



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS (PPGNSB)**

ANA PAULA LOPES NUNES

**Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol)
associado à codeína na região orofacial em camundongos**

**João Pessoa-PB
2021**

Ana Paula Lopes Nunes

**Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol)
associado à codeína na região orofacial em camundongos**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal da
Paraíba para obtenção do grau de
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

**Orientador: Prof Dr. Ricardo Dias de
Castro**

**João Pessoa-PB
2021**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N972e Nunes, Ana Paula Lopes.
Efeito antinociceptivo do geraniol
(trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à
codeína na região orofacial em camundongos / Ana Paula
Lopes Nunes. - João Pessoa, 2021.
76 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Óleos essenciais. 2. Geraniol - Monoterpenos. 3.
Antinociceptivo. 4. Dor orofacial. 5. Produtos
naturais. I. Castro, Ricardo Dias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 665.5(043)



PgPNsb

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 438ª (quadringentésima trigésima oitava) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Ana Paula Lopes Nunes**, candidata ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia oito de junho do ano de dois mil e vinte e um (08/06/2021), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/jje-vwck-znc>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Ana Paula Lopes Nunes**, candidata ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Mirian Gaciela da Silva Stiebbe Salvadori, Ph.D em Farmacologia, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Ph.D em Farmacologia e Ricardo Dias Castro, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Comissão, professor Ricardo Dias Castro, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Ana Paula Lopes Nunes**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína na região orofacial em camundongos”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Ana Paula Lopes Nunes** legalmente habilitada a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Ricardo Dias Castro (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Mirian Gaciela da Silva Stiebbe Salvadori (Examinadora)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Examinador)

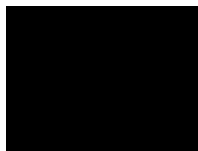




PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ana Paula Lopes Nunes (Discente)



Ana Paula Lopes Nunes

**Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol)
associado à codeína na região orofacial em camundongos**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal da
Paraíba para obtenção do grau de
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

Aprovado em 08/06/2021

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Orientador – UFPB**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Examinador Interno – UFPB**

**Profa. Dra. Mirian Stiebbe Salvadori
Examinadora Externa – UFPB**

*Aos meus pais, por terem me ensinado
tudo de que precisei para essa conquista,
amor e perseverança.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e à minha **Mãe Rainha Três Vezes Admirável**, os quais, em todas as horas de atribulações, motivaram-me para realização deste sonho tão desejado.

Ao meu esposo, **Rodrigo Eloy**, pelo seu amor, atenção e por toda dedicação e preocupação com meu projeto. Muito obrigada por todo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, a fim de que este e outros projetos fossem realizados. Esta vitória é NOSSA.

Aos meus pais, **Antonio Nunes Bernadino** e **Edinovalda Lopes Leite Nunes** por toda uma vida dedicada a minha formação em todos os aspectos. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por sempre colocarem a minha educação e a dos meus irmãos em primeiro lugar.

Aos meus irmãos **Alan Nunes** e **Alex Lopes** por serem meus apoios enviados por Deus. É imensurável o amor que tenho por vocês dois.

Aos meus avós, que sempre estiveram presentes em minha vida, torcendo e vibrando por cada vitória. Agradeço, especialmente, ao meu avô **Antonio Lopes de Lima** e a minha avó **Odete Pereira de Lima** por todas as orações.

A minha sogra e grande amiga **Romeyka Eloy**, por todo carinho e atenção que me dedica.

Ao meu mestre, **Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro**, pelo profissionalismo, pela oportunidade de ser sua aluna e ingressar na Psicofarmacologia. Sou grata desde a primeira reunião na qual o senhor mesmo sem ainda me conhecer, resolveu me dar essa

grande oportunidade. Obrigada por ter me ensinado tanto com sua paciência e sabedoria.

A todos os professores desta pós-graduação pelos ensinamentos, em especial, às professoras **Bagnólia Araújo, Edeltrudes de Oliveira Lima, Márcia Regina Piuvezam e Fabiana de Andrade Cavalcante.**

Aos meus amigos de Laboratório, em especial, **Danielle Nóbrega, Renan Marinho, Aline Kelly, Humberto Hugo e Álefe Monteiro** pela amizade e pelos momentos de descontração, os quais tornaram essa caminhada mais leve e divertida.

À toda equipe do Biotério, por toda ajuda para realização desse trabalho.

A todos os animais que tornaram possível a execução deste trabalho, meu profundo respeito.

*"Do mesmo modo que o metal enferruja com a ociosidade
e a água parada perde sua pureza, assim a inércia esgota
a energia da mente." (Leonardo da Vinci)*

NUNES, A. P., L. Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína na região orofacial em camundongos. 2021. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

RESUMO

A perspectiva de se obter novas alternativas para a terapia farmacológica da dor orofacial impulsiona a realização de investigações de produtos de origem natural com ação antinociceptiva associado a um analgésico opióide. Dessa maneira, o objetivo do referido estudo foi averiguar a atividade do geraniol associado a codeína na modulação da nocicepção orofacial, e possível efeito depressor a nível SNC. Este estudo caracteriza-se como não-clínico, controlado e triplo-cego. Foi adotado um modelo experimental de nocicepção em camundongos: teste da formalina,...Para cada teste realizado, seis animais por grupo foram tratados, 30 minutos antes do início do experimento, pela via intraperitoneal (i.p.), de acordo com os seguintes grupos experimentais: a) geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg; b) geraniol 50 mg/kg + codeína 15 mg/kg; c) geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg; d) geraniol 50mg/kg; e) codeína 30 mg/kg (controle positivo); f) 0,9% cloreto de sódio (controle negativo). A análise do comportamento de nocicepção dos animais foi realizada após a injeção de glutamato (20 µl, 25µM), capsaicina (20µl, 2.5µg) e formalina (20µl, 20%), na região de lábio superior direito (perinasal) do animal. Como parâmetro comportamental, foi considerado o tempo em segundos, de fricção da referida região pelas patas traseiras ou dianteiras. Os resultados mostraram que no teste do glutamato o geraniol e a codeína nas concentrações de 50 mg/kg e 30 mg/kg apresentaram uma redução de 54,2% no tempo de fricção, essa mesma dose inibiu em 66,7% a nocicepção no teste da capsaicina ($p < 0,005$). No teste da formalina, a associação nessa mesma dose conseguiu reduzir a nocicepção em 86% ($p < 0,005$). Como intuito de investigar uma possível atividade miiorrelaxante e neurotóxica que pudessem interferir nos resultados, também foi realizado o teste do rota-rod, onde se observou ausência de tais efeitos. Portanto, a partir destes dados experimentais, pode-se sugerir que exista um possível sinergismo do geraniol associado a codeína na atividade antinociceptiva orofacial.

Palavras-chaves: geraniol, monoterpenos, antinociceptivo, dor orofacial, óleos essenciais, produtos naturais.

NUNES, A. P., L. Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína na região orofacial em camundongos. 2021. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

ABSTRACT

The prospect of obtaining new alternatives for the pharmacological therapy of orofacial pain drives the investigation of products of natural origin with antinociceptive action associated with an opioid analgesic. Thus, the aim of this study was to investigate the activity of geraniol associated with codeine in the modulation of orofacial nociception, and possible depressant effect at the CNS level. This study is characterized as non-clinical, controlled and triple-blind. An experimental model of nociception in mice was adopted: formalin test,....For each test performed, six animals per group were treated, 30 minutes before the beginning of the experiment, by the intraperitoneal route (ip), according to the following experimental groups: a) geraniol 50 mg/kg + codeine 30 mg/kg; b) geraniol 50 mg/kg + codeine 15 mg/kg; c) geraniol 50 mg/kg + codeine 7.5 mg/kg; d) geraniol 50mg/kg; e) codeine 30 mg/kg (positive control); f) 0.9% sodium chloride (negative control). The analysis of the nociceptive behavior of the animals was performed after the injection of glutamate (20 µl, 25µM), capsaicin (20µl, 2.5µg) and formalin (20µl, 20%) in the right upper lip (paranasal) region of the animal. As a behavioral parameter, the time in seconds of friction of the referred region by the hind or front paws was considered. The results showed that in the glutamate test, geraniol and codeine in concentrations of 50 mg/kg and 30 mg/kg presented a reduction of 54.2% in the friction time, this same dose inhibited in 66.7% the nociception in the test of capsaicin ($p<0.005$). In the formalin test, the association at the same dose was able to reduce nociception by 86% ($p<0.005$). In order to investigate a possible myorelaxant and neurotoxic activity that could interfere with the results, the rota-rod test was also performed, where no such effects were observed. Therefore, from these experimental data, it can be suggested that there is a possible synergism of geraniol associated with codeine in orofacial antinociceptive activity.

Keywords: geraniol, monoterpenes, antinociceptive, orofacial pain, essential oils, natural products.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs: Anti-inflamatórios não-esteroidais

AMPA: Alfa-amino-3-hidroximetil-5-4 - receptores do ácido isoxazolpropiónico

ANOVA: Análise de variância

ATM: Articulação temporomandibular

ATP: Trifosfato de adenosina

ASICs: Canais sensíveis a ácido

A2: Receptor adrenérgico

B1: Receptor para bradicinina 1

B2: Receptor para bradicinina 2

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX2: Ciclo-oxigenase-2

CUMS: Estresse leve imprevisível crônico

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

DP: Desvio Padrão

DTM: Disfunção Temporomandibular

EP: Receptor para prostaglandina

FST: Teste de natação forçada

GABA: Ácido Gama Aminobutírico

GIRK: Canal para potássio retificador de corrente acoplado à proteína G

H1: Receptor para histamina 1

IASP :Internacional Association for the Study of Pain

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina-6

iNOS: Enzima óxido nítrico sintase induzível

IPeFarM: Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

ISO: International Standard Organization

LIF: Fator inibidor de leucemia

mGluR: Receptor metabotrópico para glutamato

M2: Receptor muscarínico M2

NE: Neurônios nociceptivos específicos

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NGF: Fator de crescimento nervoso

NMDA: N-metil D-aspartato

NO: óxido nítrico

PAF: Fator ativador de plaquetas

PGE2: Prostaglandina E2

PKA: Fosfoquinase A

PKC: Fosfoquinase C

P2X: Receptor purinérgico 2X

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SP: substância P

SSRT2: Receptor somatostatina tipo 2

TE: Tronco encefálico

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TrkA3: Quinase A do receptor de trombosina

TRPs: Canais de receptores de potencial transientes

TRPV1: Canal de receptor de potencial catiônico transiente vaniloide 1

TST: Teste de suspensão da cauda

TTXr: Receptor dependente de tetrodoxina

WDR: Neurônios de campo dinâmico amplo

5-HT: Serotonina

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	18
II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 Dor orofacial.....	22
2.1.1 Definição e Epidemiologia.....	22
2.1.2 Classificação.....	23
2.1.3 Fisiologia e Fisiopatologia da Dor Orofacial	23
2.2 Plantas medicinais como alternativas terapêuticas.....	27
III. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4. MATERIAL.....	35
4.1 Local da Pesquisa	35
4.2 Substâncias utilizadas.....	35
4.3 Animais	35
4.4 Aparelhagem	35
5. MÉTODOS.....	36
5.2 Condições Experimentais.....	36
5.3 Desenho do Estudo e Cálculo amostral.....	36
5.4 Preparação das substâncias para os testes	37
5.5 Avaliação da atividade nociceptiva orofacial.....	37
5.5.1 Teste da Formalina	38
5.5.2 Teste do Glutamato.....	39
5.5.3 Teste da Capsaicina	39
5.6 Avaliação geral sobre o SNC : Teste do rota-rod.....	39
5.7 Análise Estatística	40
VI CAPÍTULO	42
Introdução	44

Material e Métodos	46
Resultados.....	49
Teste Formalina.....	49
Teste Glutamato	51
Teste Capsaicina.....	52
Teste do Rota-Rod.....	53
Discussão	54
Reconhecimentos.....	59
Referências	59
VII. CONCLUSÃO	66
VIII. REFERÊNCIAS	68
IX. Anexos.....	76
Anexo 1.....	76

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A face e as estruturas cranianas, dentárias e orais associadas, consideradas uma das áreas mais complexas do corpo, contribuem com uma variedade de distúrbios orofaciais, incluindo a Disfunção Temporomandibular (DTM), alterações do sono, a dor orofacial, distúrbios dentários, lesões orais e distúrbios oromotores (ASHRAF et al., 2019). Essas disfunções e distúrbios originam muitas vezes processos dolorosos, que são caracterizados como uma sensação complexa, subjetiva e multidimensional que engloba tanto componentes afetivos e sensitivos quanto cognitivos e motivacionais (CALVINO; GRILO, 2006). A dor constitui-se como uma das maiores causas de sofrimento humano, e por isto as dores orofaciais apresentam elevada casuística chegando a comprometer a qualidade de vida do indivíduo, o que as torna um problema de relevância social e médica (BOTTEGA; FONTANA, 2010).

A dor orofacial está intimamente relacionada às estruturas do pescoço, cabeça e rosto. E, levando em consideração a sua origem que poder ser óssea, muscular, seios, estruturas articulares, pulpar e periodontal, vascular ou glandular, não é surpresa que o diagnóstico exato e o efetivo tratamento das condições dolorosas representam um inconveniente problema de saúde (DE ROSSI, 2013; HARGREAVES, 2011).

A neuralgia do trigêmeo corresponde a um problema que está associada a dor orofacial. Essa neuralgia é caracterizada por ataques de dor de curta duração, como um choque elétrico que surge repentinamente e para, sendo um distúrbio unilateral e limitado à área de inervação de um ou mais ramos do nervo trigêmeo (BAŠIĆ et al., 2017). O nervo trigêmeo possui três ramos: (i) oftálmico, (ii) maxilar e (iii) mandibular. Da mesma forma como em todo o corpo, existem fibras responsáveis pela captação de diversos estímulos. Na região orofacial encontram-se as fibras do tipo A δ e C, que pertencem ao nervo trigêmeo (V par craniano). No gânglio trigeminal também está localizado a soma neuronal, o qual recebe impulsos provenientes dos axônios da periferia da face, que em nível de SNC, faz sinapses em neurônios de 2ª ordem no tronco encefálico (TE) de forma especial no complexo nuclear trigeminal espinal (no qual incluem o núcleo sensitivo do N. trigêmeo e o núcleo do trato espinal do N. trigêmeo, sendo este último dividido nos subnúcleos interpolar, oral e caudal). Com isso, o corpo humano possui receptores sensitivos que captam estímulos térmicos (calor/frio), mecânicos (pressão), químicos e de nocicepção. Este último grupo, os nociceptores, são conhecidos também como

receptores polimodais, e isto está relacionado a sua capacidade de ser ativado por estímulos de diversas naturezas, porém de elevada intensidade (SESSLE, 2000).

O tratamento da dor ainda consiste em um importante desafio, e devido a isso as principais opções farmacológicas usadas para aliviar dores agudas e crônicas, inclusive orofaciais, continuam sendo os analgésicos opióides, e não opióides, drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) e anticonvulsivantes (HARGREAVES, 2011; MIRANDA et al., 2009). No entanto, quando os pacientes são expostos a esses medicamentos a longos prazos, infelizmente o uso destes é limitado, pois tendem a apresentar efeitos indesejáveis, com destaque para os fármacos opióides que podem causar depressão respiratória, náusea, sedação, deficiência cognitiva e tolerância (HOSKIN; HANKS, 1991). Com isso, aliviar a dor significa transformar o tratamento em um processo menos traumático para o paciente, o que motiva a busca por novas soluções terapêuticas. Nesse contexto, os óleos essenciais surgem como uma relevante terapia para as condições dolorosas, incluindo a dor orofacial. (DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2013; DAMASCENO et al., 2016; TOMAZ-MORAIS et al., 2017; MELO et al., 2017; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017, LEITE et al., 2019).

Os óleos essenciais, encontrados em plantas aromáticas, são substâncias que contém muitos constituintes químicos, com destaque para os monoterpenos que se caracterizam por apresentarem unidades isoprenicas, compostas por dez unidades de carbono. Os monoterpenos possuem diversas atividades farmacológicas, podemos destacar suas atividades antinociceptivas e anti-inflamatória já relatadas na literatura (LEI et al., 2018; NEWMAN; CRAGG, 2020). Experimentos realizados com carvacol, monoterpeno encontrado em óleos essenciais, associado a β - ciclodextrina conseguiu reduzir a nocicepção orofacial em modelo de roedores (SILVA et al., 2016). Outro estudo que utilizou o método da placa quente e o teste das contorções induzidas por ácido acético em camundongos, revelou que monoterpenos isolados a partir do óleo essencial de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.], o mirceno (RAO; MENEZES; VIANA, 1990; VIANA et al. 2000), ou o (-)-mentol, encontrado em espécies do gênero *Mentha* (GALEOTTI et al., 2002), apresentaram redução da nocicepção.

O geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) é um álcool monoterpênico acíclico (DEWICK, 2009) e apresenta-se como um óleo amarelo pálido, insolúvel em água (LAPCZYNSKI, A. et al., 2008). Possui diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, dentre elas podemos destacar seu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, que foi apresentado em um estudo realizado por Costa et al. (2020), onde

através de modelos clássicos para avaliação da nocicepção orofacial em roedores, demonstraram a capacidade desse óleo de reverter quadros nociceptivos.

Estes resultados sustentam a hipótese de que o geraniol associado a codeína, um analgésico opióide reconhecido por sua utilização clínica para o tratamento de dores orofaciais, representa uma interessante estratégia terapêutica, na medida em que o sinergismo, decorrente de diferentes mecanismos de ação promovidos por essas substâncias, pode garantir eficácia farmacológica com administração de doses menores que as usuais, minimizando, assim, os reconhecidos efeitos adversos promovidos pela codeína. Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos antinociceptivos da associação do geraniol com a codeína.

II. FUNDAMENTAMENTAÇÃO TEÓRICA

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dor orofacial

2.1.1 Definição e Epidemiologia

De acordo com a *Internacional Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é definida como uma experiência desagradável na qual estão envolvidos aspectos sensoriais e emocionais e que está associada a uma lesão real ou potencial. Sendo uma experiência que atinge desde os aspectos ligados a transdução de sinais pelo sistema nervoso, como também abrange fatores cognitivos e afetivos (AUVRAY et al., 2010). A dor orofacial é caracterizada por envolver tecidos moles e duros da região da cabeça e pescoço (HALPERN; WILLIS, 2016). É importante destacar que muitas vezes essa condição altera a qualidade de vida do paciente, sendo dessa forma de difícil quantificação e manejo terapêutico (THOMAS, 2003). Os mecanismos que podem desencadeá-la ainda não foram completamente elucidados. Acredita-se que fatores ambientais, comportamentais, fisiológicos e estruturais podem estar relacionados com sua multifatoriedade (FAVERO, 1999; COSTA et al., 2004).

Dados epidemiológicos revelam que a dor orofacial além de ser um problema de saúde pública, ela também chega a afetar mais mulheres do que homens, atingindo no total cerca de 10 a 25% da população mundial (SHETTY et al., 2015). Um estudo feito com uma população da região nordeste da Inglaterra, chegou a calcular que em média cada paciente gasta em torno de 4 mil dólares com tratamentos para esse tipo de dor, contudo na maioria das vezes a melhora não é atingida (BRECKONS et al., 2018). No estudo de Smiljic et al. (2016), foi possível observar que cerca de 32% de uma população de 319 estudantes universitários sérvios manifestavam alguma experiência relacionada a quadros de dor orofacial, e dentre eles a maioria atingida era do sexo feminino com 56%.

No Brasil, também foram realizados estudos com o intuito de estimar a quantidade de pessoas que são afetadas por essa condição dolorosa. Dentre esses estudos podemos destacar, o trabalho realizado por Ruivo et al. (2015), no qual revelou que mais da metade da população da cidade de Piracicaba/SP apresentou dor orofacial, sendo que 67% dos afetados são referentes ao sexo feminino. Já em outro estudo no qual a população da Zona Oeste de São Paulo também foi avaliada com relação a mesma condição de dor orofacial, mostrou uma alta prevalência desse quadro e de dor de cabeça (55,5%), e novamente foi possível observar que a maior ocorrência foi em mulheres e pacientes idosos (SIQUEIRA et al., 2015).

2.1.2 Classificação

Em virtude das particularidades relacionadas a dor orofacial, o diagnóstico desta se torna desafiador para o profissional de saúde. Portanto, a utilização de uma correta classificação auxilia e aumenta as possibilidades de êxito do tratamento. (SHEPHARD et al., 2014).

Uma das classificações da dor orofacial é baseada na ontologia, possuindo três níveis. No primeiro nível destaca-se a percepção individual do paciente, no segundo nível encontram-se as representações cognitivas que estão relacionadas às interpretações do paciente e do clínico. No último nível, o terceiro, tem-se a junção das afirmações do clínico e do paciente com os sistemas de classificação, terminologias e registros de saúde. Esta divisão elege como critérios a universalidade e particularidades das dores orofaciais (NIXDORF et al., 2012).

A dor orofacial também pode ser classificada de acordo com dois eixos: eixo I e eixo II. O eixo I ainda pode ser subdividido em duas categorias, a dor neuropática e a dor somática. Ainda neste eixo são inclusas as condições físicas que são encarregadas da nocicepção. Com relação ao eixo II tem-se as condições psicológicas, como principal fator que podem levar a estimular e modular as experiências dolorosas. Dentre estas condições, pode-se citar os transtornos de humor e de ansiedade. Esta classificação é considerada abrangente e completa ao passo que consegue reunir tanto as condições físicas como também as psicológicas (OKESON, 2008).

Na classificação internacional de desordens de dores de cabeça, a dor orofacial está integrada na segunda parte, a qual se refere as dores secundárias. As dores secundárias compreendem à seção de dor de cabeça ou dores faciais que estão diretamente relacionadas as desordens das estruturas da cabeça, pescoço, olhos, ouvidos, seios, dentes, boca ou outras estruturas cervico-faciais. Porém, ainda podemos encaixar ou inserir alguns tipos de dor orofacial nas dores do tipo primária, como por exemplo as dores de cabeça em decorrência de uma tensão, ou quando o diagnóstico desta é incerto (ARNOLD, 2018).

2.1.3 Fisiologia e Fisiopatologia da Dor Orofacial

A alta sensibilidade existente na região orofacial está ligada a presença de grandes quantidades de inervações, o que facilita a percepção de estímulos sensitivos. Embora existam outros nervos cranianos ou nervos cervicais que supram pequenas áreas

da região craniofacial, é o nervo sensorial trigêmeo (V) que predominantemente atende os tecidos craniofaciais. O nervo trigêmeo é o quinto dos doze pares de nervos cranianos, possuindo a maior distribuição cefálica que é considerada praticamente exclusiva (GÓES; FERNANDES, 2008). Este nervo possui três ramos, que são: o ramo oftálmico (ou primeira divisão) responsável por suprir principalmente os tecidos supraorbitais como, por exemplo, a pele que encobre a região do osso frontal, meninges e córnea; o ramo maxilar (ou segunda divisão), que inerva principalmente a pele infraorbital, lábio superior, mucosa maxilar e dentes; e o ramo mandibular (ou terceira divisão) que supre principalmente a pele da mandíbula, lábio inferior, mucosa mandibular e dentes (SESSLE, 2011; DUBNER et al., 2013; CAIRNS et al., 2014).

Esses ramos possuem fibras sensoriais do tipo A-beta, A-delta e C. As fibras aferentes primárias são A-beta de tamanho grande e as A-delta que possuem tamanho médio. Estas, por sua vez, são mecanorreceptores de baixo limiar, e são ativadas principalmente por estímulos táteis ou proprioceptivos. Já as fibras A-delta e C possuem ativação em decorrência de estímulos nocivos. As fibras A-delta que são ativadas por estímulos nocivos são fibras mielinizadas de pequeno diâmetro e as do tipo C são fibras menores, não mielinizadas e de condução mais lenta. Os aferentes A-beta também podem assumir uma função nociceptiva em algumas condições de dor. Entretanto, nem todas as fibras aferentes A-delta e C, carregam somente informações nociceptivas, pois algumas estão associadas a receptores que respondem ao resfriamento não nocivo, aquecimento ou mesmo estímulos táteis (SESSLE, 2011; DUBNER et al., 2013; CAIRNS et al., 2014).

O neurônio nociceptivo, de uma forma geral, possui componentes operacionais importantes: o terminal periférico inerva o tecido alvo e transduz o estímulo nocivo em impulso nervoso, o axônio conduz o potencial de ação, o corpo celular (gânglio) controla a identidade neural e o terminal central transmite a informação para neurônios de segunda ordem nas sinapses centrais (WOOLF; MA, 2007). As fibras nervosas associadas que são conduzidas para o SNC, podem ser ativadas em decorrência dos disparos de potenciais de ação que são resultantes da estimulação dos diferentes tipos de terminações aferentes. Essas ativações contribuem com informações discriminativas sobre a localização, qualidade, intensidade e duração do estímulo que as ativa e no caso dos nociceptores, resulta também nas qualidades afetivo-motivacionais da dor. (IWATA et al., 2011; SESSLE, 2011). A maioria destes sinais de ativação neural termina no tronco encefálico, e outros são projetados para outras estruturas superiores. Eles são modulados por

substâncias neurotransmissoras como dopamina, noradrenalina, serotonina e opióides (MERRILL, 2007; LAVIGNE; SESSLE, 2016).

Estímulos nocivos que são gerados próximos às terminações nervosas livres causam uma diminuição do limiar de ativação destas, provocando dessa forma uma maior sensibilização periférica, contribuindo, portanto, com o estado de hiperalgesia ou dor espontânea. Além disso, alguns neurônios nociceptivos podem liberar neuropeptídios, como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que diminuem o limiar de disparo do potencial de ação e participam da inflamação neurogênica. Os mediadores inflamatórios que também são resultantes da ativação por estímulos nocivos, também contribuem para a hiperexcitabilidade dos neurônios nociceptivos. Estes mediadores contribuem com a modulação do padrão de resposta dos canais iônicos, como os canais de receptores de potencial transientes (TRPs), canais sensíveis a ácido (ASICs) e canais purinérgicos (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; SESSLE, 2011) (Figura 1).

Portanto, a ativação ou sensibilização periférica das terminações nociceptivas envolvem diferentes tipos de mediadores químicos como a bradicinina, eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), histamina, citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β), fator inibidor de leucemia, fator de crescimento nervoso (NGF), fator ativador de plaquetas (PAF), ATP, quimiocinas e proteases, sendo possível ainda destacar os vários mediadores que também têm ações no SNC como por exemplo, glutamato, ácido gama aminobutírico [GABA], serotonina [5-HT] e noradrenalina, bem como neuropeptídios (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; UEDA, 2006; WOOLF; MA, 2007; VERMA et al., 2015; SESSLE, 2011; DUBNER et al., 2014; CAIRNS et al., 2014).

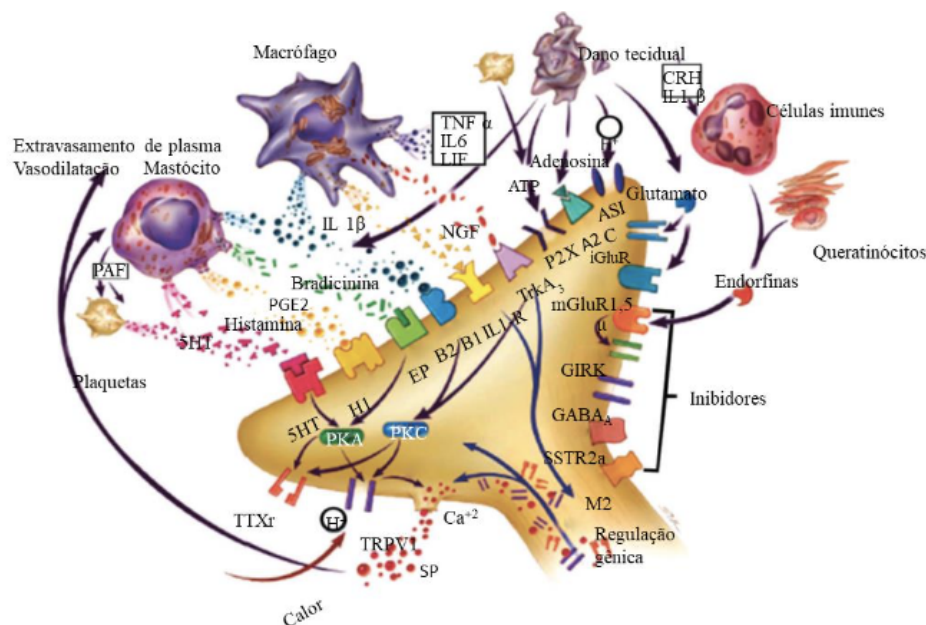


Figura 1: Representação do neurônio sensorial nociceptivo e as diferentes interações com mediadores na sensibilização periférica. 5-HT: serotonina, A2: receptor adrenérgico, ASIC: canal iônico sensível a ácido, ATP: trifosfato de adenosina, B1 e B2: receptor para bradicinina 1 e 2, CRH: hormônio liberador de corticotrofina, EP: receptor para prostaglandina, GABA: ácido gama-aminobutírico, GIRK: canal para potássio retificador de corrente acoplado à proteína G, mGluR: receptor metabotrópico para glutamato, H1: receptor para histamina 1, IL 1β: interleucina 1 β, IL-6: interleucina-6, LIF: fator inibidor de leucemia, PAF: fator de crescimento plaquetário, PGE2: prostaglandina, PKA: fosfoquinase A, PKC: fosfoquinase C, SP: substância P, P2X: receptor purinérgico 2X, M2: receptor muscarínico M2, NGF: fator de crescimento do nervo, SSRT2: receptor somatostatina tipo 2, TNF-α: fator de necrose tumoral, TRPV1: canal transiente vaniloide 1, TrkA3: quinase A do receptor de trompomiosina, TTXr: receptor dependente de tetrodoxina. Adaptado de Chichorro et al. (2017).

As Fibras do tipo A-delta e C projetam seus axônios para os tecidos periféricos e para o SNC através do tronco encefálico, neste local é onde as sinapses com neurônios secundários são realizadas, principalmente no complexo trigeminal. O complexo do núcleo trigeminal é formado pelo núcleo sensorial principal e pelo trato do núcleo espinal, subdividido em núcleo oral, interpolar e caudal. Sendo este último considerado a principal via de transmissão do tronco encefálico para as informações nociceptivas do nervo trigêmeo, pois o subnúcleo caudal possui duas populações de neurônios nociceptivos, os neurônios nociceptivos específicos (NE) e neurônios de campo dinâmico amplo (WDR), também conhecidos como neurônios de segunda ordem. (SESSLE, 2011; NIXDORF, et al., 2012; SESSLE, 2005; WILCOX et al., 2015; LAVIGNE e SESSLE, 2016).

Os componentes do complexo trigeminal do tronco encefálico projetam-se para muitas regiões talâmicas (tálamo ventrobasal, núcleo submédio, núcleo intralaminar) e regiões de alvo talâmico (ínsula, córtices somatossensorial primário e secundário, córtex cingulado). E dentre as estruturas centrais, o tálamo desempenha um importante papel na

condução da dor, pois essas regiões talâmicas são ricas em NE e WDR, permitindo que essas regiões recebam e retransmitam as informações nociceptivas orofaciais que a elas chegam. Todos esses neurônios fazem sinapse com os neurônios de terceira ordem. Os neurônios de terceira ordem partem do tálamo e se projetam para o córtex somatossensorial, resultando no processamento de aspectos cognitivos e afetivos. Variações nesses processos relacionados a condução da via trigeminal muitas vezes tem como consequência a dor orofacial, a exemplo da neuralgia do trigêmeo, a disfunção temporomandibular e a migrânea (SESSLE, 2005; SESSLE, 2011; LAVIGNE; SESSLE, 2016; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

É importante destacar que os nervos aferentes nociceptivos podem sofrer adaptações fenotípicas em decorrências de certas condições, a exemplo da expressão de receptores ou canais iônicos pode ser alterada em resposta à inflamação periférica. Estados de dor neuropática ou condições inflamatórias podem provocar lesões no nervo, resultando em mudanças transcricionais que contribuem para o desenvolvimento de descarga ectópica anormal. Isso pode promover alterações nos corpos celulares neuronais do gânglio V, nas próprias fibras aferentes V, que envolvem vários mediadores químicos, podendo afetar também as células gliais satélites que encapsulam a célula ganglionar corpos (SESSLE, 2011; IWATA et al., 2011; DUBNER et al., 2014; CAIRNS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2009; XU et al., 2016).

2.2 Plantas medicinais como alternativas terapêuticas

Por muitos séculos a medicina popular se utilizou de plantas medicinais para tratamento de enfermidades através de infusões, decocções, emplastros, pomadas e óleos, ou na fitoterapia galênica, com preparação de extratos, tinturas, misturas, etc (BRASIL, 2005). O Brasil possui uma biodiversidade que representa uma das maiores fontes de substâncias biologicamente ativas do mundo. Dessa forma, o seu grande potencial para geração de novos fármacos é incontestável, pois a sua própria história está diretamente ligada à comercialização de produtos naturais. A maioria dos medicamentos utilizados hoje em dia na clínica é oriunda ou de produtos naturais ou é proveniente de algum processo de síntese, tendo como protótipo um produto natural. Esses produtos são importantes fontes de substâncias com atividade biológica as plantas, fungos e as bactérias. Sendo dessa maneira, os produtos naturais são de fundamental importância pois incontáveis metabólitos secundários são gerados, servindo como matéria-prima para a

produção de novos medicamentos pela química medicinal (BARREIRO, 1999; BAKER, 2007; LOMBARDINO, 2004).

Os óleos essenciais, oriundos de plantas aromáticas podem apresentar inúmeras propriedades biológicas. A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas através de extração por hidrodestilação, por destilação fracionada, ou por processos mecânicos. Estes compostos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, principalmente nas flores, ou ainda em folhas, casca das árvores, raízes, resinas e casca de frutos. Os óleos essenciais são produzidos pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários naturais (ALMEIDA; MOTTA; LEITE, 2003).

A maioria dos óleos essenciais são quimicamente constituídos de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, cuja presença dos terpenos se faz presente de maneira dominante, principalmente os de baixo peso molecular, como no caso os monoterpenos (SIMÕES; SPITZER, 2007). No momento atual, são conhecidos mais de 1.000 monoterpenóides naturais e alguns são habitualmente usados como componentes de fragrância, aditivos alimentares e uma grande variedade pode ser encontrada em conservantes, cosméticos, sabonetes, produtos de limpeza, desinfetantes e medicamentos (ABU-LAFI et al., 2007). Além disso, os monoterpenos em geral são considerados uma nova classe de agentes químicos preventivos para o câncer, pois promovem atividade antitumoral (CARNESECCHI, 2001).

Encontrado em mais de 160 óleos essenciais de plantas aromáticas, o geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) é um álcool acíclico monoterpeno de fórmula bruta $C_{10}H_{18}O$. Sua estrutura química é apresentada na figura 2. Entre os óleos específicos com alto teor de geraniol, encontramos Ceilão Citronela (*Cymbopogon Nardus*), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*), Gerânio (*Pelargonium graveolens*) e Java Citronela (*Cymbopogon winterianus*). Em sua forma pura apresenta uma textura oleosa, sendo um líquido incolor e com um aroma de rosa (LAPCZYNSKI et al., 2008).

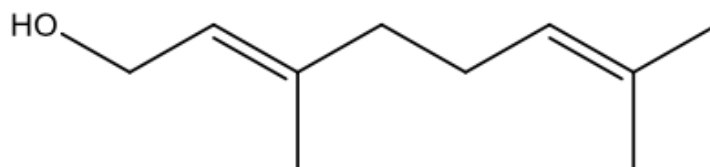


Figura 2 – Estrutura química do geraniol.

De acordo com dados da literatura, o geraniol tem apresentado atividades farmacológicas variadas. Dentre essas, foram destacadas uma eficaz ação repelente e inseticida (KHALLAAYOUNE et al., 2009). Em outros estudos foram destacadas ação antihelmíntica (HIERRO et al., 2004), antimicrobiana (SI et al., 2006), antioxidante e citoprotetora (TIWARI; KAKKAR, 2009). Em experimentos realizados em roedores, o geraniol exerceu atividade protetiva da mucosa gástrica e duodenal contra danos causados por etanol, úlceras e lesões induzidas por cisteamina (CARVALHO et al., 2014), também demonstrou atividade antitumoral in vitro e in vivo, contra leucemia, hepatoma e células de melanoma (CARNESECCHI et al., 2001). O geraniol também demonstrou efeito na neuropatia diabética, uma evidência que sugere um papel neuroprotetor (MURALIDHARA; PRASAD, 2014). Também foi observado, um potencial efeito antidepressivo em decorrência do tratamento com geraniol. Camundongos em tratamento com geraniol por 3 semanas, foram expostos a estresse médio imprevisível crônico (CUMS), em testes de natação forçada (FST) e testes de suspensão da cauda (TST). Esse estudo revelou que comportamentos relacionados à depressão foram significativamente aliviados, em decorrência da atividade do geraniol na regulação da neuroinflamação induzida por citocina pró-inflamatória interleucina-1 beta (IL-1 β) . Mostrando que o geraniol possivelmente reverteu a elevação de IL-1 β induzida por CUMS, inibiu a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e regulou a ligação de nucleotídeos e oligomerização da família de receptores semelhantes ao domínio pirina contendo o domínio 3 (NLRP3) da expressão do inflamassoma (DENG et al., 2015).

Em estudo desenvolvido por La Rocca et al. (2016), foi possível observar a atividade antinociceptiva do geraniol em camundongos, usando modelos comportamentais e eletrofisiológicos, onde o geraniol nas doses de 12,5, 25 ou 50 mg / kg i.p. e 50 ou 200 mg / kg p.o.) reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Além disso, Yan et al., (2017), avaliaram a ação do geraniol sobre a dor neuropática, em um experimento no qual foi induzido em ratos uma lesão na medula

espinhal, sendo posteriormente tratados com o geraniol nas doses de 100 e 200mg/kg. A partir desse estudo, observou-se que uma significativa recuperação da função neuronal, foi promovida por esse monoterpene, ainda com melhoria da função locomotora, a partir da regulação negativa de receptores N- metil-D-aspartato (NMDA), tendo ação dose-dependente. O geraniol também apresentou efeito anti-inflamatório em um estudo realizado por Su et al. (2010), pois foi capaz suprimir a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina (PGE) de forma dose dependente, concomitante à redução dos níveis de RNAm da proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A relação molecular entre o geraniol e outros óleos monoterpênicos essenciais com propriedade analgésica também foi investigada, e foi observado que do ponto de vista químico, o substituinte químico monoterpênico linear parece conferir a propriedade analgésica desses óleos essenciais (BJØRKLUND; CHIRUMBOLO, 2016).

Nesse contexto, com destaque para as atividades antinociceptivas desse monoterpene, em um estudo desenvolvido por Costa et al. (2020) no Laboratório de Psicofarmacologia do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), o qual através da utilização de modelos de indução de nocicepção orofacial, onde injeções de substâncias como glutamato, capsaicina e formalina foram administradas no lábio superior de camundongos, revelou a capacidade que este óleo essencial possui de reverter a nocicepção orofacial. Os resultados desse estudo apontaram que este óleo, nas doses de 25 mg/kg e 50mg/kg, no teste do glutamato e da capsaicina apresentou atividade antinociceptiva significativa com poder > 80%. Já no teste da formalina o estudo apresentou a concentração de 50mg/kg de geraniol com melhor desempenho na redução da nocicepção orofacial e poder também superior a 80%. Costa et al. (2020) também realizaram estudos de ancoragem molecular, onde observaram elevados valores de ligação entre o óleo e os receptores de glutamato (mGluR6; NMDA e AMPA), opioide mü (μ), opioide kappa (κ), opioide delta (δ) e receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1).

A partir da análise dos dados do referido estudo, pode-se inferir que a ligação do geraniol a esses receptores poderia culminar em um possível sinergismo de ação quanto a associação dessa substância isolada ao analgésico opióide codeína. Portanto, diante da necessidade de novas abordagens terapêuticas que apresentem maior eficácia e menos efeitos indesejáveis, um melhor entendimento sobre a contribuição dessa associação se faz necessário. Visto que um expressivo potencial terapêutico foi demonstrado e um

provável efeito sinérgico dessa associação, poderia ocasionar em reduções significativas nas doses do opioide resultando em menos efeitos colaterais.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína na região orofacial em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antinociceptivo do geraniol associado à codeína no modelo animal de teste com formalina;
- Investigar o efeito antinociceptivo do geraniol associado à codeína no modelo animal de teste com capsaicina;
- Estudar o efeito antinociceptivo do geraniol associado à codeína no modelo animal de teste com glutamato;
- Analisar a possível atividade depressora do SNC frente a associação do geraniol com à codeína no modelo animal.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1 Local da Pesquisa

As atividades referentes ao presente estudo foram realizadas no Laboratório de Psicofarmacologia do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e todos os animais utilizados foram provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Substâncias utilizadas

- Capsaicina (Sigma – EUA)
- Cloreto de sódio (Merck – E. U. A.);
- Cloridrato de Diazepam (Merck – E. U. A.);
- Codeína fosfato;
- Etanol (LTF / UFPB – Brasil);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- Geraniol (Sigma – E.U.A);
- Glutamato (Sigma – EUA);
- Tween 80 (Vetec – Brasil).

4.3 Animais

Os animais utilizados para a pesquisa farmacológica foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, albinos, suíços, com idade entre 60 a 90 dias, pesando uma média de 28 a 35 gramas. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais tiveram livre acesso a alimentação (ração tipo pellets) e água. A execução do presente estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais da UFPB, sob a certidão de nº 3513111119 (Anexo 1).

4.4 Aparelhagem

4.4.1 Câmaras de observação para o teste da Formalina, Glutamato e Capsaicina.

A câmara de observação (IPeFARM/UFPB) possui formato triangular em ângulo de 60°, com os lados e altura medindo 25 cm cada. Para facilitar a observação e proporcionar um maior campo de visão, a câmara contém duas paredes formadas por espelho e uma de vidro transparente.

4.4.2 Aparelho do rota-rod

O aparelho do rota-rod utilizado foi o EFF 412 – Rota-Rod para camundongos - Insight. Esse modelo possui uma barra giratória não escorregadia, com 45 cm de altura, 54 cm de largura e 35 cm de comprimento, dividida em quatro compartimentos iguais, separados por cinco discos plásticos, com velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.).

5. MÉTODOS

5.2 Condições Experimentais

Os animais foram levados à sala de experimentação, no mínimo 12 horas antes da realização dos testes. Estes animais foram divididos em grupos de quatro por gaiola, com a finalidade de diminuir possíveis estresses comportamentais relacionados a adaptação de um novo ambiente.

Todas as superfícies de bancadas e os aparelhos utilizados foram previamente higienizados com álcool 70%. Durante os testes de observação e da barra giratória (rota-rod), foi utilizado álcool com baixa graduação (10%), a fim de evitar interferências comportamentais advindas de possíveis odores.

5.3 Desenho do Estudo e Cálculo amostral

O presente estudo trata-se de uma investigação experimental, a qual utiliza um modelo animal de roedores, sendo qualificado como ensaio controlado, não-clínico e triplo-cego.

O cálculo amostral desenvolvido para estudo foi realizado com diferença de proporções, usando a magnitude de efeito h de Cohen. O tamanho amostral (5 animais por grupo) foi calculado para atender um poder estatístico mínimo de 80 % ($1 - \beta$), com tamanho de efeito (g de Hedge) de 2,12 e nível confiança de 95% (erro alfa unicaudal = 5%) (COHEN, 1988). Considerando as perdas em 20%, os grupos foram compostos com 6 animais. Foi testada a hipótese que havia diferença de proporções entre os dois grupos em análise. A magnitude do efeito (g de Hedge) utilizada para a realização do cálculo amostral foi definida a partir de resultados Costa et al. (2020).

O tamanho da amostra foi estimado usando 3 grupos ($n=36$), cada grupo subdividido em 6 subgrupos de 6 animais que receberam diferentes doses de substâncias veículo e testes.

Quadro 1: Distribuição dos grupos experimentais.

N	Substância	Dose
6	Geraniol	50mg/kg
6	Geraniol + Codeína	50mg/kg + 30mg/kg
6	Geraniol + Codeína	50mg/kg + 15mg/kg
6	Geraniol + Codeína	50mg/kg + 7,5mg/kg
6	Codeína	30 mg/kg
6	Controle	Água salina + Tween 80 0.2%

5.4 Preparação das substâncias para os testes

A preparação do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína foi realizada horas antes dos testes de nocicepção, sendo dissolvido em água destilada, e, quando necessário, adicionou-se uma gota de Tween 80, com intuito de facilitar a solubilização. A droga de referência utilizada foi o fosfato de codeína e as substâncias indutoras da nocicepção foram a formalina, glutamato e capsaicina. No teste da barra giratória, a preparação da associação seguiu a mesma descrita anteriormente, e a droga referência utilizada na execução desse experimento foi o diazepam 4mg. Todas as doses utilizadas foram calculadas de forma a possibilitar injeção na concentração de 0,1 mL/10g de peso do camundongo.

5.5 Avaliação da atividade antinociceptiva orofacial

Para esse estudo, a escolha dos modelos de avaliação da atividade nociceptiva e antinociceptiva baseou-se nos aspectos neuroanatômicos da região da face, levando em consideração a responsabilidade do nervo craniano V, trigêmeo, por captar, conduzir e processar os estímulos sensitivos e de nocicepção que a ele chegam.

Portanto, a atividade nociceptiva orofacial em camundongos foi avaliada com base no tratamento prévio com geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína em diferentes concentrações (substância-teste), geraniol isolado (substância-teste), fosfato de codeína (substância-padrão), ou veículo trinta minutos antes da aplicação das substâncias responsáveis pela indução de nocicepção. As substâncias indutoras de nocicepção foram administradas na região orofacial do roedor (região perinasal). Posteriormente a aplicação dos testes, cada animal foi observado de forma individual, em câmaras espelhadas. Foram contabilizados em segundos o tempo em que o animal permaneceu friccionando a área injetada com as patas traseiras ou dianteiras,

esse comportamento é conhecido como “*face-rubbing*” (figura 3), em seguida todos os dados foram analisados estatisticamente.



Figura 3: – Comportamento de *face-rubbing* em roedores com as patas dianteiras e traseiras. Fonte: ROMERO-REYES et al., 2013

Para cada teste a preparação, aplicação e análise comportamental foram conduzidas pela metodologia de triplo cegamento, onde o pesquisador A ficou responsável pela codificação dos animais e preparação dos materiais que foram utilizados; o pesquisador B que aplicou as doses, realizou a administração cego as substâncias; O pesquisador C responsável pela observação, também se encontrava cego referente a quais tratamentos os animais haviam recebido, assim como o pesquisador estatístico D. Por fim, o pesquisador A fez a recodificação dos dados analisados pelo pesquisador D.

5.5.1 Teste da Formalina

A injeção na região perinasal do roedor é justificada pela particularidade da inervação sensitiva da região facial, que é feita pelo V par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo. As fibras nervosas trigeminais captam estímulos sensitivos de tato, pressão, temperatura e nocicepção (CHICHORRO et al., 2017; MERRILL, 2007; LAVIGNE; SESSLE, 2016). Com isso, a formalina foi aplicada na porção lateral do lábio superior do camundongo (região perinasal), 0,5 h após o tratamento, utilizando uma agulha com calibre 27 com volume de 20µL de uma solução de formalina a 20% (formaldeído, em água destilada). Após a aplicação, os camundongos foram observados pelos 40 minutos seguintes (fases neurogênica e inflamatória) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

5.5.2 Teste do Glutamato

Devido o glutamato possuir um importante papel no processo de transmissão da dor, este teste foi descrito inicialmente por Beirith et al. (2002), com isso a nocicepção induzida por glutamato foi adaptada para a região orofacial. O teste consistiu na utilização de 20µL de glutamato (25µmol/L Sigma Aldrich, Missouri, EUA) em injeção subcutânea que foi administrada na porção lateral do lábio superior do camundongo com uma agulha de calibre 27, 0,5 h após o tratamento. Em seguida, os animais foram observados pelos 15 minutos posteriores à aplicação de Glutamato (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

5.5.3 Teste da Capsaicina

Descrito inicialmente por Pelissier et al. (2002) e adaptado por Quintans-Júnior et al. (2010), este modelo mimetiza a dor aguda após estímulo lesivo e é útil no estudo dos mecanismos desencadeados pela nocicepção trigeminal. Este modelo adaptado consisti na administração de 20 µl de uma solução de 2,5 µg de capsaicina (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) no lábio superior direito dos camundongos, 0,5 h após o tratamento. O comportamento nociceptivo foi observado por 20 minutos (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

5.6 Avaliação geral sobre o SNC : Teste do rota-rod

O teste do rota-rod ou barra giratória, que inicialmente foi apresentado por Dunham e Miya (1957) é adequado para detecção de possíveis efeitos de relaxamento muscular ou falta de coordenação motora que seja produzido em decorrência a administrações de agentes farmacológicos, tais como relaxantes musculares esqueléticos ou depressores do SNC, como os ansiolíticos (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANÇA, 2006). Neste teste, camundongos são colocados sobre uma barra que gira a uma velocidade constante, com isso é possível analisar a capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma (MATTEI; FRANÇA, 2006).

Um dia antes do teste, uma pré-seleção dos animais (sem administração de substâncias) foi realizada, levando em consideração o tempo de permanência dos animais na barra giratória (7 r.p.m.) durante 3 minutos em pelo menos uma das 3 tentativas (MENDES; MATTEI; CARLINI, 2002; DE SOUSA et al., 2007b). No dia do teste, a amostra foi dividida em sete grupos de seis animais cada, e inicialmente, foi realizada uma leitura basal. Posteriormente, os animais foram tratados nas doses de codeína (30

mg/kg; i.p.), geraniol (50 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50/30 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50/15 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50/7,5 mg/kg, i.p.), diazepam (4 mg/kg; i.p.) e o grupo controle recebeu soro fisiológico (0,9% de cloreto de sódio). Após 30 minutos da administração, os animais foram colocados no aparelho. Este procedimento foi repetido com 60 e 120 minutos após as administrações das substâncias.

5.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA, seguido do Teste de Dunnett. Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism versão 7.0. Os valores obtidos, foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DP), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05$.

VI CAPÍTULO

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico Brazilian Oral Research.

Title of manuscript: Orofacial antinociceptive activity of geraniol (trans-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol) 1 associated with codeine in mice: a controlled, triple-blind study

Authors' full names without degrees:

Ana Paula Lopes Nunes¹, Ricardo Dias de Castro^{*1}.

¹Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

Funding: This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES).

Conflict of interest: No interest conflicts.

Abstract: The prospect of obtaining new alternatives for the pharmacological therapy of orofacial pain drives the investigation of products of natural origin with antinociceptive action associated with an opioid analgesic. Thus, the aim of this study was to investigate the activity of geraniol associated with codeine in the modulation of orofacial nociception, and possible depressant effect at the CNS level. This study is characterized as non-clinical, controlled and triple-blind. An experimental model of nociception in mice was adopted: formalin test,....For each test performed, six animals per group were treated, 30 minutes before the beginning of the experiment, by the intraperitoneal route (ip), according to the following experimental groups: a) geraniol 50 mg/kg + codeine 30 mg/kg; b) geraniol 50 mg/kg + codeine 15 mg/kg; c) geraniol 50 mg/kg + codeine 7.5 mg/kg; d) geraniol 50mg/kg; e) codeine 30 mg/kg (positive control); f) 0.9% sodium chloride (negative control). The analysis of the nociceptive behavior of the animals was performed after the injection of glutamate (20 µl, 25µM), capsaicin (20µl, 2.5µg) and formalin (20µl, 20%) in the right upper lip (paranasal) region of the animal. As a behavioral parameter, the time in seconds of friction of the referred region by the hind or front paws was considered. The results showed that in the glutamate test, geraniol and codeine in concentrations of 50 mg/kg and 30 mg/kg presented a reduction of 54.2% in the friction time, this same dose inhibited in 66.7% the nociception in the test of capsaicin ($p<0.005$). In the formalin test, the association at the same dose was able to reduce nociception by 86% ($p<0.005$). In order to investigate a possible myorelaxant and neurotoxic activity that could interfere with the results, the rota-rod test was also performed, where no such effects were observed. Therefore, from these experimental data, it can be suggested that there is a possible synergism of geraniol associated with codeine in orofacial antinociceptive activity.

Keywords: geraniol, monoterpenes, orofacial pain, essential oils, natural products.

Word count: 5229 (Without references)

Total count: 7147 (With abstract and references)

Total number of figures: 5

Number of references: 59

Introdução

A dor orofacial é entendida como um quadro doloroso que se apresenta em tecidos moles e mineralizados (ossos, pele, dentes, vasos sanguíneos, músculos ou glândulas) da face e da cavidade oral, afetando diretamente o bem estar social, sendo de difícil avaliação e manejo terapêutico (DALEWSKI et al., 2019; THOMAS, 2003). Estudos epidemiológicos internacionais sugerem que além da dor orofacial ter uma maior propensão a mulheres, ela ainda acomete cerca de 10% da população adulta (SHETTY et al., 2015). Existem muitos fatores que colaboram para o desencadeamento da dor orofacial entre eles podemos elencar as patologias neurogênicas, odontogênicas, cefaleias, dores musculoesqueléticas, câncer, infecções, dores psicogênicas, trauma tecidual e alterações autoimunes (LEEuw, 2010). Além das citadas, de acordo com Manfredini et al. (2011), a causa mais notável para o desenvolvimento da dor não dentária na região orofacial, são as disfunções temporomandibulares (DTMs).

As extensões cerebrais são conhecidas como nervos cranianos, que inervam diversas regiões inclusive as que estão envolvidas direta e indiretamente com o V par do nervo craniano: trigêmeo (CHICHORRO et al., 2017). O nervo trigêmeo é o maior nervo craniano, fornecendo inervações sensoriais a maior parte da face e da cabeça. Ele apresenta três divisões periféricas: oftálmica, maxilar e mandibular, e é o principal envolvido nas DTMs e enxaqueca (JORQUERA MOYA et al., 2019). Suas fibras nervosas são constituídas por receptores pouco específicos, sendo elas classificadas de acordo com estímulos responsáveis por sua ativação. As fibras A β respondem a estímulos que podem ser táteis ou proprioceptivos. Já as fibras A δ e C, conhecidas como neurônios nociceptivos, são ativadas por estímulos térmicos e outros estímulos nocivos (MERRILL, 2007; LAVIGNE; SESSLE, 2016). As fibras C não mielinizadas e as fibras A δ mielinizadas, possuem capacidades e velocidades diferentes para transmissão de estímulos dolorosos. Esses neurônios nociceptivos conseguem traduzir um estímulo agressivo de natureza mecânica, química ou térmica em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (ROCHA et al., 2007).

Atualmente, o tratamento da dor consiste na prescrição de analgésicos e/ou anti-inflamatórios. Contudo, existe uma lacuna no que diz respeito ao número de fármacos disponíveis para esta finalidade. Além desse número limitado, essas drogas geram muitos efeitos adversos, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (SILVA et al., 2013),

limitando com isso, a continuação do tratamento e levando, muitas vezes, à frustrações nos pacientes (RANG et al., 2012; BALASUBRAMANIAM; KLASSER, 2014; SHEPHARD et al., 2014). Isso demonstra que é necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de cuidados (SHEPHARD et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2015).

Assim, devido a problemática de não existir um tratamento ideal para as dores do complexo orofacial, tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos recursos terapêuticos e de investigar medidas alternativas para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais surgem como uma ótima alternativa para o manejo de doenças dolorosas/inflamatórias, principalmente no que concerne a eficácia destes. Atualmente muitas dessas substâncias com potencial terapêutico já são comercializados pela indústria farmacêutica (KATZ; BALTZ, 2016), e uma fração ainda maior são avaliados em estudos não-clínicos (SEM; SAMANTA, 2015; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017).

Dentre eles, os geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) é um álcool monoterpreno acíclico, encontrado em mais de 160 óleos essenciais de plantas aromáticas (BURDOCK GA, 2010). Várias atividades farmacológicas para o geraniol foram caracterizadas na literatura, dentre elas podemos destacar o fato dele ser antioxidante e citoprotetor (TIWARI; KAKKAR, 2009) antiinflamatório (SU et al., 2010), exercer atividade protetora para a mucosa gástrica e duodenal (CARVALHO et al., 2014). O geraniol também atua como um quimio preventivo no cólon (CARNESECCHI et al., 2001; CARNESECCHI et al., 2002), no pâncreas (BURKE et al., 1997) e câncer renal (AHMADA et al., 2011) e tem ação antitumoral *in vivo* contra leucemia murina, carcinoma hepatocelular e melanoma (TATMAN; MO, 2002; POLO; BRAVO, 2006; POLO et al., 2011). Além disso, estudos desenvolvidos por Costa et al. (2020) demonstraram o potencial terapêutico desse óleo frente a nocicepção orofacial, onde através de administrações de substâncias indutoras de dor no lábio superior de camundongo, foi possível observar que o geraniol reverteu a nocicepção orofacial nas concentrações de 25 mg/kg e 50mg/kg com poder superior a 80%. Esse estudo também revelou, através de pesquisas de ancoragem molecular *in silico*, elevados valores de ligação entre o óleo e os receptores de glutamato (mGlu6; NMDA e AMPA), opioide mü (μ), opioide kappa (κ), opioide delta (δ) e receptor de potencial transitório vaniloide um (TRPV1).

A partir da análise dos dados do referido estudo, pode-se inferir que a ligação do geraniol a esses receptores poderia culminar em um possível sinergismo de ação quanto a associação dessa substância isolada ao opióide codeína. Portanto, diante da necessidade de novas abordagens terapêuticas que apresentem maior eficácia e menos efeitos indesejáveis, um melhor entendimento sobre a contribuição dessa associação se faz necessário. Visto que um expressivo potencial terapêutico foi demonstrado e um provável efeito sinérgico dessa associação, poderia ocasionar em reduções significativas nas doses do opioide resultando em menos efeitos colaterais.

Material e Métodos

Animais experimentais

O presente estudo trata-se de uma investigação experimental, a qual utiliza um modelo animal de roedores, sendo qualificado como ensaio controlado, não-clínico e triplo-cego. As atividades referentes ao presente estudo foram realizadas utilizando camundongos adultos saudáveis, machos albinos suíços (*Mus musculus*), pesando entre 28 a 35 gramas, que foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. Todos os animais eram provenientes do *Biotério* Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil).

A pesquisa foi conduzida de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e de Ensino do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal e as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba sob o protocolo nº. 3513111119/2021. Um número reduzido de animais foi considerado para os experimentos, e todas as medidas destinadas a controlar seu sofrimento ou estresse após a experimentação foram realizadas de acordo com as Diretrizes Éticas para Pesquisa Animal (ZIMMERMANN 1983).

O cálculo amostral desenvolvido para estudo foi realizado com diferença de proporções, usando a magnitude de efeito h de Cohen. O tamanho amostral (5 animais por grupo) foi calculado para atender um poder estatístico mínimo de 80 % ($1 - \beta$), com tamanho de efeito (g de Hedge) de 2,12 e nível confiança de 95% (erro alfa unicaudal = 5%). (COHEN, 1988). Considerando as perdas em 20%, cada concentração da substância ficou com um total de 6 animais. Foi testada a hipótese que havia diferença de proporções

entre os dois grupos em análise. A magnitude do efeito (g de Hedge) utilizada para a realização do cálculo amostral foi definida a partir de resultados prévios de Costa et al. (2020).

Testes de indução da nocicepção orofacial

Para avaliação da atividade antinociceptiva orofacial da associação geraniol e codeína, foram realizados três testes em roedores: (i) nocicepção induzida por formalina, (ii) nocicepção induzida por glutamato e (iii) nocicepção induzida por capsaicina. Cada teste foi realizado em três grupos distintos, cada grupo contendo um total de 36 animais ($n = 36$), divididos em 6 subgrupos de 6 animais cada. Os animais foram pré-tratados com codeína (30 mg / kg; i.p.), geraniol (50 mg / kg, i.p.), geraniol e codeína (50 / 30 mg / kg, i.p.), geraniol e codeína (50 / 15 mg / kg, i.p.) e geraniol e codeína (50 / 7,5 mg / kg, i.p.) e soro fisiológico (0,9% cloreto de sódio) com subsequente indução de dor orofacial. As doses de teste de geraniol foram definidas com base em sua atividade para dor orofacial (COSTA, et al. 2020). Todas as substâncias de teste foram adquiridas na Sigma Aldrich, Missouri, EUA. A preparação, aplicação e análise comportamental para cada teste foi regida pela metodologia de triplo cegamento, onde o pesquisador A ficou responsável pela codificação dos animais e preparação dos materiais que foram utilizados; o pesquisador B que aplicou as doses, realizou a administração cego as substâncias; O pesquisador C responsável pela observação, também se encontrava cego referente a quais tratamentos os animais haviam recebido, assim como o pesquisador estatístico D. Por fim, o pesquisador A fez a recodificação dos dados analisados pelo pesquisador D.

Testes de nocicepção orofacial induzida por formalina, capsaicina e glutamato.

A injeção na região perinasal do roedor é justificada pela particularidade da inervação sensitiva da região facial, que é feita pelo V par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo. As fibras nervosas trigeminais captam estímulos sensitivos de tato, pressão, temperatura e nocicepção (CHICHORRO et al., 2017; MERRILL, 2007; LAVIGNE; SESSLE, 2016). Com isso, a formalina foi aplicada na porção lateral do lábio superior do camundongo (região perinasal), 0,5 h após o tratamento, utilizando uma agulha com calibre 27 com volume de 20µL de uma solução de formalina a 20% (formaldeído, em água destilada). Após a aplicação, os camundongos foram observados pelos 40 minutos seguintes (fases neurogênica e inflamatória) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

Devido o glutamato possuir um importante papel no processo de transmissão da dor, este teste foi descrito inicialmente por Beirith (2002), com isso a nocicepção induzida por glutamato foi adaptada para a região orofacial. O teste consistiu na utilização de 20µL de glutamato (25µmol/L Sigma Aldrich, Missouri, EUA) em injeção subcutânea que foi administrada na porção lateral do lábio superior do camundongo com uma agulha de calibre 27, 0,5 h após o tratamento. Em seguida, os animais foram observados pelos 15 minutos posteriores à aplicação de Glutamato (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010).

Descrito inicialmente por Pelissier *et al.* (2002) e adaptado por Quintans-Júnior *et al.* (2010), este modelo mimetiza a dor aguda após estímulo lesivo e é útil no estudo dos mecanismos desencadeados pela nocicepção trigeminal. Este modelo adaptado consisti na administração de 20 µl de uma solução de 2,5 µg de capsaicina (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) no lábio superior direito dos camundongos, 0,5 h após o tratamento. O comportamento nociceptivo foi observado por 20 minutos (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010).

Avaliação geral sobre o SNC - Teste do rota-rod

O teste do rota-rod ou barra giratória, que inicialmente foi apresentado por Dunham e Miya (1957), é adequado para detecção de possíveis efeitos de relaxamento muscular ou falta de coordenação motora que seja produzido em decorrência a administrações de agentes farmacológicos, tais como relaxantes musculares esqueléticos ou depressores do SNC, como os ansiolíticos (CARLINI; BURGOS, 1979; MATTEI; FRANÇA, 2006). Neste teste, camundongos são colocados sobre uma barra que gira a uma velocidade constante, com isso é possível analisar a capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma (MATTEI; FRANÇA, 2006).

Um dia antes do teste, uma pré-seleção dos animais (sem administração de substâncias) foi realizada, levando em consideração o tempo de permanência dos animais na barra giratória (7 r.p.m.) durante 3 minutos em pelo menos uma das 3 tentativas (MENDES; MATTEI; CARLINI, 2002; DE SOUSA *et al.*, 2007b). No dia do teste, a amostra foi dividida em sete grupos de seis animais cada, e inicialmente, foi realizada uma leitura basal. Posteriormente, os animais foram tratados nas doses de codeína (30 mg/kg; i.p.), geraniol (50 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50 / 30 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50/15 mg/kg, i.p.), geraniol e codeína (50 /7,5 mg/kg, i.p.), diazepam (4 mg/kg; i.p.) e o grupo controle recebeu soro fisiológico (0,9% de cloreto de sódio). Após

30 minutos da administração, os animais foram colocados no aparelho. Este procedimento foi repetido com 60 e 120 minutos após a administração.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA, seguido do Teste de Dunnett. Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism versão 7.0. Os valores obtidos, foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DP), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05$.

Resultados

Teste Formalina

A administração de geraniol 50 mg/kg associado a codeína de 30 mg/kg levou a uma diminuição significativa do comportamento nociceptivo orofacial ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo no teste da formalina nas fases neurogênica e inflamatória. Os resultados mostrados na Figura 1 evidenciam uma redução significativa no tempo de *face rubbing* tanto nos animais tratados com o geraniol isolado como também nos animais tratados com a associação de geraniol com codeína nas doses de geraniol 50 mg/kg (média $\pm$ DP: $12,5 \pm 2,2$), geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg (média $\pm$ DP: $7,6 \pm 1,7$), geraniol 50 mg/kg + codeína de 15 mg/kg (média $\pm$ DP: $11,25 \pm 2,4$) e geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg (média $\pm$ DP: $15,6 \pm 3,8$), apresentando os seguintes valores de inibição 77%, 86%, 79% e 71,9% respectivamente, em relação ao grupo controle (média $\pm$ DP: $55,5 \pm 4,47$). A codeína (30 mg/kg, i.p.) diminuiu o parâmetro analisado em 52% (média $\pm$ DP: $26,6 \pm 5,25$), contudo nessa fase neurogênica a associação de geraniol com codeína na dose de 50 mg/kg /30 mg/kg foi significativamente mais efetiva quando comparado ao grupo tratado apenas com o opióide na dose de 30 mg/kg.

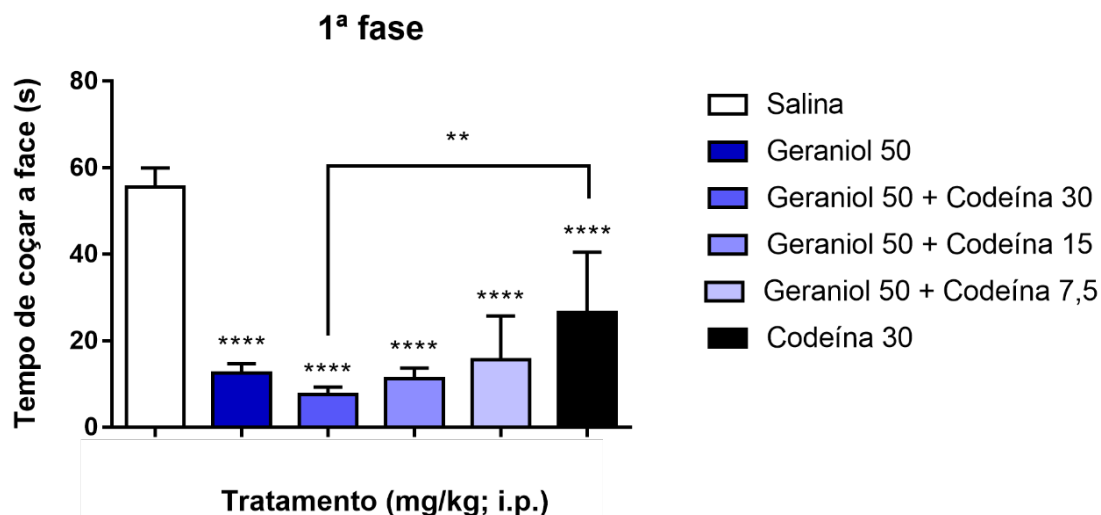


Figura 1: Efeito da associação geraniol e codeína na nocicepção orofacial induzida pela formalina (fase neurogênica). Controle (Salina) geraniol (50 mg / kg, i.p.); geraniol e codeína (50 + 30 ; 50 + 15; 50 + 7,5 mg / kg, i.p.) codeína (30 mg / kg, i.p.). Valores foram expressos em média e DP (n=6, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos, **p<0,01; ****p<0,0001 em relação ao controle negativo.

Conforme mostrado na Figura 2, o geraniol 50 mg/kg associado a codeína 30 mg/kg também reduziu o tempo de resposta na segunda fase do teste da formalina (média ± DP: 81 ± 2,8) apresentou melhor desempenho, correspondendo a uma inibição de 49,5%, quando comparado ao grupo controle (média ± DP: 160,2 ± 12,02). O grupo tratado com a droga padrão, codeína 30 mg/kg, não apresentou redução no comportamento nociceptivo 1,24% (média ± DP: 158,2 ± 17,57). Nessa fase inflamatória do teste da formalina o grupo tratado com geraniol 50 mg/kg associado a codeína 30 mg/kg apresentou uma redução significativa de *face rubbing* quando comparado ao grupo tratado apenas com a droga padrão.

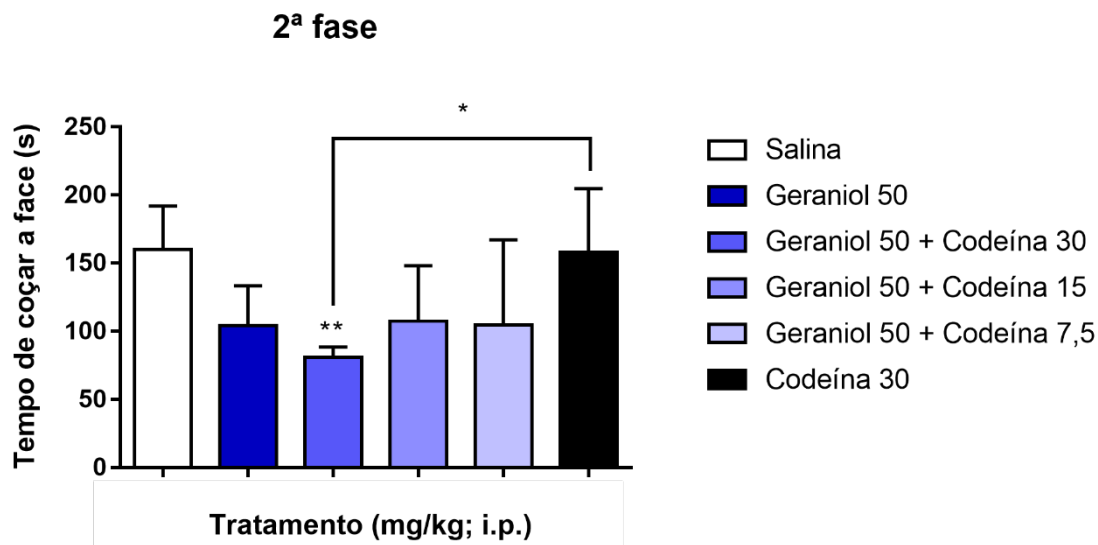


Figura 2: Efeito da associação geraniol e codeína na nocicepção orofacial induzida pela formalina (fase inflamatória). Controle (Salina) geraniol (50 mg / kg, i.p.); geraniol e codeína (50 + 30 ; 50 + 15; 50 + 7,5 mg / kg, i.p.) codeína (30 mg / kg, i.p.). Valores foram expressos em média e DP (n=6, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos, *p<0,05; **p=0,0026 em relação ao controle negativo.

Teste Glutamato

De acordo com o apresentado na Figura 3 tanto o geraniol isolado como também associado a codeína foram capazes de diminuir o número de *face rubbing* induzidos por glutamato em camundongos nas seguintes doses geraniol 50 mg/kg (média ± DP: 40,67 ± 4), geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg (média ± DP: 37,83 ± 4,4), geraniol 50 mg/kg + codeína 15 mg/kg (média ± DP: 55,67 ± 5,2) e geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg (média ± DP: 42 ± 2,2) mg/kg, representadas, respectivamente, pelas seguintes porcentagens de inibição, quais sejam, 50,80%, 54,23%, 32,65% e 49,19%, quando comparado ao grupo controle (média ± DP: 82,67 ± 6,6). Como esperado, a codeína (30 mg/kg, i.p.) também produziu inibição, que foi de 43,20% (média ± DP: 46,95 ± 6,5). Contudo as doses mais efetivas perante o grupo controle foram o geraniol 50 mg/kg, geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg e geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg.

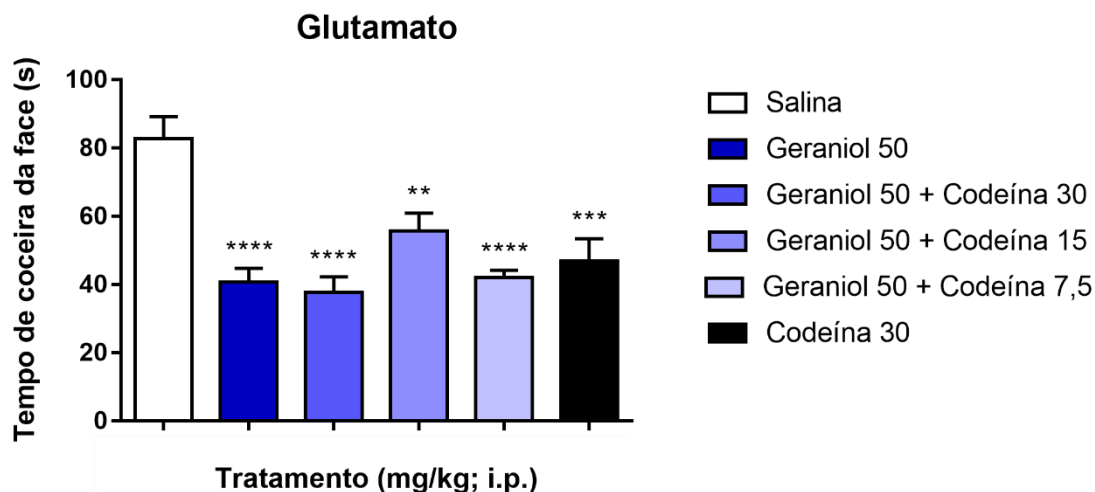


Figura 3: Efeito da associação geraniol e codeína na nocicepção orofacial induzida pelo glutamato. Controle (Salina) geraniol (50 mg / kg, i.p.); geraniol e codeína (50 + 30 ; 50 + 15; 50 + 7,5 mg / kg, i.p.) codeína (30 mg / kg, i.p.). Valores foram expressos em média e DP (n=6, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos, **p= 0,0021; ***p<0,001; ****p<0001 em relação controle negativo.

Teste Capsaicina

Os resultados mostrados na Figura 4 evidenciam uma redução significativa no tempo de *face rubbing* dos animais tratados tanto com a associação nas seguintes doses geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg (média ± DP: 49,17 ± 13), geraniol 50 mg/kg + codeína 15 mg/kg (média ± DP: 74,33 ± 14,44), geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg (média ± DP: 86,5 ± 7,9) como também os que receberam a dose contendo apenas o geraniol de 50 mg/kg (média ± DP: 71,8 ± 10,3), apresentando respectivamente os seguintes valores de inibição de 66,7%, 49,67%, 41,43% e 51,36% em relação ao grupo controle (média ± DP: 147,7 ± 12,2). A codeína (30mg/kg, i.p.) diminuiu o parâmetro analisado em 63,89% (média ± DP: 53,3,8 ± 6,4), porém os grupos tratados com geraniol 50 mg/kg, geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg, geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5, mg/kg apresentaram uma inibição mais expressiva frente aos outros grupos.

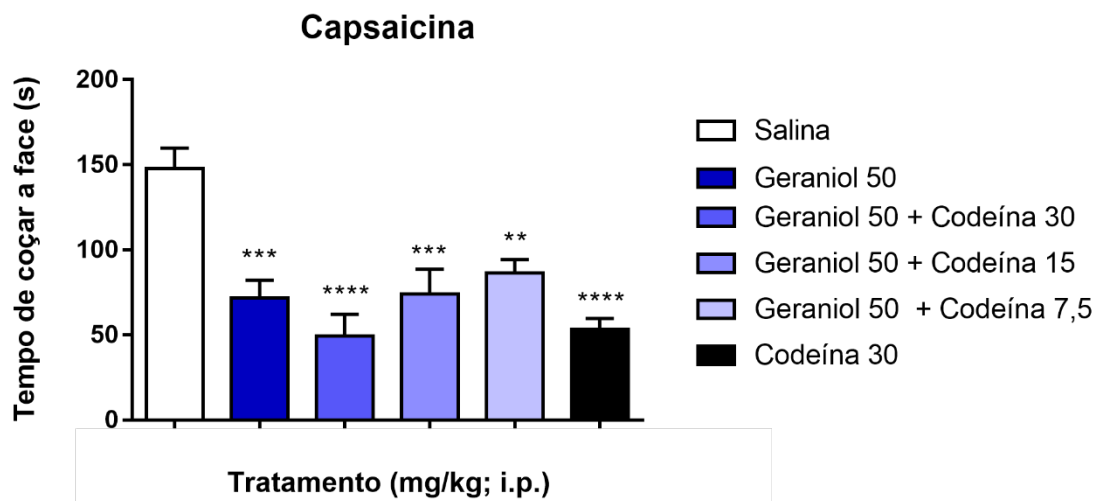


Figura 4: Efeito da associação geraniol e codeína na nocicepção orofacial induzida pela capsaicina. Controle (Salina) geraniol (50 mg / kg, i.p.); geraniol e codeína (50 + 30 ; 50 + 15; 50 + 7,5 mg / kg, i.p.) codeína (30 mg / kg, i.p.). Valores foram expressos em média e DP (n=6, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos, **p= 0,001; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle negativo.

Teste do Rota-Rod

Neste teste, não houve nenhuma alteração significativa na coordenação motora dos animais tratados nas doses de geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg, geraniol 50 mg/kg + codeína 15 mg/kg, geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg como também os que receberam a dose contendo apenas o geraniol de 50mg/kg, nos tempos de 30 minutos e 120 minutos, como mostra a Figura 5. Após 30 minutos de tratamento, o tempo de permanência na barra giratória foi de $176,1 \pm 1,7$ (média $\pm$ DP), $174 \pm 3,5$ (média $\pm$ DP), $173,8 \pm 1,9$ (média $\pm$ DP), $175,8 \pm 2,6$ (média $\pm$ DP) segundos, respectivamente, enquanto o controle permaneceu por $178,9 \pm 0,71$ (média $\pm$ DP) segundos. No tempo de 120 minutos os resultados foram semelhantes, $180,0 \pm 0,0$ (média $\pm$ DP), $172 \pm 3,8$ (média $\pm$ DP), $172,1 \pm 2,6$ (média $\pm$ DP), $173,1 \pm 2,9$ (média $\pm$ DP), segundos, respectivamente, com o tempo do controle sendo $172 \pm 4,7$ (média $\pm$ DP) segundos. Já no tempo de 60 minutos a única dose que não demonstrou resultados semelhantes foi a de geraniol 50 mg/kg + codeína 30 mg/kg (média $\pm$ DP: $168 \pm 2,4$). Contudo, no tempo de 60 minutos os demais grupos tratados com geraniol 50 mg/kg (média $\pm$ DP: $178 \pm 1,19$), geraniol 50 mg/kg + codeína 15 mg/kg (média $\pm$ DP: $174,3 \pm 2,12$), geraniol 50 mg/kg + codeína 7,5 mg/kg (média $\pm$ DP: $175,1 \pm 2,19$), demonstraram que não houve alteração significativa na coordenação motora dos animais em relação ao grupo controle (média $\pm$ DP: $180 \pm 0,0$).

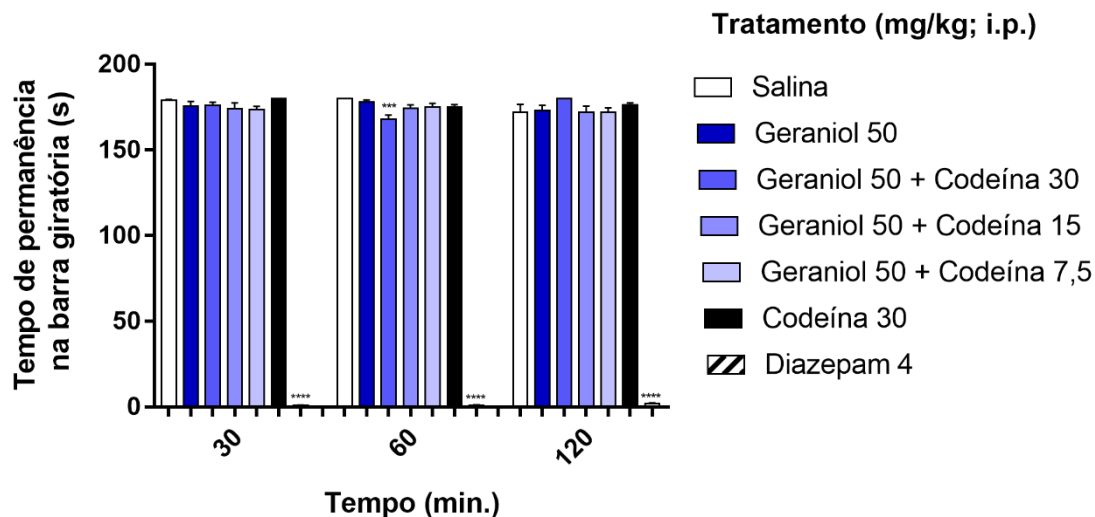


Figura 5: Efeito da associação geraniol e codeína na função psicomotora avaliada no teste do Rota-Rod. Controle (Salina) geraniol (50 mg / kg, i.p.); geraniol e codeína (50 + 30 ; 50 + 15; 50 + 7,5 mg / kg, i.p.) codeína (30 mg / kg, i.p.); diazepam (4 mg / kg, i.p.). Valores foram expressos em média e DP (n=6, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos, ***p<0,001, ****p<0,0001 em relação ao controle negativo.

Discussão

A região orofacial é amplamente vascularizada, innervada, com destaque para a presença das fibras A-delta e C, responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos ao nervo trigêmeo. Nessa região ocorrem dores agudas com mais frequência (RABOISSON; DALLEL, 2004). Dessa forma, é possível notar que a exposição a substâncias nociceptivas (capsaicina, formalina e glutamato) na região orofacial, com a finalidade de dar suporte a estudos nociceptivos e também uma busca latente por novas drogas, se torna uma importante estratégia farmacológica investigativa. A dose de geraniol para o presente estudo foi de 50 mg / kg, devido ter apresentado melhor desempenho em testes nociceptivos na região orofacial (COSTA et al., 2020).

O teste da formalina é um método válido e confiável para avaliação do processamento e modulação nociceptiva orofacial (LUCCARINI et al., 2006). Devido a formalina ser um agente químico que estimula as fibras nociceptivas de forma direta e indireta, evocando a resposta nociceptiva (LUCCARINI et al., 2006, CAPUANO et al., 2009), após sua aplicação na região orofacial, ela induz a excitação os neurônios nociceptivos do núcleo trigeminal espinhal. Esta indução mimetiza a dor aguda em humanos após dano tecidual (DALLEL et al., 1995). Esse teste é dividido em duas fases: a primeira fase ou neurogênica, com duração de 0 a 5 minutos, e a segunda fase também conhecida como inflamatória, com duração de 15 a 40 minutos. Na primeira ocorre ativação direta dos nociceptores de fibras aferentes do tipo C, ou seja, uma sensação

dolorosa mediada pelo SNC com liberação de substância P e outros neuropeptídeos (RABOISSON; DALLEL, 2004; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Na segunda fase observa-se a interação entre os sistemas nervosos central e periférico. Ocorre a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e peptídeos (QUITANS-JÚNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Desse modo, foi possível observar que a administração do geraniol associado a codeína promoveu uma diminuição da atividade nociceptiva orofacial nos animais. Na primeira fase do experimento todos os animais tratados sofreram uma redução evidenciada no tempo de coçar quando comparados ao controle. Nessa fase os animais tratados com a associação de geraniol 50 mg/kg e codeína 30 mg/kg apresentaram redução no tempo de *face rubbing* superior aos animais tratados apenas com a droga padrão, indicando uma possível ação sinérgica. Sobretudo, na fase neurogênica todas as associações apresentaram valores reduzidos de nocicepção, com destaque para geraniol 50 mg/kg com codeína 7,5 mg/kg, onde é possível notar uma menor dose do opióide produzindo o efeito máximo, o que resultaria em menores probabilidades de efeitos colaterais em decorrência de opióides. Contudo, na segunda fase do experimento, apenas os animais tratados com a associação na dose de geraniol 50 mg/kg e codeína 30 mg/kg, reduziram a nocicepção, sendo importante frisar que ao compararmos o desempenho desta associação com o desempenho da codeína isolada veremos que os animais tratados apenas com a droga padrão não apresentaram diminuição de nocicepção nessa fase. Dessa forma, pode-se inferir que a associação do geraniol com codeína é vantajosa, pois amplia a possibilidade de redução de excitação neuronal provocada por diferentes vias, ao passo que esta substância isolada apresentou efeito de inibição da dor tanto a nível central como também a nível periférico.

De fato, há evidências na literatura, de estudos que destacam o efeito anti-inflamatório do geraniol (TIWARI; KAKKAR, 2009; SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013). Esse efeito anti-inflamatório do geraniol pode ser explicado pela sua participação na regulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), redução dos níveis de TNF- α (YAN et al., 2017), diminuição da produção de NO e PGE em macrófagos indicando provável inibição da iNOS e COX2 (SU et al., 2010). Outros monoterpenos também apresentaram comportamento semelhante ao do geraniol no teste da formalina, ou seja, inibindo ambas as fases como o citronelal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), a (R)-(+)-pulegona (SOUSA et al., 2011), o (-)-linalol (VENANCIO et al., 2011b), ou a α,β -epóxi-carvona (ROCHA et al., 2013).

Desta maneira, percebe-se que nos últimos anos, um grande número de estudos relacionando os monoterpenos como opção para o tratamento da dor e nocicepção vem conquistando mais espaço nas pesquisas. A razão para tal, se dá por apresentarem bons valores comerciais e qualidades farmacológicas favoráveis, agindo através de distintos mecanismos a fim de intervir no processo nociceptivo/doloroso (GUIMARÃES et al., 2012).

Foi observada também a atividade antinociceptiva da associação do geraniol com codeína no teste do glutamato. A injeção subcutânea de glutamato provoca intensa excitação dos nociceptores, levando a um quadro nociceptivo de curta duração (OUTHWAITE; TURNER, 2007). Este quadro envolve a participação de sítios periféricos, espinais e supra-espinais (BEIRITH et al., 2002). Essa ação ocorre sinergicamente com a liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas para a excitação das fibras nervosas (BERNARDINO et al., 2005).

Neste estudo foi possível observar que tanto a associação como o geraniol isolado inibiram a nocicepção orofacial nas diferentes doses, sendo que o geraniol 50 mg/kg, geraniol 50 mg/kg associado a codeína 30 mg/kg, geraniol 50 mg/kg associado a codeína 7,5 mg/kg diminuíram a nocicepção de forma mais efetiva do que a codeína, indicando que a presença do geraniol interfere na transmissão de informação nociceptiva no sistema glutamatérgico através de NMDA, cainato e alfa-amino-3-hidroximetil-5-4 - receptores do ácido isoxazolpropiónico (AMPA) (BEIRITH et al., 2002). Esses resultados corroboram com Costa et al., 2020, onde altos valores de energia e de interação química foram detectados entre o geraniol (50 mg/kg i.p.) e os receptores glutamatérgicos, nos estudos de ancoragem molecular.

La Rocca et al. (2016), também demonstraram o potencial de inibição de nocicepção do geraniol nas vias glutamatergicas, a partir de experimentos com indução de nocicepção via injeção intraplantar de glutamato, os resultados mostraram que o geraniol (50 mg/kg i.p.), causou uma diminuição no tempo de lambida da pata semelhante ao grupo padrão pré-tratado com antagonista não seletivo do receptor NMDA, a dizocilpina (MK-801), com isso esse estudo concluiu que o geraniol, de forma dose dependente, poderia exercer sua ação antinociceptiva modulando a neurotransmissão glutamatérgica. Também foi demonstrado que a ativação desses receptores aumenta o influxo de íon Ca^{2+} , ativação intracelular das vias metabólicas, além da produção e liberação do óxido nítrico (NO) (DE CARVALHO et al., 2014; SILVA et al., 2016). Com isso estudos comprovaram o efeito do geraniol, mostrando que ele produz uma supressão

da produção de NO e PDE em macrófagos, indicando um possível bloqueio da iNOS e COX2 (SU et al., 2010). Sendo assim, nossos resultados concluem que o geraniol isolado é uma opção relevante em relação ao teste do glutamato, pois a dose isolada apresentou efeito máximo quando comparamos aos outros grupos tratados, sem proporcionar os indesejáveis efeitos advindos de drogas opióides.

A capsaicina, (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida) é o principal componente químico presente na pimenta vermelha do gênero *Capsicum* e provoca excitação das terminações nervosas que transmitem as sensações dolorosas (CATERINA et al., 1997). Ela atua na ativação dos receptores transitórios da família vanilóide (TRPVs), especialmente os TRPV1, que é um dos canais para influxo de Ca^{2+} envolvidos na migração celular, colaborando para a transdução dolorosa (HOLANDA PINTO et al., 2008; WANING et al., 2007), principalmente na via trigeminal. A transmissão do impulso resultante dessa ativação é feita por vários mediadores, incluindo taquicininas, substância P, aminoácidos excitatórios, NO e outros mediadores pró-inflamatórios (WANING et al., 2007).

Na indução da nocicepção pela capsaicina, todos os grupos de animais tratados apresentaram redução no tempo de coçar (*face rubbing*) quando comparados ao controle. Tanto o geraniol isolado como a associação nas diferentes doses, reduziram a nocicepção orofacial em camundongos. Assim, nossos resultados indicaram que a associação na dose de geraniol 50 mg/kg com codeína 30 mg/kg apresentou desempenho semelhante aos resultados obtidos para os animais tratados apenas com codeína. Isso pode sugerir que tanto a associação como também o opióide podem atuar em locais de ligação da capsaicina, o que pode estar relacionado ao bloqueio do receptor TRPV1. Resultados de estudos com ancoragem molecular através da avaliação *in silico*, demonstraram provável ação do geraniol em receptores TRPV1 e receptores ativados por peptídeos excitatórios (COSTA et al., 2020). Contudo, nossos resultados revelaram que o geraniol, embora seja capaz de promover antinocicepção pela ativação feita pela capsaicina, a associação aqui utilizada, não se mostrou vantajosa.

Através da diminuição de ambulações dos camundongos é possível avaliar se a substância em teste promove uma depressão a nível SNC. O teste do rota-rod, dessa maneira, trata-se de um método não-específico, tornando-se uma das ferramentas a qual podemos utilizar para evitarmos falsos positivos. Desse modo, o referido teste permite a avaliação da integridade do sistema motor, detectando o enfraquecimento neurológico e o relaxamento muscular não específico, o que poderia reduzir a coordenação motora e

invalidar os resultados do teste (DE SOUZA et al., 2009). De acordo com os resultados obtidos, a possível ação depressora da associação geraniol com codeína não interferiu na coordenação motora dos camundongos nos tempos de 30 e 120 minutos. Entretanto, no tempo de 60 minutos e dose de geraniol 50 mg/kg com codeína 30 mg/kg, foi possível observar uma pequena alteração no tempo de permanência na barra giratória quando comparado ao grupo controle. No entanto, é importante destacar que essa possível depressão observada no tempo de 60 minutos foi transitória, pois em 120 minutos não aparece, sendo também mínima perto da depressão ocasionada pelo benzodiazepínico.

O estudo da toxicidade aguda, dose letal 50 (DL_{50} , dose responsável pela morte de 50 % dos animais), de uma substância é um importante parâmetro para se determinar quais doses são relativamente seguras para condução dos ensaios farmacológicos (SÁ; ALMEIDA, 2006). La Rocca et al. (2016), avaliaram a toxicidade aguda do geraniol, através de testes nos quais os animais (cinco fêmeas e cinco machos) foram tratados com (mg/kg) de geraniol: 100, 300 e 1000 (v.o.) e 75, 100, 150, 200 e 300 (i.p.), onde após uma única subministração do geraniol no primeiro dia o número de morte de animais durante um período de observação de 14 dias foi contabilizado. Os resultados desse estudo apresentaram que o valor da DL_{50} pela via oral se mostrou ser superior a 1000 mg/kg. Entretanto as doses de 100, 150, 200 e 300 mg/kg i.p. apresentaram mortalidade de, 30%, 10%, 60% e 100% respectivamente. Estimando que a DL_{50} pela via intraperitoneal, seja um valor próximo de 199,9 mg/kg.

Com o objetivo de se obter resultados transparentes e confiáveis, todos os investigadores envolvidos nos testes experimentais e na análise estatística foram cegos para os grupos de tratamento, dessa forma também foi reduzido o risco de viés do observador na pesquisa com animais. Este risco é a principal questão a ser considerada a nível de ensaio cego, pois pode existir interferência direta nos resultados do estudo (BELLO et al., 2014). Com isso, diante dos resultados apresentados, pode-se sugerir que o geraniol associado a codeína possui atividade antinociceptiva orofacial e pode representar uma proposta vantajosa, pois ocorre ampliação do espectro de ação, quando o efeito é comparado ao produzido pela codeína e geraniol isolados, em diferentes vias de transdução de sinal, que tem a participação de ativação de receptores ativados pela formalina, glutamato e capsaicina. Portanto, a associação da codeína com geraniol surge como uma possível alternativa para o desenvolvimento de formulações relacionadas com o tratamento da nocicepção orofacial. Este estudo sugere que investigações futuras considerem a hipótese de que o geraniol atue sobre os receptores mGluR6, NMDA,

AMPA, receptores opioides μ , κ e δ , e TRPV1. A elucidação do mecanismo de ação é fundamental para compreensão do efeito farmacológico e possível aplicação clínica.

Reconhecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos, e as agências brasileiras CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

Ahmada ST, Arjumanda W, Sethb A, Nafeesa S, Rashida S, Ali N et al. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology* 2011;290:69–81.

A.S. Holanda Pinto, L.M.S. Pinto, M.A. Guedes, et al. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha, beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*. 15 (2008) 630-634.

BALASUBRAMANIAM, R.; KLASSER, G. D. Orofacial Pain Syndromes: Evaluation and Management. *Medical Clinics of North America*, v. 98, n. 6, p. 1385-1405, 2014.

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.

Bello S, Krogsboll LT, Gruber J, Zhao ZJ, Fischer D, Hrobjartsson A. 2014. Lack of blinding of outcome assessors in animal model experiments implies risk of observer bias. *J Clin Epidemiol*. 67(9):973-983.

Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. 2005. Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci*. 25(29):6734-6744.

Burdock GA. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA 2010;697–8.

Burke YD, Stark MJ, Roach SL, Sen SE, Crowell PL. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* 1997;32:151–6.

CAPUANO, A. et al. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *Eur J Pharmacol*, v. 605, n. 1-3, p. 57-62, 2009.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. *Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria*, v. 1, p. 25-31, 1979.

Carnesecchi S, Bradaia A, Fischer B, Coelho D, Schöller-Guinard M, Gosse F et al. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:711–5.

Carnesecchi S, Schneider Y, Ceraline J, Duranton B, Gosse F, Seiler N et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:197–200.

Carvalho KIM, Bonamin F, Santos RC, Perico LL, Beserra FP, Sousa DP et al. Geraniol—a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;387:355–65.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 816–24, Oct 23 1997.

Chichorro, J. G., Porreca, F., & Sessle, B. (2017). Mechanisms of craniofacial pain. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*, 37(7), 613–626. <https://doi.org/10.1177/0333102417704187>.

Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers.

COSTA, Tereza Karla Vieira Lopes da et al. Orofacial antinociceptive activity and anchorage molecular mechanism in silico of geraniol. **Braz. oral res.**, São Paulo , v. 34, e094, 2020. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242020000100266&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Mar. 2021. Epub Aug 07, 2020. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0094>.

DALEWSKI, Bartosz; KAMIŃSKA, Agata; SZYDŁOWSKI, Michał; KOZAK, Małgorzata; SOBOLEWSKA, Ewa. Comparison of Early Effectiveness of Three Different Intervention Methods in Patients with Chronic Orofacial Pain: a randomized, controlled clinical trial. : A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Pain Research And Management**, [s.l.], v. 2019, p. 1-9, 11 mar. 2019.

DALLEL, et al. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain*, v. 61, p. 11–16, 1995

De Carvalho KI, Bonamin F, Santos RC, Périco LL, Beserra FP, Sousa DP, et al. Geraniol—a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2014; 387(4); 355-365

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α , β -epoxy-carvone in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 23-28, 2007b.

De Souza MM, Pereira MA, Ardenghi JV, Mora TC, Bresciani LF, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V. 2009. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 93(1):40-46.

D. Le Bars, M. Gozariu, S.W. Cadden. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53 (2001) 597–652.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association*, v. 46, p. 208-209, 1957.

GUIMARÃES, A. G. et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 385, n. 3, p. 253-63, 2012.

Jorquera Moya, M., Merino Menéndez, S., Porta Etessam, J., Escribano Vera, J., & Yus Fuertes, M. (2019). Cranial nerve disorders: clinical manifestations and topography. *Radiologia*, 61(2), 99–123. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2018.09.005>

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 155-176, 2016.

La Rocca V, da Fonsêca DV, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, de Sousa DP, Santos PL, Quintans-Júnior LJ, Leal-Cardoso JH, de Almeida RN. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Jan;120(1):22-29. doi: 10.1111/bcpt.12630. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27277137.

LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1109-1116, 2016.

Leeuw R. Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento. 4a ed. São Paulo: Quintessence; 2010.

Leeuw R. 2008. Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis, and management. 4th ed. Chicago: Quintessence Books.

LUCCARINI, P. et al. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain*, v. 7, n. 12, p. 908-14, 2006

MACFARLANE, T. V. et al. Oro-facial pain in the community: prevalence and associated impact. *Community Dent Oral Epidemiol*, v. 30, n. 1, p. 52-60, 2002.

Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Critérios diagnósticos de pesquisa para disfunções temporomandibulares: uma revisão sistemática dos achados epidemiológicos do eixo I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112 (4): 453–62. doi: 10.1016 / j.tripleo.2011.04.021.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*, 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 12, p. 138-142.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*, v. 73, p. 462-471, 2002.

MERRILL, R. L. Central mechanisms of orofacial pain. **Dent Clin North Am**, v. 51, n. 1, p. 45-59, Jan 2007.

Outhwaite, W., & Turner, S. (Eds.). (2007). *The SAGE handbook of social science methodology*. Sage.

PELISSIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain*, v. 96, n. 1-2, p. 81-7, Mar 2002.

Polo MP, Bravo MG. Effect of geraniol on fatty-acid and meval- onate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. *Bio- chem Cell Biol* 2006;84:102–11.

Polo MP, Crespo R, Bravo MG. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell Bio- chem Funct* 2011;29:452–8.

P. Raboison, R. Dallel. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 28 (2004) 219–26.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**, v. 24, n. 3, p. 305-12, 2010. ISSN 1064-6655. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664833> >.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 28, n. 2, p. 219-26, 2004.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *a Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 808 pp.

RAO, V.S.; MENEZES, A.M.; VIANA, G.S. Effect of myrcene on nociception in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 42, p. 877-8, 1990

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, Vol. 57, nº 1, p. 94-105, jan./fev. 2007.

ROCHA, M.L.; OLIVEIRA, L.E.G.; SANTOS, C.C.M.P.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAÚJO, D.A.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. *Journal of Natural Medicines*, v. 67, p. 743– 9, 2013.

SÁ, R.C.S.; ALMEIDA, R.N. Toxicidade aguda. In ALMEIDA, R.N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. 1a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Brasil, cap.10, p. 124-30, 2006.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, v. 18, p. 1227-54, 2013.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. In: MUKHERJEE, J. (Ed.). *Biotechnological Applications of Biodiversity*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg p.59-110, 2015.

SHEPHARD, M. K.; MACGREGOR, E. A.; ZAKRZEWSKA, J. M. Orofacial pain: a guide for the headache physician. *Headache*, v. 54, n. 1, p. 22-39, Jan 2014.

SHETTY, A et al. Epidemiology of orofacial pain: A retrospective study. *Journal of Advanced Clinical & Research Insights*, v. 2, p. 12-15, 2015

Silva JC, Macedo LARO, Souza GR, Oliveira-Júnior RG, Lima-Saraiva SRG, Lavor EM, et al. Orofacial antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Z. Natuforsch.* 2016; 71(7-8): 209-214.

Silva JC, Saraiva SRGL, Oliveira Júnior RG, Almeida JRGS. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.* 2013; 94(1): 18-23.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Natural products assessed in animal models for orofacial pain - a systematic review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 27, n. 1, p. 124- 134, 2017.

SIQUEIRA, S. R. D. T.; VILELA, T. T.; FLORINDO, A. A. Prevalence of headache and orofacial pain in adults and elders in a Brazilian community: an epidemiological study. *Gerodontology*, v. 32, n. 2, p. 123-131, 2015.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.; LIMA, M.R.; ALMEIDA, R.N. Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 66, p. 353-359, 2011.

Su YW, Chao SH, Lee MH, Ou TY, Tsai YC. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages. *Planta Med* 2010;76:1666– 71.

Tatman D, Mo H. Volatile isoprenoids of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett* 2002;175:129–39.

THOMAS, M. A. Pain management - the challenge. *The Ochsner journal*, v. 5, n. 2, p. 15-21, 2003. ISSN 1524-5012.

Tiwari M, Kakkar P. Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicol In Vitro** 2009;23:295–301.

Tomaz-Morais, J. F., Braga, R. M., de Sousa, F. B., de Sousa, D. P., Pordeus, L. D., de Almeida, R. N., & de Castro, R. D. (2017). Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-

perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 46(5), 662-667.

VENÂNCIO, A.M.; MARCHIORO, M.; ESTAVAM, C.S.; MELO, M.S.; SANTANA, M.T.; ONOFRE, A.S.C. et al. Ocimum basilicum leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents: a behavioral and electrophysiological approach. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, p. 1043-51, 2011b.

Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, Frippliat C, Nilius B, Schwab A. 2007. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium*. 42(1):17-25.

Yan LV, Zhang L, Li N, Mai N, Zhang Y, Pan S. Geraniol promotes functional recovery and attenuates neuropathic pain in rats with spinal cord injury. 2017; 95(12): 1389-1395.

Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16(2):109-110.

VII. CONCLUSÃO

VII. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que o geraniol associado a codeína possui atividade antinociceptiva orofacial e pode representar uma proposta vantajosa, pois ocorre ampliação do espectro de ação, quando o efeito é comparado ao produzido pela codeína e geraniol isolados, em diferentes vias de transdução de sinal, que tem a participação de ativação de receptores ativados pela formalina, glutamato e capsaicina. Portanto, a associação da codeína com esse monoterpene surge como uma ótima alternativa terapêutica por inibir tanto a nocicepção a nível central como periférico, o que seria ideal para o tratamento das dores do complexo orofacial. Este estudo sugere que investigações futuras considerem a hipótese de que o geraniol atue sobre os receptores mGlu6, NMDA, AMPA, receptores opioides μ , κ e δ , e TRPV1. A elucidação do mecanismo de ação é fundamental para compreensão do efeito farmacológico e possível aplicação clínica.

VIII. REFERÊNCIAS

VIII. REFERÊNCIAS

- ABU-LAFI, S. *et al.* Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. **Bioresource Technology**, 99: 3914-3918, 2007.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; LEITE, J.R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas*, v. 2, p. 3-6, 2003.
- Ashraf, J., Zaproudina, N., Suominen, A., Sipilä, K., Närhi, M., & Saxlin, T. (2019). Association Between Temporomandibular Disorders Pain and Migraine: Results of the Health 2000 Survey. *Journal of Oral & Facial Pain and Headache*, 39(4), 399– 407. <https://doi.org/10.11607/ofph.2213>.
- Arnold, M. (2018). Headache classification committee of the international headache society (IHS) the international classification of headache disorders. *Cephalalgia*, 38(1), 1-211.
- AUVRAY, M.; MYIN, E.; SPENCE, C. The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 34, n. 2, p.214-223, 2010.
- BAKER, Dwight D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: Antiinflamatórios, analgésicos e antitrombóticos. **Quim. Nova**, v. 22, p. 744-759, 1999.
- Bašić Kes V, Zadro Matovina L. Acomodação para o diagnóstico da neuralgia do trigêmeo. *Acta Clin Croat*. 2017; 56 : 157–61. 10.20471 / acc.2017.56.01.21
- B. Calvino, R.M. Grilo. Central pain control. *Joint Bone Spine*. 73(1) (2006) 10– 16.
- BOTTEGA, F.H.; FONTANA, R.T. A dor como quinto sinal vital: utilização da escala de avaliação por enfermeiros de um hospital geral. *Texto e Contexto Enferm.*, v. 19, n.2, p.283- 90, 2010.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de medicina natural e práticas complementares-PMNPC. Brasília, DF, 2005.
- BRECKONS, M. *et al.* DEEP Study: Indirect and Out-of-pocket Costs of Persistent Orofacial Pain. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 11, p. 1200-1206, 2018.

Brito RG, Prado DS, Santana MT, Araújo AAS, Bonjardim LS, Santos MRV, et al. Citronellol Reduces Orofacial Nociceptive Behaviour in Mice –Evidence of Involvement of Retrosplenial Cortex and Periaqueductal Grey Areas. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2013. 112(4): 215-221.

Cairns BE, Ren K and Tambeli CH. Musculoskeletal oro- facial pain mechanisms: Insights from animal models. In: Sessle BJ (ed.) *Orofacial pain: Recent advances in assessment, management and understanding of mechanisms*. Washington DC: IASP Press, 2014. pp.351–72.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. *Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria*, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARNESECCHI, S. *et al.* Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, 298 (1), 197–200, 2001.

CARVALHO, K.I.M.; BONAMIN, F.; SANTOS, R.C.; PÉRICO, L.L.; BESERRA, F.P.; SOUSA, D.P. et al. Geraniol—A flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 387, p. 355–65, 2014.

Chichorro JG, Porreca F, Sessle B. Mechanisms of craniofacial pain. *Cephalalgia*. 2017 Jun;37(7):613-626. doi: 10.1177/0333102417704187. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28440673.

Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers.

COSTA, L. F. M.; GUIMARÃES, J. P.; CHAOBAS, A.; Prevalência de distúrbios da articulação temporomandibular em crianças e adolescentes brasileiros e sua relação com má-oclusão e hábitos para-funcionais: um estudo epidemiológico transversal - Parte II: distúrbios articulares e hábitos para-funcionais. **J. Bras. Odont.** 9 :162-169, 2004.

DAMASCENO, Marina BMV *et al.* Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-biological interactions**, v. 256, p. 9-15, 2016.

Deng XY, Xue JS, Li HY, Ma ZQ, Fu Q, Qu R, Ma SP. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model. *Physiol Behav.* 2015 Dec 1;152(Pt A):264-71. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.10.008. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26454213.

DE SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.16, p.2233-2252, 2011.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α , β -epoxy-carvone in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 23-28, 2007b.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2009.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3760-3772, 2010.

Dubner R, Iwata K and Wei F. Neuropathic orofacial pain mechanisms: Insights from animal models. In: Sessle BJ (ed.) Orofacial pain: Recent advances in assessment management and understanding of mechanisms. Washington DC: IASP Press, 2014, pp.331–49.

Dubner R, Ren K and Sessle BJ. Sensory mechanisms of orofacial pain. In: Greene C, Laskin D (eds) Treatment of TMDs: Bridging the gap between advances in research and clinical patient management. Chicago, IL: Quintessence, 2013, pp.3–16.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association*, v. 46, p. 208-209, 1957.

FAVERO, K. **Disfunções da articulação temporomandibular: uma visão etiológica e terapêutica multidisciplinar**. 1999. Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia Clínica Motricidade Oral) – Universidade de São Paulo, Brasil, 1999.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, v. 322, p. 145–8, 2002.

GÓES, T. M. P. L.; FERNANDES, R. S. M.; Neuralgia do trigêmeo: diagnóstico e tratamento. **Int J Dent**. 7(2) :104-115, 2008.

GUIMARÃES, Adriana G.; QUINTANS, Jullyana SS; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013.

HALPERN, L.; WILLIS, P. Orofacial Pain: Pharmacologic Paradigms for Therapeutic Intervention. **Dent Clin North Am**, v. 60, n. 2, p. 381-405, 2016.

HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. *Pain*, v. 152, n. 3 Suppl, p. S25–32, 2011.

HIERRO, I. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. **Phytomedicine**, 11: 77-82, 2004.

Hoskin PJ, Hanks GW. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs* 1991;41:326–44.

Iwata K, Imamura Y, Honda K, et al. Physiological mechanisms of neuropathic pain: The orofacial region. *Int Rev Neurobiol* 2011; 97: 227–250.

KHALLAAYOUNE, K. *et al.* Efficacy of 1% geraniol (Fulltec) as a tick repellent. *Parasite*, 16, 223–226, 2009.

LAPCZYNSKI, A. *et al.* Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, 46 (11-S1): S160-S170, 2008.

La Rocca V, da Fonsêca DV, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, de Sousa DP, Santos PL, Quintans-Júnior LJ, Leal-Cardoso JH, de Almeida RN. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Jan;120(1):22-29. doi: 10.1111/bcpt.12630. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27277137.

LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1109-1116, 2016.

Lei Y, Fu P, Jun X, Cheng P. Pharmacological Properties of geraniol- a review. *Plant. Med.* 2018; 11: 1-8.

LEITE, Laura Hévila I. *et al.* Molecular mechanism underlying orofacial antinociceptive activity of *Vanillosmopsis arborea* Baker (Asteraceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 55, p. 293-301, 2019.

LOMBARDINO, Joseph G.; LOWE, John A. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*, 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 12, p. 138-142.

MELO, Luana Torres *et al.* (–)- α -Bisabolol reduces orofacial nociceptive behavior in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 2, p. 187- 195, 2017.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*, v. 73, p. 462-471, 2002.

MERRILL, R. L. Central mechanisms of orofacial pain. **Dent Clin North Am**, v. 51, n. 1, p. 45-59, Jan 2007.

MIRANDA, H. F.; SIERRALTA, F.; PRIETO, J. C. Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Pharmacol., Biochem. Behav.* v. 92, p. 314–318, 2009.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020 Mar 27;83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162523.

NIXDORF, D. R. et al. Classifying orofacial pains: a new proposal of taxonomy based on ontology. **J Oral Rehabil**, v. 39, n. 3, p. 161-9, 2012

OKESON, J. P. The classification of orofacial pains. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 20, n. 2, p. 133-44, 2008.

PELISSIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain*, v. 96, n. 1-2, p. 81-7, Mar 2002.

Prasad SN, Muralidhara. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. *J Neurosci Res*. 2014 Sep;92(9):1205-16. doi: 10.1002/jnr.23393. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24752916.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**, v. 24, n. 3, p. 305-12, 2010. ISSN 1064-6655. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664833> >.

ROMERO-REYS, M. *et al.* Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: A model of trigeminal pain in mouse. **Headache**, v. 53, n. 1, p. 137-151, 2013.

RUIVO, M. A. et al. Prevalence of pain at the head, face and neck and its association with quality of life in general population of Piracicaba city, Sao Paulo: an epidemiological study. **Revista Dor**, v. 16, p. 15-21, 2015.

SCHAIBLE, H.-G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SESSLE, BJ. Acute and chronic craniofacial pain (...) **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva anesthesiologica**, v. 71, n. 4, p. 117, 2005.

Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 2011; 97: 179–206.

SHEPHARD, M. K.; MACGREGOR, E. A.; ZAKRZEWSKA, J. M. Orofacial pain: a guide for the headache physician. **Headache**, v. 54, n. 1, p. 22-39, Jan 2014.

SHETTY, A et al. Epidemiology of orofacial pain: A retrospective study. **Journal of Advanced Clinical & Research Insights**, v. 2, p. 12-15, 2015.

Silva JC, Almeida JRGC, Quitans JSS, Gopalsamy RG, Shanmugam S, Serafini MR, et al. Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by b-cyclodextrin inclusion complex in mice. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 48: 454-461.

SIMÕES, C. M. O. e SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2007. p. 467-495.

SIQUEIRA-LIMA, Pollyana S. *et al.* Natural products assessed in animal models for orofacial pain—a systematic review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 124-134, 2017.

Siqueira SR, Alves B, Malpartida HM, et al. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. *Neuroscience* 2009; 164: 573–577.

SIQUEIRA, S. R. D. T.; VILELA, T. T.; FLORINDO, A. A. Prevalence of headache and orofacial pain in adults and elders in a Brazilian community: an epidemiological study. **Gerodontology**, v. 32, n. 2, p. 123-131, 2015.

SI, W. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 100: 296-305, 2006.

SMILJIC, S. et al. Prevalence and characteristics of orofacial pain in university students. **Journal Oral Science**, v. 58, n. 1, p. 7-13, 2016.

S.S. De Rossi. Orofacial pain: A primer. *Dent Clin N Am.* 57 (2013) 383–392, 2013.

THOMAS, M. A. Pain management - the challenge. **The Ochsner journal**, v. 5, n. 2, p. 15-21, 2003. ISSN 1524-5012.

TOMAZ-MORAIS, J. F. *et al.* Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 662-667, 2017.

TIWARI, M. e KAKKAR, P. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, 23: 295-301, 2009

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 1, p. 57-77, 2006.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A. S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 213-220, 2015.

VIANA, G.S.B.; VALE, T.G.; PINHO, R.S.N.; MATOS, F.J.A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 70, p. 323–7, 2000.

WILCOX, Sophie L. *et al.* Anatomical changes at the level of the primary synapse in neuropathic pain: evidence from the spinal trigeminal nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2508-2515, 2015.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.

Xu W, Zhang J, Wang Y, et al. Changes in the expression of voltage-gated sodium channels Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 in rat trigeminal ganglia following chronic constriction injury. *Neuroreport* 2016; 27: 929–934.

Yan LV, Zhang L, Li N, Mai N, Zhang Y, Pan S. Geraniol promotes functional recovery and attenuates neuropathic pain in rats with spinal cord injury. 2017; 95(12): 1389-1395.

IX. Anexos

Anexo 1



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito antinociceptivo do geraniol (trans-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) associado à codeína na região orofacial em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 3513111119 (ID 000950), sob a responsabilidade de **Ricardo Dias de Castro e equipe; Ana paula Nunes Lopes** - 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 03/04/2020.

We certify that the proposal "Antinociceptive effect of geraniol (trans-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol) associated with codeine in the orofacial region in mice", utilizing 108 Heterogenics mice (108 males), protocol number CEUA 3513111119 (ID 000950), under the responsibility of **Ricardo Dias de Castro and team; Ana paula Nunes Lopes** - 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 04/03/2020.

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

Vigência da Proposta: de **02/2020** a **08/2020** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal lPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 3 meses**

N: **108**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: Laboratório de Psicofarmacologia/lPeFarM/UFPB

João Pessoa, 03 de abril de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

