 1999.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295–303, 2015. Les Laboratoires Seriver. Disponível em: <www.dialogues-cns.org>.

BRAGA, R.; ANDRADE, H.; CRUZ, R.; et al. Analgesic-like activity of perillyl acetate: *In vivo* and *in silico* studies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 12, n. 4, p. 156, 2022.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

CALVINO, B.; GRILO, R.M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v.73, p.10- 6, 2006.

CARDOSO, M. G. DE M. **Classificação, fisiopatologia e avaliação da dor**. 2012.

CARNEVALE, V.; ROHACS, T.; SZALLASI, A.; HUANG, S. M. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. **Pharmaceuticals 2016, Vol. 9, Page 52**, v. 9, n. 3, p. 52, 2016. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/9/3/52/htm>>.

CARRASCO, C.; NAZIROGLU, M.; RODRÍGUEZ, A. B.; PARIENTE, J. A. Neuropathic pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. FEB, p. 95, 2018.

CHEN, J. (STEVEN); SEHDEV, J. S. **Physiology, Pain**. StatPearls Publishing, 2019.

CHIECHIO, S.; NICOLETTI, F. Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. **Current Opinion in Pharmacology**, 1. fev. 2012.

CLARK, E. R.; MCCRACKEN, ANNA M. Investigation of aqueous Tween 80 as a vehicle for intravaginal administration. *Journal of Endocrinology*, v. 51, n. 4, p. 797-798, 1971.

COHEN, M.; QUINTNER, J.; VAN RYSEWYK, S. Reconsidering the International Association for the study of pain definition of pain. **Pain Reports**, v. 3, n. 2, 2018. Lippincott Williams and Wilkins. Disponível em: </pmc/articles/PMC5902253/?report=abstract>.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, 1968. Wiley-Blackwell. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570212/>>.

COSTA, C. A.; SANTOS, C.; ALVES, P.; COSTA, A. Dor Oncologica. **Revista Portuguesa De Pneumologia**, v. XIII, p. 377–381, 2007.

CREWS STAVINOHA, R.; ANIL VATTEM, D. **Review Potential neuroprotective effects of cinnamon**. 2015.

CUNHA, F. V. M.; COELHO, A. G.; AZEVEDO, P. S. DA S.; et al. Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions., v. 29, n. 2, p. 73–83, 2019. **Taylor & Francis**. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543776.2019.1568410>>.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 243–254, 2011.

DANIEL, A. N.; SARTORETTO, S. M.; SCHMIDT, G.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 B, p. 212–217, 2009.

DENG, J.; HAN, J.; CHEN, J.; et al. Comparison of analgesic activities of aconitine in different mice pain models. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0249276, 2021. Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0249276>>.

DENG, M.; CHEN, S.-R.; PAN, H.-L. Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 76, n. 10, p. 1889, 2019. NIH Public Access. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6482077/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31200000/)>.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 0, p. 284, 2017.

DICKENSON, A. Mechanisms of Central Hypersensitivity: Excitatory Amino Acid Mechanisms and Their Control. . p.167–210, 1997. Springer, Berlin, Heidelberg. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60777-6_8>.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice**College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.

EATON, A.; CLESCERI, L.; GREENBERG, A. Standard methods: for the examination of water and wastewater., 2014.

EDDY, N.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl-and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 385–393, 1953.

FERNANDES, B. H. P.; GOMES, C. R. DE G. < b> Mecanismos e Aspectos Anatômicos da Dor. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, 2011.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; NAVARRO-SANTANA, M. Time course prevalence of post-COVID pain symptoms of musculoskeletal origin in patients who had survived severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Pain**, v. 163, n. 7, p. 1220–1231, 2022.

FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **PAIN®**, v. 155, n. 3, p. 511–521, 2014. No longer published by Elsevier. Acesso em: 18/7/2021.

FONSÊCA, D. V.; SALGADO, P. R. R.; ARAGÃO NETO, H. DE C.; et al. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 402–408, 2016.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, 15. jan. 1999.

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 107, n. 10 Suppl 6, p. 39–48, 2007.

GAUMOND, I.; SPOONER, M. F.; MARCHAND, S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. **Neuroscience**, v. 146, n. 1, p. 366–374, 2007.

GAWADE, S. P. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 348, 2012.

GIGLIO, C. A.; DEFINO, H. L. A.; DA-SILVA, C. A.; DE-SOUZA, A. S.; DEL BEL, E. A. Behavioral and physiological methods for early quantitative assessment of spinal cord injury and prognosis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 12, p. 1613–1623, 2006.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, J. R.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª ed. 2009.

GOUDA, A. M.; ALI, H. I.; ALMALKI, W. H.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Some Novel Pyrrolizine Derivatives as COX Inhibitors with Anti-Inflammatory/Analgesic Activities and Low Ulcerogenic Liability. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 201, 2016..

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

GRIPP, E. L. O.; CARNEIRO, L. U.; PEREIRA, I. DE S. P.; VEGA, M. R. G.; MARINHO, B. G. Avaliação das propriedades analgésicas de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith LC / Evaluation of analgesic properties of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith LC. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 382–395, 2020.

GUAN, G.; LAN, S. Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology** 2020 94:3, v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020. Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-020-02689-3>>. Acesso em: 3/7/2022.

GUNAWARDENA, D.; KARUNaweera, N.; LEE, S.; et al. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts – identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 910–919, 2015.

HARA, K.; SATA, T. The effects of the local anesthetics lidocaine and procaine on glycine and γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Anesthesia and Analgesia**, v. 104, n. 6, p. 1434–1439, 2007.

HEBERT, P. R.; BARICE, E. J.; HENNEKENS, C. H. Treatment of Low Back Pain: The Potential Clinical and Public Health Benefits of Topical Herbal Remedies. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 219–220, 2014.

HUANG, S. Y.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899–12908, 2010.

HUMEAU, Y.; H, S.; S, B.; A, L. Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 841–845, 2003.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69–76, 1985..

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

ILARI, S.; DAGOSTINO, C.; MALAFOGLIA, V.; et al. Protective Effect of Antioxidants in Nitric Oxide/COX-2 Interaction during Inflammatory Pain: The Role of Nitration. **Antioxidants** 2020, Vol. 9, Page 1284, v. 9, n. 12, p. 1284, 2020.

IVANOVA, L.; KARELSON, M.; DOBCHEV, D. A. Identification of Natural Compounds against Neurodegenerative Diseases Using In Silico Techniques. **Molecules** 2018, Vol. 23, Page 1847, v. 23, n. 8, p. 1847, 2018.

JAHAMUNNA ABRANTES ANDRADE, B.; LINDOMAR DE FARIAS, B.; IVANA MARIA FECHINE, S.; et al. Farmacoterapia adjuvante no tratamento da dor oncológica. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 21, n. 2, p. 112–120, 2008.

JO, M.-J.; KUMAR, H.; JOSHI, H. P.; et al. Oral Administration of α -Asarone Promotes Functional Recovery in Rats With Spinal Cord Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAY, p. 445, 2018..

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 13. set. 2001. Nature Publishing Group. Disponível em: <www.nature.com>.

KAPOOR, D.; SINGH, S.; KUMAR, V.; et al. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, v. 19, p. 100182, 2019.

KASTRITIS, P. L.; MOAL, I. H.; HWANG, H.; et al. A structure-based benchmark for protein–protein binding affinity. **Protein Science**, v. 20, n. 3, p. 482–491, 2011.

KAWAURA, K.; MIKI, R.; URASHIMA, Y.; et al. Típepidine enhances the antinociceptive-like action of carbamazepine in the acetic acid writhing test. **European Journal of Pharmacology**, v. 651, n. 1–3, p. 106–108, 2011.

KEEBLE, J. E.; BODKIN, J. V.; LIANG, L.; et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **PAIN®**, v. 141, n. 1–2, p. 135–142, 2009.

KHALID, S.; KHAN, A.; SHAL, B.; et al. Suppression of TRPV1 and P2Y nociceptors by honokiol isolated from *Magnolia officinalis* in 3rd degree burn mice by inhibiting inflammatory mediators. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108777, 2019.

KIEFER, R. T.; ROHR, P.; PLOPPA, A.; et al. Efficacy of ketamine in anesthetic dosage for the treatment of refractory complex regional pain syndrome: An open-label phase II study. **Pain Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1173–1201, 2008.

KIM, D.; KIM, H. J.; AHN, S. Anesthetics Mechanisms: A Review of Putative Target Proteins at the Cellular and Molecular Level. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 11, p. 1333–1343, 2018.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

KIM, H. K.; PARK, S. K.; ZHOU, J. L.; et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, n. 1–2, p. 116–124, 2004.

KIM, Y.-J.; MA, S.-X.; HUR, K.-H.; et al. New designer phenethylamines 2C-C and 2C-P have abuse potential and induce neurotoxicity in rodents. **Archives of Toxicology** 2021 95:4, v. 95, n. 4, p. 1413–1429, 2021.

KING, S.; CHAMBERS, C. T.; HUGUET, A.; et al. The epidemiology of chronic pain in children and adolescents revisited: A systematic review. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2729–2738, 2011.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery** 2004 3:11, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, 2008.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K.; LIU, C.-M. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438–457, 2015.

LEITE, D. O. D.; COSTA, L. R.; LOPES, C. M. U.; RODRIGUES, A. Y. F.; COSTA, J. G. M. DA. Propriedades físicas de óleos essenciais: Uma ferramenta experimental no ensino de Química. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5529108889, 2020.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 8, p. 989–1003, 2007.

LIMÓN, I. D.; MENDIETA, L.; DÍAZ, A.; et al. Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid- β (25–35). **Neuroscience Letters**, v. 453, n. 2, p. 98–103, 2009.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology☆. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

MAATUF, Y.; GERON, M.; PRIEL, A. The Role of Toxins in the Pursuit for Novel Analgesics. **Toxins 2019, Vol. 11, Page 131**, v. 11, n. 2, p. 131, 2019.

MANOCHA, A.; SHARMA, K. K.; MEDIRATTA, P. K. On the mechanism of anticonvulsant effect of tramadol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 74–81, 2005..

MARIANI, E.; POLIDORI, M. C.; CHERUBINI, A.; MECOCCHI, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **Journal of Chromatography B**, v. 827, n. 1, p. 65–75, 2005.

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

MBRAH, A.; NUNES, A.; HUME, A.; ZHAO, D. Prevalence and treatment of neuropathic pain diagnoses among US nursing home residents. **Pain**, v. 163, n. 7, p. 1370–1377, 2022.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D. G. Opioid mechanisms and opioid drugs. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, 1. nov. 2013.

MCGUINNESS, L.; TAYLOR, C.; RD, T.; et al. Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. **Neuron**, v. 68, n. 6, p. 1109–1127, 2010..

MILLER, K. E.; HOFFMAN, E. M.; SUTHARSHAN, M.; SCHECHTER, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: Physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 283–309, 2011.

MING-TATT, L.; KHALIVULLA, S. I.; AKHTAR, M. N.; et al. Antinociceptive Activity of a Synthetic Curcuminoid Analogue, 2,6-bis-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)cyclohexanone, on Nociception-induced Models in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 3, p. 275–282, 2012.

MIZOGUCHI, H.; WATANABE, C.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. New vistas in opioid control of pain. **Current Opinion in Pharmacology**, 1. fev. 2012.

MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; et al. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 647, n. 1–3, p. 103–109, 2010.

MOHANTY, S.; AMBADE, M.; UPADHYAY, A. Prevalence of pain and its treatment among older adults in India: a nationally representative population-based study. **Pain**, p. 10–1097, 2022.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; DAGOSTINO, C.; et al. The effect of peroxynitrite decomposition catalyst MnTBAP on aldehyde dehydrogenase-2 nitration by organic nitrates: Role in nitrate tolerance. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 29–35, 2014.

MONTEIRO, Á. B.; ANDRADE, H. H. N. DE; FELIPE, C. F. B.; ALMEIDA, R. N. DE. Pharmacological Studies on Cinnamic Alcohol and Its Derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 2021 31:1, v. 31, n. 1, p. 16–23, 2021.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. DE F.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53–63, 2008.

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785–803, 2001.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 225, p. 115–121, 2003.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. DE M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186–190, 2009.

MURRAY, C. B.; DE LA VEGA, ROCÍO; PALERMO, T. M.; et al. The prevalence of chronic pain in young adults: a systematic review and meta-analysis. **Pain**, 2021.

NDENGLE, M. M.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, E.; et al. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 9, p. 3154–3164, 2008.

NETO, H. DE C. A.; DA FONSÊCA, D. V.; BRAGA, R. M.; et al. 2-allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic, anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

OLIVEIRA, M.; BARRETO, A.; JÚNIOR, L. Q.; GUIMARÃES, A. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1292–1298, 2014.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. **Acta Cryst**, v. 72, n. 10, p. 772–776, 2016.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, 1. nov. 2010.

PARK, H. J.; CHA, D. S.; JEON, H. Antinociceptive and hypnotic properties of *Celastrus orbiculatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1240–1244, 2011. Elsevier.

PARK, J. H.; CHA, H. Y.; SEO, J. J.; et al. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: Comparison of red ginseng and sun ginseng. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 895–900, 2005.

PASERO, C.; MCCAFFERY, M. **Pain Assessment and Pharmacologic Management-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2010.

PAUL, S.; MODAK, D.; CHATTARAJ, S.; et al. Aloe vera gel homogenate shows anti-inflammatory activity through lysosomal membrane stabilization and downregulation of TNF- α and Cox-2 gene expressions in inflammatory arthritic animals. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences 2021 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2021.

PIMENTEL, V. P.; VIEIRA, V. A. M.; MITIDIERI, T. L.; OLIVEIRA, F. F. S., PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES**. p. 41-89, 2015.

PIERETTI, S.; SAVIANO, A.; MOLLICA, A.; et al. Calceolarioside A, a Phenylpropanoid Glycoside from Calceolaria spp., Displays Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties. **Molecules 2022, Vol. 27, Page 2183**, v. 27, n. 7, p. 2183, 2022.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 4331**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019..

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.

POZOS-GUILLÉN, A. J.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; ARELLANO-GUERRERO, A.; et al. Isobolographic analysis of the dual-site synergism in the antinociceptive response of tramadol in the formalin test in rats. **Life Sciences**, v. 79, n. 24, p. 2275–2282, 2006.

PRITCHETT, K.; MULDER, G. B. The Rotarod. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 49–49, 2003.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5315892, Cinnamyl alcohol. Retrieved October 30, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamyl-alcohol>. Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=%22cinnamic alcohol%22](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=%22cinnamic%20alcohol%22)>. Acesso em: 29/10/2020.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 133–141, 2005.

RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; PREMAKUMARA, G. S.; et al. Medicinal properties of “true” cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): A systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2013..

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale farmacologia**. 7 ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 2012.

RANNEH, Y.; ALI, F.; AKIM, A. M.; et al. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 327–338, 2017.

REJÓN-ORANTES, J. C.; PERDOMO SUARÉZ, D. P.; REJÓN-RODRÍGUEZ, A.; et al. Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 522–526, 2013..

RIDER, B. F.; MELLON, M. G. Colorimetric Determination of Nitrites. **Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition**, v. 18, n. 2, p. 96–99, 1946.

RIZZI, A.; RUZZA, C.; BIANCO, S.; TRAPPELLA, C.; CALO, G. Antinociceptive action of NOP and opioid receptor agonists in the mouse orofacial formalin test. **Peptides**, v. 94, p. 71–77, 2017.

RODRIGUES, A. R. M. Produtos naturais na descoberta de fármacos. **Dissertação de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa, Porto.**, 2018.

SÁ, R. DE C. DA S. E; ANDRADE, L.; DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, R.; DE SOUSA, D. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459–1480, 2014.

SAKINA, M. R.; DANDIYA, P. C. A psycho-neuropharmacological profile of Centella asiatica extract. **Fitoterapia**, v. 61, n. 4, p. 291–296, 1990.

SALDANHA, A. A.; VIEIRA, L.; DE OLIVEIRA, F. M.; et al. Anti-inflammatory and central and peripheral anti-nociceptive activities of α -asarone through the inhibition of TNF- α production, leukocyte recruitment and iNOS expression, and participation of the adenosinergic and opioidergic systems. **Inflammopharmacology**, p. 1–14, 2019.

SALDANHA, A. A.; VIEIRA, L.; DE OLIVEIRA, F. M.; et al. Anti-inflammatory and central and peripheral anti-nociceptive activities of α -asarone through the inhibition of TNF- α production, leukocyte recruitment and iNOS expression, and participation of the adenosinergic and opioidergic systems. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 1039–1052, 2020.

SALLUM, A. M. C.; GARCIA, D. M.; SANCHES, M. Dor aguda e crônica : revisão narrativa da literatura. **Acta Paul Enferm.**, v. 25, n. 1, p. 150–154, 2012.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 0, n. AUG, p. 923, 2018.

SARMENTO-NETO, J.; DO NASCIMENTO, L.; FELIPE, C.; DE SOUSA, D. Analgesic Potential of Essential Oils. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 20, 2015.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347–352, 1989.

SHIELDS, S. D.; CAVANAUGH, D. J.; LEE, H.; ANDERSON, D. J.; BASBAUM, A. I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **PAIN®**, v. 151, n. 2, p. 422–429, 2010.

SHOYAIB, A. AL; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2019.

SILVA, J. C.; RAQUEL, S.; LIMA, G. DE; et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira Farmacognosia** v. 94, n. 1, p. 18–23, 2013.

SILVA, L. A.; KORN, M.; DE ANDRADE, J. B. Influence of ultrasonic waves in the reduction of nitrate to nitrite by hydrazine–Cu(II). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 2, p. 275–280, 2007.

SINTSOVA, O. V.; PALIKOV, V. A.; PALIKOVA, Y. A.; et al. Peptide Blocker of Ion Channel TRPV1 Exhibits a Long Analgesic Effect in the Heat Stimulation Model. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 1, p. 215–217, 2020.

SO, R. K.; SANG, H. S.; YOUNG, P. J.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H. E-p-Methoxycinnamic acid protects cultured neuronal cells against neurotoxicity induced by glutamate. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 5, p. 1281–1291, 2002.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2233–2252, 2011.

STANLEY OISETH. Dor: Tipos e Vias, 2022. Disponível em: <<https://www.lecturio.com/pt/concepts/dor-tipos-e-vias/>>.

TAHA, R.; BLAISE, G. A. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: Role of oxidative stress. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 59, n. 9, p. 875–881, 2012.

TAIDI, L.; MAURADY, A.; BRITEL, M. R. Molecular docking study and molecular dynamic simulation of human cyclooxygenase-2 (COX-2) with selected eutypoids. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 3, p. 1189–1204, 2022.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 1. out. 1992.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2010.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A. C. R.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, **Vol. 20, Page 4574**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

TSIKAS, D. Review Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. v. 39, n. 8, p. 797–815, 2009.

VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; et al. Quercetin reduces inflammatory pain: Inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 1975–1979, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VALLE-DORADO, M. G.; HERNÁNDEZ-LEÓN, A.; NANI-VÁZQUEZ, A.; et al. Antinociceptive effect of *Mansoa alliacea* polar extracts involves opioid receptors and nitric oxide in experimental nociception in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 152, p. 113253, 2022.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP Channels. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 387, 2007.

VOLGRAF, M.; SELLERS, B. D.; JIANG, Y.; et al. Discovery of GluN2A-Selective NMDA Receptor Positive Allosteric Modulators (PAMs): Tuning Deactivation Kinetics via Structure-Based Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2760–2779, 2016.

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2287–2303, 2003.

WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: Integrators of pain and inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, out. 2005.

WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, n. 4, p. 369-IN1, 1964

WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 419–425, 2009.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 300–307, 1944.

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

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 170–176, 2002.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; et al. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, n. 1–3, p. 99–103, 2006.

YE, Z.; LI, D.; LI, L.; PAN, H. Protein kinase CK2 increases glutamatergic input in the hypothalamus and sympathetic vasomotor tone in hypertension. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 22, p. 8271–8279, 2011.

YONG, R.; MULLINS, P. Prevalence of chronic pain among adults in the United States. **Pain**, v. 163, n. 2, p. 328–332, 2022..

ZHOU, H.; CHEN, S.; PAN, H. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 379–388, 2011.

ZHOU, J.; LI, D.; SR, C.; Y, L.; HL, P. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor coupling is essential for corticostriatal long-term potentiation and is involved in learning and memory. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 50, p. 19354–19364, 2018.

ZIMMER, Z.; FRASER, K.; GROL-PROKOPCZYK, H. A global study of pain prevalence across 52 countries: examining the role of country-level contextual factors. **Pain**, 2021.

ANEXO 1



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo não clínico do mecanismo de ação e atividade antinociceptiva do álcool cinâmico", protocolada sob o CEUA nº 1648220719 (ID 0007833), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/09/2019.

We certify that the proposal "Non-clinical study of the mechanism of action and antinociceptive activity of cinnamic alcohol", utilizing 280 Isogenics mice (280 males), protocol number CEUA 1648220719 (ID 0007833), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/13/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2019** a **10/2022**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **280**

Linhagem: **Mus musculus - Balb/C**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia da UFPB.**

João Pessoa, 17 de setembro de 2019

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

PRINCIPAIS PRODUÇÕES NO PERÍODO DO DOUTORADO (2019/2023)

Artigos completos publicados em periódicos

CALDAS DA SILVA DANTAS VIEGAS, CLAUDENISE; SÉRGIO SILVA, ALEXANDRE; MARINHO BRAGA, RENAN; Nunes de Andrade, Humberto Hugo; FELÍCIO DE SOUSA SANTOS, ALINE KELLY; LEITE FERREIRA, MARIA DENISE; RIBEIRO, MATEUS DUARTE; AGRA CAVALCANTE SILVA, LUIZ HENRIQUE; ALVES DE LIMA, LOIANE; NOBREGA DE ALMEIDA, REINALDO; VANDERLEI DE SOUZA, MARIA DE FÁTIMA; SIMÕES DE ASSIS CANTALICE, TEMILCE. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of the crude ethanolic extract and alkaloid fraction of *Waltheria viscosissima* A. St. - Hil. (Malvaceae). JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, v. 292, p. 115173, 2022.

BRAGA, RENAN ; ANDRADE, HUMBERTO ; CRUZ, RYLDENE ; MAIA, MAYARA ; LIMA, CAROLINA ; SANTOS, ANDERSON ; MIRANDA, ANDRÉ ; DUARTE, ALLANA ; SCOTTI, MARCUS ; ALMEIDA, REINALDO ; SOUSA, DAMIÃO . Analgesic-like activity of perillyl acetate: In vivo and in silico studies. ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL BIOMEDICINE, v. 12, p. 156, 2022.

DA GUEDES, ERIKA; RIBEIRO, LEANDRO RODRIGO; CARNEIRO, CÉSAR ALVES; SANTOS, ALINE MATILDE FERREIRA; BRITO MONTEIRO, ÁLEFE; de Andrade, Humberto Hugo Nunes; CASTRO, RICARDO DIAS; BARBOSA, FLÁVIO FREITAS BARBOSA FILHO, JOSÉ MARIA ; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA ; STIEBBE SALVADORI, MIRIAN GRACIELA . Anticonvulsant Activity of trans-Anethole in Mice. BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, v. 2022, p. 1-11, 2022.

BRAGA, RENAN MARINHO; ANDRADE, H. H. N.; ARAGAO NETO, H. C.; CRUZ, R. M. D. ; ASSIS, D. B. ; AGRA, L. H. ; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. ; PORDEUS, L. C. M. ; QUINTANS-JUNIOR, L. J. ; ALMEIDA, R. N. . Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Lippia pedunculosa* Hayek essential oil and its β -cyclodextrin inclusion complex. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, v. 20, p. 162-176, 2021.

CHAVES NETO, GABRIEL; ANDRADE, H. H. N.; BRAGA, J. E. F.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; DINIZ, M. F. F. M.. Non-clinical study of the anxiolytic effect of Citrus aurantium L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E APLICADA, v. 41, p. 1-12, 2021.

DE OLIVEIRA, KARDILANDIA MENDES; LIMA, CALIANDRA MARIA BEZERRA LUNA; MELO, CINTHIA RODRIGUES; FILHO, ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA; BORGES, FLÁVIO VALADARES PEREIRA; DUARTE, GABRIELLY DINIZ; RODRIGUES, LUIS CEZAR; **DE ANDRADE, HUMBERTO HUGO NUNES MONTEIRO**, ÁLEFE BRITO; PORDEUS, LIANA CLÉBIA DE MORAIS. Avaliação do efeito antidepressivo *símile in vivo* de um derivado de chalcona e sua modelagem molecular por docking. REVISTA ELETRÔNICA ACERVO EM SAÚDE, v. 13, p. e5573-9, 2021.

ANDRADE, JÉSSICA C.; MONTEIRO, ÁLEFE B.; **ANDRADE, HUMBERTO H. N.**; GONZAGA, THALLITA K. S. N.; SILVA, PABLO R.; ALVES, DANIELLE N.; CASTRO, RICARDO D.; MAIA, MAYARA S.; SCOTTI, MARCUS T; SOUSA, DAMIÃO P; ALMEIDA, REINALDO N. Involvement of GABAA Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal. BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, v. 2021, p. 1-17, 2021.

MONTEIRO, ÁLEFE BRITO; **de Andrade, Humberto Hugo Nunes**; FELIPE, CÍCERO FRANCISCO BEZERRA; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA. Pharmacological Studies on Cinnamic Alcohol and Its Derivatives. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, v. 31, p. 16-23, 2021.

ASSIS, DAVIDSON BARBOSA; ARAGÃO NETO, HUMBERTO DE CARVALHO; DA FONSÊCA, DIOGO VILAR; **de Andrade, Humberto Hugo Nunes**; BRAGA, RENAN MARINHO; BADR, NADER; MAIA, MAYARA DOS SANTOS; CASTRO, RICARDO DIAS SCOTTI, LUCIANA ; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA . Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review. Frontiers in Pharmacology, v. 11, p. 777, 2020.

ANDRADE, H. H. N.; MONTEIRO, A. B.; BRAGA, RENAN MARINHO; CRUZ, R. M. D.; SALVADORI, M. G. S. S. ; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; SOUSA, D. P. ; ALMEIDA, R. N. . Anxiolytic and antinociceptive-like effects of cinnamic alcohol by possible GABAergic

pathway modulation: In vivo and in silico studies. Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 51372-51389, 2020.

DA CRUZ, RYLDENE MARQUES DUARTE ; BRAGA, RENAN MARINHO ; **de Andrade, Humberto Hugo Nunes** ; MONTEIRO, ÁLEFE BRITO ; LUNA, ISADORA SILVA ; DA CRUZ, RAYSSA MARQUES DUARTE ; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; MENDONÇA-JUNIOR, FRANCISCO JAIME BEZERRA ; DE ALMEIDA, REINALDO NÓBREGA . RMD86, a thiophene derivative, promotes antinociceptive and antipyretic activities in mice. HELIYON, v. 6, p. e05520, 2020.

SOARES DE LIMA, LAYSA KAREN; **Nunes de Andrade, Humberto** ; MONTEIRO PIMENTEL, MARCELA ; FERNANDES BRAGA, JOÃO EUCLIDES ; DE MORAIS PORDEUS, LIANA CLÉBIA . [ID 54818] EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDULA ANGUSTIFÓLIA MILL. SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE USUÁRIOS DE CRACK EM ABSTINÊNCIA. REVISTA BRASILEIRA CIÊNCIAS DA SAÚDE, v. 24, p. 549-556, 2020.

Artigos aceitos para publicação

SILVA, P. R. ; ANDRADE, J. C. ; SOUSA, N. F. ; PORTELA, A. C. R. ; PIRES, H. F. O. ; REMIGIO, M. C. R. B. ; ALVES, D. N. ; **ANDRADE, H. H. N.** ; SALVADORI, M. G. S. S. ; GOLZIO, A. M. F. O. ; CASTRO, R. D. ; SCOTTI, MARCUS ; FELIPE, C. F. B. ; ALMEIDA, R. N. ; SCOTTI, LUCIANA . Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer and Parkinson Disorders: A Review with experimental approach.. Current Neuropharmacology, 2022.

Patentes e registros

ALMEIDA, R. N. ; CRUZ, R. M. D. ; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. ; MONTEIRO, A. B. ; CRUZ, R. M. D. ; BRAGA, RENAN MARINHO ; **ANDRADE, H. H. N.** . FÁRMACO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DA DOR E/OU DA HIPERTERMIA EM HUMANOS E ANIMAIS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201902808, título: "FÁRMACO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DA DOR E/OU DA HIPERTERMIA EM HUMANOS E ANIMAIS", Instituição de registro: Universidade Federal da Paraíba. Depósito: 27/12/2019

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

BRAGA, J. E. F.; TRAJANO, F. M. P.; SERRANO, R. M. S. M.; ANDRADE, H. H. N.. Participação em banca de Vanessa Miranda da Silva. Uso de substâncias psicoativas por Residentes Multiprofissionais em Saúde no município de João Pessoa/PB. 2019. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Residência Multiprofissional em Saúde Mental - NESC/CCS/UFPB) - Universidade Federal da Paraíba.

BRAGA, J. E. F.; TRAJANO, F. M. P.; ALVARENGA, J. P. O.; ANDRADE, H. H. N.. Participação em banca de Giovanna Carvalho Martins. ANSIEDADE EM RESIDENTES VINCULADOS AOS PROGRAMAS DE RESIDÊNCIAS MULTIPROFISSIONAIS EM SAÚDE. 2019. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Residência Multiprofissional em Saúde Mental - NESC/CCS/UFPB) - Universidade Federal da Paraíba.

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

BELEM, L. F.; OLIVEIRA NETO, M. F.; de **ANDRADE, HHN**. Participação em banca de MARIA EDUARDA LIMA GADELHA. Níveis de ansiedade e depressão nos idosos da universidade aberta à maturidade de campina grande - PB em período de pandemia. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba.

SALVADORI, M. G. S. S.; ASSIS, T. S.; **ANDRADE, H. H. N.**. Participação em banca de DIEGO DE CALDAS LACERDA. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA-SÍMILE DO 2-ALILFENOL. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba.

SANTOS, L. B. P.; ALVES, K. K. A. F.; **ANDRADE, H. H. N.**. Participação em banca de LARISSA STEFANE RODRIGUES DE OLIVEIRA. O PAPEL DO ENFERMEIRO NO DIAGNOSTICO PRECOCE DA TUBERCULOSE NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) - FACULDADE IRECE.

OLIVEIRA, D. V.; CAVALCANTE, N. S. A.; **ANDRADE, H. H. N.**. Participação em banca de RIELLY CARDOSO DOS SANTOS. OS IMPACTOS DA PANDEMIA DA COVID-19 NA SAÚDE MENTAL DO ENFERMEIRO DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI). 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) - FACULDADE IRECE.

Capítulos de livros publicados

de Andrade, HHN; MONTEIRO, A. B; CASTRO, RICARDO D.; ALMEIDA, R. N.. Potencial uso terapêutico de óleos essenciais no alívio da dor. In: Damião Pergentino de Sousa. (Org.). Óleos Essenciais: Abordagem Farmacêutica e Clínica. 1ed.: Laszlo, 2022, v. 1, p. 1-501.

ANDRADE, H. H. N.; CARNEIRO, C. A.; ARAUJO, A. N. V; CAVALCANTE, I. L; ALMEIDA, R. N.; SALVADORI, M. G. S. S. A BUSCA POR NOVOS PSICOFÁRMACOS: estudos do Laboratório de Psicofarmacologia. In: Mirian G. S. Stiebbe Salvadori, Melyssa Kellyane Cavalcanti Galdino, Carla Alexandra Moita Minervino. (Org.). NEUROCIÊNCIA EM CENA: um breve percurso pela cognição e comportamento. 1ed. João Pessoa/PB: EDITORA UFPB, 2021, v. , p. 19-293.

de Andrade, HHN; ALMEIDA, R. N.. PRODUTOS VEGETAIS COMO FONTE PARA TRATAMENTO DA ANSIEDADE. In: Aleson Pereira de Sousa, Ana Laura de Cabral Sobreira, Danilo Duarte de Assis Gadelha, Diana Pontes da Silva, Edeltrudes de Oliveira Lima, Edvaldo Balbino Alves Júnior, Francielly Negreiros de Araújo, Francisco Patricio de Andrade Júnior, Giulian César da. (Org.). AQUI SE FAZ CIÊNCIA! PESQUISAS DESENVOLVIDAS EM UNIVERSIDADES FEDERAIS E SUAS APLICABILIDADES PARA A SOCIEDADE. 1ed. Goiânia - Goiás: Editora Espaço Acadêmico, 2020, v. 1, p. 182-184.

ARAGAO NETO, H. C.; FONSECA, D. V. ; BRAGA, RENAN MARINHO; **ANDRADE, H. H. N.** ; ALMEIDA, R. N. . ESTUDO NÃO CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DO (+)-3-CARENO EM MODELOS IN VIVO. In: Giselle Medeiros da Costa One. (Org.). ESTUDO NÃO CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DO (+)-3-CARENO EM MODELOS IN VIVO. 36ed. João Pessoa: IMEA, 2019, v. 1, p. 769-785.