

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO E
DA FRAÇÃO RICA EM ALQUILAMIDAS OBTIDOS DAS FLORES DE
ACMELLA OLERACEA (L.) R.K. JANSEN, EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO
EM CAMUNDONGOS

CURITIBA
2013

ELLEN CRISTINE OGATA NOMURA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO E
DA FRAÇÃO RICA EM ALQUILAMIDAS OBTIDOS DAS FLORES DE
ACMELLA OLERACEA (L.) R.K. JANSEN, EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO
EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Departamento de Farmacologia,
Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda de Paula Werner
Co-orientadora: Prof. Dra. Cristiane Hatsuko Baggio

CURITIBA
2013



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação do potencial terapêutico do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas obtidos das flores de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, em modelos de nocicepção em camundongos", de autoria da pós-graduanda **ELLEN CRISTINE OGATA NOMURA**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Eunice André (Farmacologia – UFPR) e Prof. Dr. Juliano Ferreira (Farmacologia - UFSC), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 29 de junho de 2013.

Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Eunice André (Farmacologia – UFPR)

Prof. Dr. Juliano Ferreira (Farmacologia - UFSC)



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 87ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao vigésimo nono dia do mês de junho do ano de dois mil e treze, às nove horas, no
3 Anfiteatro nº 07 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
4 reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-
5 graduanda **ELLEN CRISTINE OGATA NOMURA**, intitulada "Avaliação do potencial
6 terapêutico do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas obtidos das flores de
7 *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, em modelos de nocicepção em camundongos", sob
8 orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner e composta pelos professores:
9 Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a
10 Dr.^a Eunice André (Farmacologia – UFPR) e Prof. Dr. Juliano Ferreira (Farmacologia -
11 UFSC). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco
12 minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante trinta
13 minutos por cada um dos membros da Banca e tendo trinta minutos para responder a cada
14 uma das arguições. No final da sessão, a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:
15 Aprovada. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-
16 Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação, o trabalho
17 deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada
18 mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
19 presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca
20 Examinadora em Curitiba, 29 de junho de 2013.

Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda de Paula Werner (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Eunice André (Farmacologia – UFPR)

Prof. Dr. Juliano Ferreira (Farmacologia - UFSC)

Unicamente a Deus...
“... tudo posso naquele que me fortalece”.
Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela sua presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis. Ofereço-te todo meu amor e minha gratidão pela sua imensa fidelidade.

Ao meu esposo André pela paciência, pelos conselhos, pelo amor e pela compreensão em todos os momentos. Ao nosso pequeno Yann pela alegria que sempre nos proporcionou. Agradeço por estarem incansavelmente ao meu lado, sempre!

Aos meus pais amados e irmãos, por me incentivarem sempre neste caminho do crescimento e do aperfeiçoamento. Por sempre cuidarem de mim com tanto amor e preocupação.

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Fernanda de P. Werner e à minha co-orientadora Prof. Dra. Cristiane H. Baggio, pelos ensinamentos e por me fazer conhecer mais sobre o mundo científico.

Pelas grandes amizades que fiz em todo este tempo:

- Aos meus amigos especiais Mel, Lê, Carla, Luís e Thiago os quais foram essenciais no decorrer de todo o meu projeto. Agradeço imensamente por todo auxílio em meus experimentos, pela imensa paciência, pelo companheirismo e principalmente pela amizade sempre. Sem vocês todo este trabalho não seria possível.
- A Pri e a Liana que estiveram sempre por perto, me auxiliando em todas as minhas dificuldades (pessoais e científicas) e me aconselhando em tudo. Amigas e parceiras!
- A Lu e a Dani, companheiras de lab pela amizade e por estarem sempre presentes nos momentos que precisei.

À minha amiga Crica, pela força, pelo carinho, por sempre lembrar de mim em suas orações e por ter me dado uma lembrancinha especial que ficará eternamente guardada comigo e no meu coração! Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Thales Cipriani e equipe (Departamento de Bioquímica UFPR) pelo fornecimento dos extratos e frações da *Acmella oleracea* (L.).

A todos os professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR, que de alguma forma contribuíram para este projeto e para o meu crescimento e formação.

Ao CNPQ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 476653/2010-0), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As flores da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, popularmente conhecida como “jambu”, são comumente utilizadas como analgésico por algumas comunidades da região amazônica, principalmente no tratamento da dor de dente. Tendo em vista este uso etnofarmacológico, foi investigada sua atividade antinociceptiva sistêmica e local (região orofacial) em camundongos. O presente estudo avaliou o efeito antinociceptivo do extrato etanólico (EEAO) e da fração hexânica rica em alquilamidas (FH) obtidos das flores da *Acmella oleracea* (L.), utilizando diferentes modelos de dor. O tratamento intraperitoneal com o EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) reduziu tanto a fase neurogênica quanto a fase inflamatória na nocicepção orofacial induzida pela formalina, assim como, também reduziu o comportamento nociceptivo dos animais na nocicepção orofacial induzida pela capsaicina e cinamaldeído. Adicionalmente o EEAO na dose de 100 mg/kg (i.p.) também reverteu a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela capsaicina no teste de placa quente. Do mesmo modo, no teste de placa quente a latência de retirada de pata foi aumentada pelo EEAO (100 mg/kg) e esta resposta foi parcialmente revertida pela naloxona. Além disso, o EEAO (100 mg/kg) também foi capaz de reduzir a alodinia mecânica causada pela constrição parcial do nervo ciático por 3 horas. O valor estimado da DL50 foi 889 mg/kg e o EEAO não alterou a locomoção dos animais no teste de campo aberto. Adicionalmente, a FH (10 e 30 µg/5 µL) parece não apresentar irritação ocular quando comparados ao grupo capsaicina 0,3 µg/5 µL, no modelo de limpeza de olhos. Uma curva com doses crescentes da FH foi realizada, sendo selecionada a dose de FH 1 µg/lábio, a qual não apresentou comportamento nociceptivo, para prosseguir nos experimentos seguintes para avaliação de uma possível ação anestésica e analgésica. A FH (1 µg/lábio) foi capaz de reduzir tanto a fase neurogênica quanto a fase inflamatória na nocicepção orofacial induzida pela formalina, assim como a nocicepção orofacial induzida pela capsaicina com administração ipsi e contralateral. Quando comparada à lidocaína, a FH (1 µg/lábio) promoveu um efeito pronunciado na primeira fase do teste de formalina, reforçando uma possível ação semelhante aos anestésicos locais. Adicionalmente, a FH (30 µg/lábio) por se promoveu um comportamento nociceptivo na qual a morfina (100 µg/lábio) foi efetiva em reduzir, comportamento este, que não foi inibido pelo cetoprofeno (100 µg/10 µL), sugerindo que o componente inflamatório pode não estar envolvido. Por fim, o pré-tratamento dos animais com bloqueadores de canais de potássio (GLI e TEA) e antagonistas TRP (VR e HC) não afetaram a atividade nociceptiva da FH (30 µg/lábio). Desta forma, nossos resultados sugerem que o EEAO produz um efeito antinociceptivo pronunciado e não causa efeitos adversos nas doses testadas. A presença das N-alquilamidas, sugere que o efeito terapêutico do EEAO e da FH pode estar relacionado a uma possível atividade semelhante aos anestésicos locais, porém mais estudos são necessários para o esclarecimento do exato mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Acmella oleracea*; jambu; antinociceptivo; anestésico.

ABSTRACT

The flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen is commonly used as an analgesic by some communities from Amazon region, mainly to treat toothache. The present study evaluated the antinociceptive effect of the ethanolic extract (EEAO) obtained from flowers of *A. oleracea*, such as the hexanic fraction rich in alkylamides (FH), using different models of experimental nociception in mice. Intraperitoneal treatment with EEAO (10, 30 and 100 mg/kg) reduced both neurogenic and inflammatory phases of the formalin- and also capsaicin- and cinnamaldehyde-induced orofacial nociception. Interestingly, EEAO at 100 mg/kg (i.p.) also reversed capsaicin-induced heat hyperalgesia assessed as the latency to paw withdrawal in the hot plate test. Also in the hot plate test, paw withdrawal latency was increased by EEAO (100 mg/kg) and this response was partially reversed by naloxone. Furthermore, EEAO (100 mg/kg) also reduced mechanical allodynia caused by partial sciatic nerve ligation for 3 h. The estimated LD50 value was 889 mg/kg and EEAO did not alter the locomotion of animals in the open-field test. FH (10 and 30 µg/5 µL) in the eye wiping model did not cause ocular irritation when compared to group (capsaicin 0.3 µg/5 µL). A curve with increasing doses of FH was performed to select the doses for subsequent experiments, and FH (1 µg/lip) did not promote a nociceptive behavior and was the dose selected for evaluation of a possible analgesic and anesthetic activity. FH (1 µg/lip) reduced both neurogenic and inflammatory phases of the formalin- and also capsaicin (ipsi and contralateral administration) induced orofacial nociception. When compared with the lidocaine, in formalin test, FH (1 µg/lip) promoted a similar anesthetic effect, reinforced a possible activity in sodium voltage gated channels. FH (30 µg/lip) did promote a per se nociceptive response and the morphine (100 µg/lip) was effective in reducing the nociception, but the same response not was found with ketoprofen (100 µg/10 µL) showing that there is no involvement of the inflammatory component. At last, the pre-treatment of the animals with channel blockers (GLI and TEA) and antagonists (RR and HC) did not affect the FH (30 µg/lip) nociceptive activity. Taken together, our results demonstrated that EEAO produces marked antinociception effect and does not cause adverse effects at doses tested. The presence of N-alkylamides on FH suggests that the therapeutic effect of EEAO and FH is related to its highest local anesthetic activity. However, the exact mechanism remains unclear and further studies need to be carried out to clarify this point.

Keywords: *Acmella oleracea*; jambu; antinociceptive; anesthetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Transmissão da informação nociceptiva.....	22
Figura 2 -	Folhas e flores do jambu.....	25
Figura 3 -	Estrutura química do espilantol.....	27
Figura 4 -	Estrutura química do hidroxi- α -sanshool.....	28
Figura 5 -	Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico e da fração hexânica oriundos das flores da <i>Acmella oleracea</i>	31
Figura 6 -	Perfil cromatográfico do EEAO em UPLC, com detecção em λ 250 nm.....	42
Figura 7 -	Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) sobre a atividade locomotora no modelo de campo aberto em camundongos.....	43
Figura 8 -	Efeito do EEAO sobre a nocicepção induzida por formalina 2,5% em camundongos.....	44
Figura 9 -	Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) no modelo de nocicepção orofacial induzida pela capsaicina (5,2 nmol/lábio) em camundongos.....	45
Figura 10 -	Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) no modelo de nocicepção orofacial induzida pelo cinamaldeído (100 nmol/lábio) em camundongos.....	46
Figura 11 -	Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) na hiperalgesia térmica ao calor (placa quente) induzido pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	47
Figura 12 -	Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EEAO (100 mg/kg, i.p.) no modelo de hiperalgesia térmica ao calor (placa quente) em camundongos.....	48
Figura 13 -	Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) sobre a alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	49
Figura 14 -	Efeito da instilação de 5 μ L de capsaicina (0,3 μ g/olho) e da FH (10-100 μ g/olho) na conjuntiva sobre o movimento de limpeza	

	dos olhos de camundongos.....	50
Figura 15 -	Curvas tempo e dose resposta da administração local da FH (0,01-100 µg/lábio) na região orofacial de camundongos.....	52
Figura 16 -	Efeito do pré-tratamento (10 e 30 min) da administração orofacial da FH (1 µg/10 µL) sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina (2,5%) orofacial em camundongos.....	53
Figura 17 -	Efeito da administração orofacial local da lidocaína (Lid) (0,2 µg/10 µL) na fase neurogênica (A) e fase inflamatória (B) da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos.....	54
Figura 18 -	Efeito da administração local da FH (1 µg/10 µL) no modelo de nocicepção orofacial induzida pela capsaicina (1,6 µg/10 µL) em camundongos.....	55
Figura 19 -	Efeito do pré-tratamento com morfina e cetoprofeno sobre a nocicepção orofacial induzida pela FH (30 µg/10 µL) em camundongos.....	57
Figura 20 -	Efeito do pré-tratamento com bloqueadores e antagonistas de canais iônicos sobre a nocicepção induzida pela FH (30 µg/10 µL) em camundongos.....	59

LISTA DE ABREVIações

AAE	Aminoácidos excitatórios
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Trifosfato de adenosina
CET	Cetoprofeno
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
EEAO	Extrato etanólico da <i>Acmella Oleracea</i>
EPM	Erro padrão das médias
ESI-MS	Espectrometria de massa por ionização por electrospray
FH	Fração hexânica
GLI	Glibenclamida
Glu	Glutamato
GRD	Gânglio da raiz dorsal
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
K _{ATP}	Canal de potássio sensível ao ATP
LID	Lidocaína
MORF	Morfina
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
PDA	Detector de Arranjos de Fotodiodos
PG	Prostaglandina
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substancia P
TEA	Tetraetilamônio
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1

TRPV2	Receptor de potencial transitório vanilóide 2
TRPV3	Receptor de potencial transitório vanilóide 3
TRPV4	Receptor de potencial transitório vanilóide 4
UFAC	Universidade Federal do Acre
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
VEI	Veículo
VR	Vermelho de Rutênio

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Dor.....	16
1.1.1 Classificação dos tipos de dor.....	22
1.2 <i>Acmella oleracea</i> (L.)R.K. Jansen.....	24
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 <i>Acmella Oleracea</i> (L.)	30
3.1.1 Obtenção do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas.....	30
3.1.2 Análise do extrato etanólico (fração EEAO) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	31
3.2 Animais.....	32
3.3 Estratégia para a investigação dos efeitos biológicos das preparações vegetais da <i>Acmella oleracea</i> (L.)	32
3.3.1 Avaliação da toxicidade aguda, teste geral de atividades do EEAO e avaliação da atividade locomotora dos animais.....	33
3.3.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da administração sistêmica do EEAO	34
3.3.2.1 Nocicepção orofacial induzida pela formalina.....	34
3.3.2.2 Nocicepção orofacial induzida pela capsaicina.....	34
3.3.2.3 Nocicepção orofacial induzida pelo cinamaldeído.....	35
3.3.2.4 Nocicepção térmica ao calor.....	35
3.3.2.4.1 Hiperalgisia térmica induzida pela administração intraplantar de capsaicina.....	35
3.3.2.4.2 Envolvimento do sistema opioidérgico na hiperalgisia térmica ao calor.....	36
3.3.2.5 Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático (dor neuropática)	36
3.3.3 Avaliação dos efeitos da administração da FH.....	37
3.3.3.1 Instilação da FH no globo ocular.....	37

3.3.3.2	Efeito da administração orofacial da FH.....	38
3.3.3.3	Avaliação do efeito antinociceptivo da administração orofacial da FH.....	38
3.3.3.4	Avaliação do efeito nociceptivo da administração orofacial da FH.....	39
3.3.3.5	Envolvimento do sistema/componente opioidérgico e inflamatório na nocicepção orofacial induzida pela FH.....	39
3.3.3.6	Envolvimento de canais TRPs e canais de potássio na nocicepção orofacial induzida pela FH.....	40
3.4	Análise estatística.....	40
4.	Resultados.....	41
4.1	Análise em Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC).....	41
4.2	Estudos com o Extrato Etanólico das fores de <i>Acmella oleracea</i> (EEAO).....	42
4.2.1	Avaliação da toxicidade aguda, teste de atividades gerais do EEAO e avaliação da atividade locomotora dos animais.....	42
4.2.2	Nocicepção orofacial induzida pela injeção de formalina.....	43
4.2.3	Nocicepção orofacial induzida pela injeção de capsaicina.....	44
4.2.4	Nocicepção orofacial induzida pela injeção de cinamaldeído.....	45
4.2.5	Nocicepção térmica ao calor.....	46
4.2.5.1	Hiperalgisia térmica induzida pela administração intraplantar de capsaicina.....	46
4.2.5.2	Envolvimento do sistema opioidérgico na hiperalgisia térmica ao calor.....	47
4.2.6	Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático (dor neuropática)	48
4.3	Estudos com a Fração Hexânica das Flores do Jambu (FH).....	49
4.3.1	Instilação da FH no globo ocular.....	50
4.3.2	Efeito da administração orofacial da FH.....	50
4.3.3	Avaliação do efeito antinociceptivo da administração orofacial da FH.....	53
4.3.3.1	Nocicepção induzida pela injeção orofacial de formalina em camundongos.....	53
4.3.3.2	Nocicepção induzida pela injeção orofacial de capsaicina em	

camundongos.....	54
4.3.4 Avaliação do efeito nociceptivo da administração orofacial da FH.....	55
4.3.4.1 Envolvimento do sistema/componente opioidérgico e inflamatório na nocicepção orofacial induzida pela FH.....	55
4.3.4.2 Envolvimento de canais TRPs e canais de potássio na nocicepção orofacial induzida pela FH.....	58
5. Discussão.....	60
6. Conclusão.....	72
Referências.....	73

1. Introdução

1.1 Dor

Por décadas, vários cientistas têm tentado realizar extensas pesquisas para estudar os mecanismos relacionados ao processamento da dor, assim como para desenvolver terapias eficazes para seu tratamento. Tais esforços têm aumentado significativamente a compreensão da “dor” e levaram a descoberta de novas drogas para tratamento da mesma nos seres humanos.

Segundo Merskey (1994) a dor é uma experiência complexa que pode ser entendida como um fenômeno biopsicossocial que é originado da interação de múltiplos sistemas neuroanatômicos e neuroquímicos envolvendo vários processos cognitivos e afetivos. A melhor definição para dor, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) é uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (Loeser et al., 2008). Pode-se afirmar, que a dor possui componentes sensoriais e afetivos assim como um componente cognitivo que reflete em um aviso na antecipação de um perigo futuro (Garland, 2012). Além disso, é importante destacar que a atual compreensão da dor e dos mecanismos subjacentes foram revelados principalmente por experimentação utilizando modelos animais, devido a severas limitações de utilização de seres humanos na investigação da dor (Ma et al., 2011). Assim, quando modelos animais são utilizados para estudos pré-clínicos na investigação da dor, é importante considerarmos a distinção entre os termos dor e nocicepção (Barrot, 2012), pois como mencionado anteriormente, a dor está intimamente relacionada aos componentes sensorial e emocional/afetivo enquanto a nocicepção se relaciona ao componente sensorial, o qual é passível de mensuração em animais, distintamente dos seres humanos (Coutaux et al., 2005; Julius e Basbaum, 2001).

Deste modo, a nocicepção é referida como um mecanismo gerado a partir de um estímulo nocivo (térmico, químico ou mecânico) interno ou externo ao indivíduo, o qual é detectado, transduzido através de vias neurais e transmitido através do sistema nervoso periférico até o sistema nervoso central (Todd, 2010 e Garland, 2012). Estes estímulos ativam terminações nervosas livres e periféricas, chamados de nociceptores, encontrados em todas as partes

do corpo. As regiões da cabeça e do corpo são inervadas por neurônios sensoriais e possuem o corpo celular no gânglio trigeminal e nos gânglios da raiz dorsal (GRD), respectivamente, e são responsáveis por transmitir a informação gerada na periferia para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal, respectivamente. (Beeson, 1999; Millan, 1999). A existência do termo nociceptor, foi proposta por Sherrington no início do século XX, como sendo um neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo (mecânico, térmico ou químico) capaz de causar um dano tecidual e que apresentava limiar ou sensibilidade características, as quais o distinguem de outras fibras nervosas sensoriais (Julius e Basbaum, 2001). Desta forma os nociceptores podem ser classificados baseados em critérios anatômicos, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras de pequeno e médio diâmetro compreendem a maioria dos nociceptores, possuem terminações nervosas periféricas livres, apresentam alto limiar de ativação e são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos. As fibras de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), são denominadas fibras C e se caracterizam por serem não mielinizadas e apresentarem uma baixa velocidade de condução do potencial de ação (0,5 a 2 m/s), além de serem responsáveis pela condução da dor lenta e difusa. As fibras de médio diâmetro (2 a 6 μm) como a A δ , são parcialmente mielinizadas e de velocidade de condução mais rápida (12 a 30 m/s), e são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda (Julius e Basbaum, 2001; Millan, 1999; Jacobson e Gao, 2006; Woolf et al., 2007; Djouhri e Lawson, 2004). Uma diferença importante entre os nociceptores está relacionada à atividade funcional, pois existem fibras C e A δ que são ativadas por estímulos mecânicos nocivos e que podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto outras podem ser polimodais, ou seja, que podem ser ativadas por estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos (Meyer et al., 1994; Milan, 1999). A maioria das fibras C são consideradas polimodais, outras são mecanicamente insensíveis, mas respondem ao calor nocivo. Por último, o estímulo natural de alguns nociceptores são difíceis de identificar, sendo estes chamados de silenciosos ou dormentes que respondem somente quando sensibilizados por uma lesão tecidual (Julius e Basbaum, 2001, Millan, 1999; Pleuvry e Lauretti, 1996).

A ativação das fibras aferentes primárias ocorre, quando um estímulo nocivo de origem mecânica, térmica ou química ativam canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos destas fibras nociceptivas gerando correntes despolarizantes, as quais dependendo de sua intensidade disparam potenciais de ação via ativação de canais de sódio sensíveis à voltagem. Os canais iônicos encontrados na membrana celular podem ser operados por receptores, os quais possuem um complexo formado pelo receptor e um canal iônico que constitui parte integrante de uma proteína que possui vários domínios transmembrana (ex. receptores colinérgicos nicotínicos, gabaérgicos, NMDA entre outros) ou sensíveis a voltagem que se abrem ou fecham com a variação da voltagem do potencial da membrana (ex. canais de cálcio, sódio, potássio, entre outros (Millan, 1999)). É importante destacar que várias drogas analgésicas causam uma regulação decrescente ou dessensibilização destes receptores alterando a permeabilidade iônica da membrana neuronal, conseqüentemente reduzindo a excitabilidade pós-sináptica. Por outro lado, anestésicos locais bloqueiam a condução do impulso nas fibras nociceptivas através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem. Deste modo, a efetividade terapêutica de algumas drogas como anticonvulsivantes, antiarrítmicos e anestésicos locais no tratamento de alguns tipos de dor (particularmente na dor neuropática e neuralgia do trigêmeo) estão provavelmente diretamente relacionados aos canais de sódio (Rang e Urban, 1995; Catterall & Mackie, 1996; Millan, 1999). Sob condições normais as fibras nociceptivas expressam dois tipos de canais de sódio: um sensível a tetrodotoxina o qual é encontrado em todos os neurônios sensoriais e é rapidamente ativado, e outro resistente a tetrodotoxina que é lentamente ativado e é expresso somente em fibras de pequeno diâmetro e de condução lenta, que inclui os nociceptores polimodais (Rang e Urban, 1995; Millan, 1999). Outro canal iônico importante é o canal de cálcio, o qual é reconhecido pelo seu papel fundamental na regulação de vários processos biológicos e as alterações transitórias na concentração destes íons no citoplasma representam um passo crucial na liberação de neurotransmissores e na modulação da excitabilidade da membrana celular (Zamponi e Snutch, 1998; Prado, 2001; Galeotti et al., 2004). Atualmente, é estudada outra família de canais iônicos que compreende os receptores de potencial transitório (TRP), os quais

possuem a capacidade de permear cátions, principalmente o cálcio (Latorre et al., 2009). Estes canais TRP são expressos em quase todos os tipos de tecidos e células e desempenham um papel importante na regulação das diferentes funções celulares: visão, olfato, paladar, osmorregulação, mecanosensibilização e termosensibilização (Cortright et al., 2007). Em específico, o receptor TRPV1, o canal TRP arquetípico, é principalmente expresso em nociceptores, está envolvido na transmissão e modulação da dor, e representa uma importante estação de integração de respostas aos mediadores inflamatórios. A ativação do TRPV1 causada por lipídeos endógenos (endovanilóides), por meio ácido (pH baixo) e por altas temperaturas, leva a uma sensação de forte dor em queimação. Além de ser ativado por calor nocivo, o receptor TRPV1 é ativado pela capsaicina, o ingrediente pungente presente na pimenta vermelha, o qual atua como um integrador molecular de estímulos nocivos no nociceptor (Cortright et al., 2007). Outro importante membro da família dos TRPs envolvido na transmissão da informação nociceptiva é o receptor TRPA1. Os receptores TRPA1 podem ser ativados por estímulos mecânicos e pelo frio nocivo, bem como por compostos químicos pungentes ou irritantes, incluindo aqueles encontrados no óleo de mostarda (alil-isotiocianato), óleo de canela (cinamaldeído) e formalina (para revisão ver Cortright et al., 2007). Outros canais TRPs como TRPA1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4 também são expressos em neurônios periféricos sensoriais. A maioria dos TRPs age como sensores fisiológicos a estímulos externos e também são capazes de responder a uma gama de substâncias endógenas como lipídios, nucleotídeos, produtos do estresse oxidativo e açúcares (Oseguera et al., 2008).

Uma vez ativados os canais iônicos na membrana do neurônio geram a despolarização, a fibra é ativada e subsequentemente ocorre a liberação de neurotransmissores (ex. substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato (GLU) os quais são responsáveis pela excitação de neurônios secundários específicos localizados na medula espinhal (Besson e Chaouch, 1987; Willis e Coggeshall, 1991; Millan, 1999). Por outro lado, após uma lesão tecidual existem também outras substâncias endógenas que são capazes de sensibilizar os nociceptores como o CGRP, trifosfato de adenosina (ATP), prostaglandinas (PG), neuropeptídeo Y, neurotrofinas,

somatostatina, prótons, histamina, serotonina, entre outros (Besson, 1999; Melzack e Loeser, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001; Kidd et al., 2004) podendo ser liberados por neurônios sensoriais e também por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas e endoteliais, mastócitos, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (Besson, 1999). Em contrapartida, os mediadores inflamatórios como os peptídeos neurotransmissores (ex.: bradicinina, serotonina), lipídeos (ex.: prostaglandina) e neurotrofinas (ex.: fator de crescimento neural) são secretados no local original da lesão tecidual para estimular a ativação do nociceptor. A presença destas biomoléculas ativa os nociceptores ou reduz o seu limiar de ativação, resultando na transmissão de sinais aferentes para o corno dorsal da medula espinhal bem como o início da inflamação (Garland, 2012; Coutaux et al., 2005). Ainda em relação aos mediadores inflamatórios, existem dois grupos de extrema importância na transmissão nociceptiva. Como representantes do primeiro grupo, que promovem a sensibilização de nociceptores causando o fenômeno chamado hiperalgesia, estão as citocinas e prostaglandinas, e do segundo grupo que promovem a ativação de nociceptores sensibilizados, estão as cininas (bradicinina) e os neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP) (Millan, 1999; Calixto et al., 2000). Além disso, a administração desses mediadores em animais promovem comportamentos nociceptivos, caracterizados pelo ato de morder, lamben ou chacoalhar a área injetada, indicando a ativação do nociceptor (Millan, 1999).

Os impulsos nociceptivos chegam primeiramente ao corno dorsal da medula espinhal, os quais realizam sinapses e transmitem a dor. Os nociceptores chegam em suas respectivas lâminas onde fazem conexões através de fibras aferentes primárias, que estão altamente organizadas. As lâminas no corno dorsal da medula espinhal, são classificadas de I a VI, sendo a lâmina I considerada a mais superficial enquanto a lâmina VI a mais profunda. As fibras do tipo C, não mielinizadas, que compreendem os principais nociceptores, realizam conexões nas lâminas I e II. As fibras parcialmente mielinizadas do tipo A δ , que são responsáveis pela resposta aos estímulos nocivos, finalizam principalmente na lâmina I e V e as que são sensíveis mecanicamente, finalizam nas lâminas II e III. E por último, as fibras do tipo A β , responsáveis pela propriocepção e pelas sensações do tipo mecânicas,

realizam conexões nas lâminas III, IV, V e VI, as mais profundas (Millan, 1999; Hunt e Koltzenburg, 2005). A partir das lâminas do corno dorsal, a informação nociceptiva é transmitida para o tálamo através de interneurônios de segunda ordem e neurônios de projeção. Esta informação transmitida do corno dorsal da medula espinhal para o tálamo e córtex somatosensorial, constitui a via ascendente em que se destaca a via espinotalâmica como sendo a principal e mais importante via na transmissão da dor (Figura 1). A conexão sináptica entre os neurônios aferentes primários e os neurônios sensoriais secundários no corno dorsal, envolve a liberação de glutamato e substância P através dos aferentes primários, responsáveis respectivamente, pela produção de potencial pós-sinápticos lentos e rápidos. Este processo excitatório, também tem o envolvimento de canais de sódio e cálcio, sendo este o principal responsável pela regulação da liberação de neurotransmissores (Millan, 1999; Wall e Melzack, 1999).

Após a sinapse entre os aferentes primários e os neurônios secundários no corno dorsal, são emitidas projeções diretamente para estruturas do tronco cerebral e diencefalo, que compreende o tálamo e córtex somatosensorial incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo da amígdala, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (Almeida et al., 2004). O tálamo é uma região que desempenha um papel fundamental e importante, sendo o responsável pela integração do impulso da dor e está envolvido na recepção e transferência do potencial nociceptivo. Consiste também, no local onde neurônios de terceira ordem conduzem os impulsos nociceptivos para o córtex cerebral onde a informação é processada, resultando na sensação da dor (Furst, 1999; Weng et al., 2000).

episódio doloroso é transitório, há ativação de nociceptores diretamente na pele e/ou em tecidos do corpo, na ausência de lesão tecidual e contribui para proteger o organismo de potenciais danos físicos, causados pelo ambiente ou por estresse de tecidos corpóreos (Tracey et al., 2007). No processo crônico, a dor ocorre devido a uma lesão ou patologia e persiste por semanas, meses ou anos, e muitas vezes até após a recuperação da lesão, podendo ser perpetuada por outros fatores além daqueles que causaram a dor propriamente dita. Além disso a dor crônica pode também trazer várias consequências físicas, mentais, sociais, psicossociais e comportamentais podendo também envolver estresse grave emocional. E este tipo de dor difere da dor aguda em vários aspectos, nos quais se destacam a persistência, alterações neuroadaptativas, dificuldade de tratamento e a inabilidade do corpo humano em restaurar suas funções fisiológicas a níveis homeostáticos normais (Iadarola e Caudle, 1997; Besson, 1999, Loeser e Melzack, 1999).

Em geral, a dor também pode ser classificada de acordo com sua origem, em nociceptiva (associada com a estimulação excessiva de nociceptores com terminações na pele, vísceras e outros órgãos), neuropática (ocorre após disfunção ou lesão de um nervo ou um grupo de nervos), neurogênica ou psicogênica (lesão neural com liberação de neuropeptídeos tanto a nível periférico quanto central que levam a dor, ou relacionada a fatores psicológicos que não possui fator somático identificável) (Millan, 1999). Somando-se a isso, ainda podem ocorrer manifestações dolorosas anormais decorrentes de algumas desordens, como a inflamação, que ocorre quando a dor é proveniente de um dano tecidual significativo o qual é responsável por desencadear uma série de eventos em cascata. Neste caso ocorre uma hipersensibilização dos nociceptores e consequente aumento da transmissão nociceptiva, resultando na hiperalgesia, ou seja, uma resposta exacerbada a um estímulo que normalmente já é percebido como doloroso, devido a sensibilização de terminações nervosas nociceptivas periféricas; e a alodínia que ocorre quando um estímulo previamente não-nocivo (i.e. leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente) causa dor aproveitando-se do menor limiar necessário para disparo do nociceptor e início da transmissão nociceptiva (Woolf, 1995; Haddad, 2007; Loeser e Treede, 2008).

É sabido que apesar da dor ser um processo fisiológico importante para a sobrevivência do ser humano e de representar um alerta para alterações do organismo, ela traz uma sensação desagradável e na maioria das vezes está associada ao sofrimento. Por este motivo, se tem buscado alterar o curso natural das doenças através do alívio de sintomas dolorosos, objetivando a busca por analgésicos mais potentes e com menos efeitos adversos. Atualmente se tem disponível vários fármacos para uso no tratamento da dor, como anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE's), opióides, anestésicos locais, entre outros. Além destes, existem outras classes de fármacos utilizados para o tratamento específico da dor neuropática, a qual não apresenta uma resposta eficaz aos analgésicos convencionais. Neste grupo estão antidepressivos (ex. imipramina e amitriptilina), que atuam no sistema nervoso central inibindo a captura de noradrenalina e os anticonvulsivantes (ex. carbamazepina e fenitoína) que atuam sobre canais de sódio controlados por voltagem e a gabapentina que atua em canais de cálcio (Mori, 2010). De uma forma geral, o emprego do arsenal terapêutico atual raramente resulta na eliminação da dor. Ao contrário, muitos pacientes continuam refratários aos tratamentos, seja pela persistência das crises ou por efeitos colaterais indesejáveis (Attal et al., 2010).

Com o passar dos anos, acentuou-se mais a busca por novas drogas com ação analgésica provenientes de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais, as quais apresentam papéis extremamente relevantes na medicina moderna. Esta relevância é resultante do fornecimento de substâncias altamente importantes que dificilmente seriam obtidas via síntese química, e compostos que podem ser moderadamente modificados de forma a se tornarem mais eficazes e/ou menos tóxicos (Robbers et al., 1996). Neste contexto, teremos como material de estudo a planta *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, para a avaliação de suas possíveis propriedades analgésicas.

1.2 *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

A *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen e sua sinonímia científica *Spilanthes Acmella var oleracea*, é uma planta medicinal pertencente a família Asteraceae (antiga Compositae), conhecida popularmente como jambu, agrião-do-pará, agrião-do-norte, agrião-bravo, agrião-do-brasil, botão-de-ouro, entre outros (Favoreto e Gilbert, 2010). É relatada a existência de cerca de 60

espécies do gênero *Spilanthes* em todo o mundo, sendo que o gênero *Spilanthes* também é descrito como *Acmella* em alguns artigos da literatura. A *Acmella oleracea* é originária da América do Sul, sendo uma planta típica da região norte do Brasil, mais precisamente do Pará, cujas folhas são utilizadas como condimento pois apresentam sabor acre e pungente, integrando pratos da culinária local como o “tacacá” e o “pato no tucupi” (Rebello et al., 2005; Malosso et al., 2008; Cardoso e Garcia, 1997).

A planta *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (bas. *Spilanthes oleracea*; syn. *Spilanthes acmella* var. *oleracea*), é uma planta de porte herbáceo, medindo entre 30 a 60 cm de altura, com folhas compostas, opostas, membranáceas e pecioladas, inflorescências compostas de flores amarelas caule cilíndrico e carnoso, sendo a raiz principal do tipo pivotante, com abundantes ramificações laterais (Hind et al., 2003).



Figura 2: Folhas e flores do jambu.(http://www.thienemans.com/photos/index.php/Herbs/IMG_1058)

As folhas e flores do jambu apresentam sabor picante e causam leve formigamento e entorpecimento da língua, sendo que na medicina popular tem sido bem documentada a utilização para o tratamento da dor de dente (Torres et al., 2001), de afecções da garganta e bucais (aftas, herpes) (Nigrinis et al., 1986; Ramsewak et al., 1999; Torres et al., 2001), no tratamento de manchas da pele (Nigrinis et al., 1986) dentre outras aplicações. Os usos descritos na medicina popular e que não apoiados em evidências experimentais ou clínicas,

compreendem o uso da planta na forma de chá em que as folhas ou flores são utilizadas no tratamento da anemia, dispepsia, entre outros já citados anteriormente, visto que é considerado sialogogo e estimulante estomáquico (Favoreto e Gilbert, 2010). Outra forma de uso popular compreende na decocção das folhas em que é utilizada como diurético, tratamento de cálculos biliares e renais, afecções da pele e pulmão (expectorante e tônico em casos de tosses e bronquites) (Favoreto e Gilbert, 2010). Também pode ser utilizada no tratamento de disenterias e na culinária como salada crua, em que confere o sabor excitante e anestésico. Na forma de tinturas e xaropes das folhas e flores, e com uso descrito em farmacopeia apoiado estudos experimentais, o jambu é utilizado para tratamento da anemia e do escorbuto devido a presença de ferro e vitamina C (Cardoso e Garcia, 1997). Na forma de extrato possui atividade analgésica, anti-inflamatória, odontálgico e anti-infeccioso (Estrella, 1995).

Estudos científicos demonstraram que o gênero *Spilanthes* apresenta uma série de efeitos biológicos como atividade anestésica local (Ley et al., 2006), anti-inflamatória e analgésica (Chakraborty et al., 2004; Wu et al., 2008), anestésica e antipirética (Chakraborty et al., 2010), diurética (Ratnasooriya et al., 2004) e emagrecedora (Ekanem et al., 2007) os quais na sua grande maioria são atribuídos a presença de uma alquilamida denominada espilantol, a principal molécula bioativa da planta, que atinge sua maior concentração (1%) nas flores (Saraf et al., 2002; Ley et al., 2006). O espilantol é o principal composto pungente (Ratnasooriya et al., 2004) contido no jambu, o que confere o sabor refrescante e picante da planta. Além da atividade analgésica tópica observada em humanos (Nigrinis et al., 1986), Chakraborty e colaboradores (2004) observaram que o extrato aquoso de *Spilanthes Acmella* reduziu o edema de pata induzido por carragenina e a nocicepção no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos, indicando o efeito analgésico e anti-inflamatório após a administração sistêmica via intraperitoneal.

Segundo Boonen et. al (2010), as N-Alquilamidas são um grande grupo de moléculas bioativas encontradas em diversas plantas do gênero *Echinacea*, *Xanthoxylum* e *Spilanthes*. Neste mesmo raciocínio, tem-se explorado uma planta do gênero *Xanthoxylum* chamada Szechuan originária da Ásia, que de

modo semelhante à *Acmella oleracea* também é utilizada para o alívio da dor de dente devido suas propriedades anestésicas e não-irritantes que auxiliam no tratamento da dor. Apesar de ser chamada de pimenta Szechuan, suas características são contrastantes com àquelas associadas as pimentas da família *Capsicum*, as quais elicitam uma irritação aguda e dolorosa associada com a inflamação local tecidual e hipersensibilidade à dor, assim como sensação de dor em queimação como a observada nas pimentas chilli vermelhas. A ingestão da pimenta Szechuan sugere uma sensação bem definida de formigamento (parestesia) e dormência, características semelhantes às descritas para a *Acmella oleracea*, e estas percepções psicofísicas são consistentes com os locais celulares e moleculares identificados como alvos do hidroxí- α -sanshool (sanshool), principal composto bioativo da pimenta Szechuan. Estudos demonstraram que o possível mecanismo de ação do sanshool envolve a inibição de neurônios através de um mecanismo único envolvendo a inibição de três tipos de canais de potássio de dois poros sensíveis ao pH e a anestésicos denominados também como KCNK3, KCNK9 e KCNK18, provendo uma base para o entendimento das sensações psicofísicas únicas e complexas associadas às pimentas Szechuan (Bautista et al., 2008). Adicionalmente, Tsunosaki e colaboradores (2013) reportou que a propriedade analgésica do sanshool, também seja possivelmente devido a sua afinidade por canais de sódio voltagem-dependentes em fibras do tipo A δ mecanossensíveis reduzindo a excitabilidade e induzindo a analgesia.

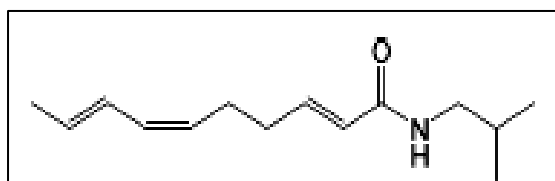


Figura 3: Estrutura química do spilanthol. (Wu L.C, Fan N.C, Lin M.H, Chu I.R, Huang S.J, Hu C.Y, Han S.Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes Acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators, J Agric Food Chem. ,56(7), p.2341-9, 2008)

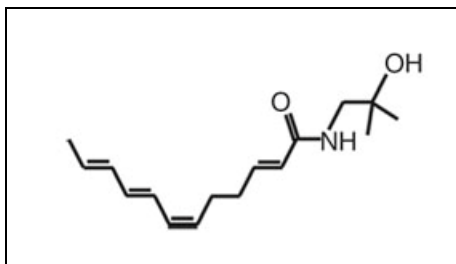


Figura 4: Estrutura química do hidroxi- α -sanshool. (Bautista, D.M., Sigal, Y. M., Milstein, A. D., Garrison, J. L., Zorn, J.A., Tsuruda, P. R., Nicoll, R. A., Julius, D. "Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels". Nat. Neurosci. v.11 (7), p.772–9, 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Diante do exposto e tendo em vista o uso popular da *Acmella oleracea* para o tratamento de afecções bucais e principalmente no alívio da dor de dente, este estudo teve como objetivo investigar a atividade antinociceptiva sistêmica do extrato etanólico (EEAO) bruto da *Acmella oleracea* e a atividade nociceptiva e antinociceptiva local (região orofacial) da fração rica em alquilamidas (FH), em modelos de dor em animais, através de estudos farmacológicos *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a toxicidade aguda e o possível efeito adverso, do extrato etanólico das flores de *Acmella oleracea*, na atividade locomotora dos animais no modelo de campo aberto.

Avaliar os efeitos da administração sistêmica do extrato etanólico das flores de *Acmella oleracea* nos seguintes modelos:

- nociceção aguda (orofacial) induzida pela injeção orofacial de formalina, capsaicina e cinamaldeído;
- hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina e com avaliação da atividade opioidérgica;
- alodinia mecânica induzida pela lesão parcial do nervo ciático;

Avaliar os efeitos da administração na região orofacial da fração rica em alquilamidas das flores de *Acmella oleracea*, investigando:

- irritação ocular no modelo de limpeza dos olhos;
- possíveis efeitos nociceptivos *per se* e antinociceptivos (analgésicos), avaliando alguns mecanismos de ação para cada modalidade;

3.0 Materiais e métodos

3.1 *Acmella oleracea* (L.)

A planta foi coletada no município de Cruzeiro do Sul, região do Alto Juruá, no estado do Acre, em agosto de 2010, e identificada pela MSc. Rosângela de Araújo Pereira Holanda e Souza, curadora do Herbário da Universidade Federal do Acre – Parque Zoobotânico (UFAC-PZ), onde se encontra depositado um exemplar da planta sob registro número 15099 como *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (bas. *Spilanthus oleracea*; syn. *Spilanthus acmella* var. *oleracea*).

3.1.1 Obtenção do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas

Flores frescas de *Acmella oleracea* (60 g) foram submetidas à extração com etanol absoluto sob refluxo por 3 h. O extrato etanólico da *Acmella oleracea* (EEAO) foi evaporado sobre pressão reduzida, resuspendido em água e liofilizado, resultando em 2,7 g.

Uma parte do extrato etanólico (1,7 g) foi resuspendido em etanol-água (1:1 v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, originando duas frações: EEAO-água e EEAO-hex. O fluxograma de obtenção e fracionamento do extrato etanólico das flores de *Acmella oleracea* pode ser visualizado na figura 5.

O extrato (EEAO) e a fração (FH) oriundos da *Acmella oleracea* foram preparados e fornecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

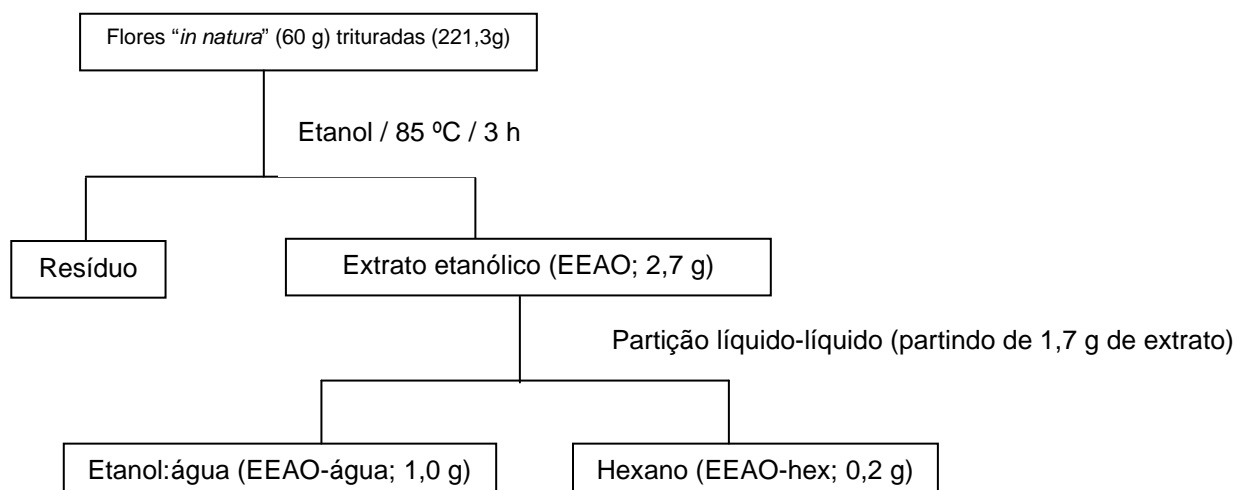


Figura 5: Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico e da fração hexânica oriundos das flores da *Acmella oleracea*.

3.1.2 Análise do extrato etanólico (EEAO) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O EEAO foi analisado em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC, Waters-Acquity) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA). A fração EEAO foi solubilizada em H₂O-MeOH (1:1 v/v), para uma concentração de 1 mg/mL, e 2 µL de amostra foi injetado no equipamento. A análise foi efetuada em uma coluna de fase reversa BEH-C18, com dimensões de 2,1 x 50 mm e tamanho de partícula de 1,7 µm, a uma temperatura de 60 °C. A fase móvel consistiu de 0,1% (v/v) de solução aquosa de ácido fórmico (eluente A) e metanol (eluente B). O seguinte sistema gradiente para a fase móvel foi utilizado: aumento da concentração do eluente B de 5% a 80% em 5 min, mantendo a 80% até 7 min, e retornando a 5% em 8 min, mantendo em 5% por mais 3 min para reequilibrar o sistema. A detecção foi realizada na faixa de 200-400 nm utilizando o detector de PDA ou, nas análises online, por espectrometria de massas. Esta última foi realizada por ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry), com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Quattro-LC, Waters). O modo de ionização positiva foi utilizada para detectar compostos com m/z de 100-600. Foram utilizadas energias de

2.6 kV no capilar e 70 V no cone. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) adultos, de ambos os sexos, com peso variando entre 25 a 35 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração comercial. Os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos e os experimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o número 544, e de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (Zimmermann, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito dos tratamentos.

3.3 Estratégias para a investigação dos efeitos biológicos das preparações vegetais da *Acmella oleracea* (L.)

Os procedimentos experimentais descritos abaixo foram empregados agudamente, sendo que o EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) foi administrado sistemicamente pela via intraperitoneal 30 min antes dos testes para investigar sua possível ação antinociceptiva em modelos de nocicepção química (formalina, capsaicina e cinamaldeído), térmica (placa quente) e neuropática (lesão parcial do nervo ciático).

Outra estratégia empregada foi investigar o efeito produzido pela administração local da fração hexânica (FH) (1 a 100 µg/20 µL) no lábio superior direito dos animais. Os efeitos analgésicos foram investigados utilizando modelos de nocicepção química (formalina e capsaicina) enquanto que para o efeito algico foram investigados alguns mecanismos envolvidos.

Antes da realização de todos os procedimentos comportamentais, os animais foram aclimatados individualmente por no mínimo 30 min ao ambiente onde foram realizados os testes.

3.3.1 Avaliação da toxicidade aguda, teste geral de atividades do EEAO e avaliação da atividade locomotora dos animais

No intuito de estudar se a administração do EEAO causaria possíveis efeitos tóxicos ou alterações comportamentais nos animais, estes foram divididos em 5 grupos que receberam pela via intraperitoneal veículo (salina + 30 μ L de tween 80, 10 ml/kg) ou doses crescentes de EEAO (5, 50, 500 e 5000 mg/kg). Imediatamente após os tratamentos, os animais foram observados em deambulação livre sobre uma superfície plana, sendo avaliados parâmetros comportamentais relacionados à estimulação ou depressão do sistema nervoso central (SNC), como atividade locomotora, piloereção, ptose palpebral, diurese, tremores, alterações respiratórias, cianose, ataxia, hipnose, convulsão, entre outros. Os animais foram observados 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min após os tratamentos e então diariamente durante 7 dias, observando-se quaisquer sinais de toxicidade ou mortalidade, segundo metodologia descrita por Litchfield e Wilcoxon (1949).

O efeito da administração do EEAO sobre a atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliado através do teste do campo aberto. Trinta min após tratamentos com veículo ou EEAO (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.), os animais foram colocados individualmente no interior do campo aberto, o qual consiste em um aparato circular (42 cm de diâmetro x 24 cm de altura) cujo assoalho é dividido em 19 quadrantes, distribuídos partindo do centro até a borda externa. Uma vez colocado no centro da arena, o animal iniciou o comportamento exploratório e o número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi contado durante 5 min (Tadaiesky et al., 2006; Marcon et al., 2009). Após o término de cada sessão, a arena foi limpa com uma solução de etanol 7% para minimizar o odor deixado pelo animal anterior.

3.3.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da administração sistêmica do EEAO

3.3.2.1 Nocicepção orofacial induzida pela formalina

A nocicepção química induzida pela injeção orofacial de formalina em camundongos seguiu o modelo proposto por Luccarini et al. (2006), com algumas modificações. Os animais foram separados em 4 grupos, os quais foram tratados pela via intraperitoneal com veículo (salina + 30 µL de Tween 80, 10 ml/kg) ou EEAO nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, i.p. Após 30 min, os camundongos receberam 20 µL de solução de formalina 2,5% (0.92% de formaldeído em salina) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Os camundongos foram observados durante 40 min, sendo o período de 0 a 5 min considerado como a fase I (neurogênica) e de 15 a 40 min a fase II (inflamatória), sendo que o tempo em que o animal permaneceu esfregando a região orofacial com as patas dianteiras foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção.

3.3.2.2 Nocicepção orofacial induzida pela capsaicina

A nocicepção química induzida pela injeção orofacial de capsaicina em camundongos seguiu o modelo proposto por Pelissier et al., (2002), com algumas modificações. Os animais foram separados em 4 grupos os quais foram tratados pela via intraperitoneal com veículo ou EEAO nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, i.p. Após 30 min, os camundongos receberam 20 µL de capsaicina (1,6 µg ou 5,2 nmol) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Os camundongos foram observados durante 5 min, sendo que o tempo em que o animal permaneceu esfregando a região orofacial com as patas dianteiras foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção.

3.3.2.3 Nocicepção orofacial induzida pelo cinamaldeído

Os animais foram separados em 4 grupos os quais foram tratados pela via intraperitoneal com veículo ou EEAO nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, i.p. Após 30 min, os camundongos receberam 20 μ L de cinamaldeído (13,2 μ g ou 100 nmol) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Os camundongos foram observados durante 5 min, sendo que o tempo em que o animal permaneceu esfregando a região orofacial com as patas dianteiras foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção.

3.3.2.4 Nocicepção térmica ao calor

O modelo da placa quente foi empregado para avaliar a hiperalgesia térmica ao calor, segundo metodologia proposta inicialmente por Garcia-Martinez et al. (2002). O aparato consiste de uma placa de metal circundada por tubo de acrílico (25 x 37 x 47 cm, Ugo Basile, Varese, Itália), a qual foi aquecida a temperatura de 55 \pm 1 $^{\circ}$ C. Os animais foram cuidadosamente colocados no aparato, sendo avaliada a latência (s) que os mesmos levaram para lambe as patas ou saltar da placa quente, estabelecendo-se o tempo de corte de 30 s (D'amour e Smith, 1941) para evitar possíveis lesões teciduais. Essa primeira medida foi considerada como a resposta basal ou tempo zero (antes de receberem os tratamentos).

3.3.2.4.1 Hiperalgesia térmica induzida pela administração intraplantar de capsaicina

Após a obtenção da latência basal (s), os animais foram separados em 5 grupos, que receberam pela via i.p. veículo ou EEAO nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg. Após 30 min dos tratamentos, os camundongos receberam uma injeção de 20 μ L de veículo (990 μ L de salina + 10 μ L de álcool etílico P.A) ou capsaicina (1,6 μ g ou 5,2 nmol) na superfície intraplantar (i.pl.). Transcorridos

5 min, os animais foram novamente avaliados no teste da placa quente nos intervalos de 5, 15, 30, 60 e 120 min. Reduções da latência (s) de lambida ou retirada da pata caracterizaram o aparecimento de hiperalgesia ao calor induzida pela capsaicina.

3.3.2.4.2 Envolvimento do sistema opioidérgico na hiperalgesia térmica ao calor

Após a obtenção da latência basal (s), os animais foram separados em 5 grupos, que receberam pela via i.p. veículo ou naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg) conforme metodologia descrita por Marcon et. al, 2009. Passados 20 min, os animais receberam morfina (agonista de receptores opióides, 1 mg/kg, s.c.) ou EEAO (100 mg/kg i.p). Transcorridos 30 min, os animais foram novamente avaliados no teste da placa quente nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 60 e 120 min. Reduções da latência (s) de lambida ou retirada da pata nos grupos tratados com naloxona caracterizaram o aparecimento de hiperalgesia ao calor.

3.3.2.5 Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático

A lesão parcial do nervo ciático é um modelo de neuropatia crônica a qual permite avaliar diferentes parâmetros nociceptivos, entre os quais a alodinia mecânica. O modelo de lesão parcial do nervo ciático foi realizado conforme a técnica descrita por Malmberg e Basbaum (1998). Os animais foram anestesiados com uma mistura contendo cetamina e xilasina (50 e 20 mg/kg, i.p, respectivamente) e após uma pequena incisão na região glútea do lado direito, a musculatura entre o íliaco e o músculo glúteo foram cuidadosamente divulsionadas para expor o nervo ciático. Com o auxílio da agulha de um fio cirúrgico de seda não absorvível 6-0, 1/3 a 1/2 do nervo ciático foi perfurado e amarrado com 3 nós, após o procedimento cirúrgico a incisão foi suturada com fio de seda 4-0.

No dia anterior à cirurgia, o limiar nociceptivo mecânico basal foi avaliado nos animais através da estimulação mecânica com o filamento de von Frey (0,6 g) (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA). Os animais foram

aclimatizados por no mínimo 1 h antes de cada medição, sendo colocados individualmente em um aparato elevado com paredes de vidro transparente (9 x 7 x 11cm) e piso de tela metálica para permitir o acesso a superfície plantar (ventral) da pata. A alodínia mecânica foi avaliada como a frequência de retirada da pata frente a 10 aplicações do filamento de von Frey de 0,6 g no centro da superfície plantar da pata traseira dos animais, por um período máximo de 10 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta nociceptiva de retirada da pata, seguida de lambida e/ou chacoalhar da mesma (Bortolanza et al., 2002). O teste foi repetido 3 vezes em intervalos de aproximadamente 3 min em cada pata, sendo que esta primeira avaliação representou a resposta basal dos animais.

Após 7 dias do procedimento cirúrgico, a sensibilidade mecânica plantar foi avaliada para confirmar o desenvolvimento da alodinia, de acordo com a metodologia descrita acima. Os animais foram separados em 5 grupos, que receberam pela via i.p. veículo, fluoxetina (antidepressivo inibidor seletivo da receptação de serotonina, 10 mg/kg, i.p.) ou EEAO (10, 30 ou 100 mg/kg). A alodinia mecânica foi avaliada em intervalos de 1 a 6 h após os tratamentos.

3.3.3 Avaliação dos efeitos da administração da FH

3.3.3.1 Instilação da FH no globo ocular

Para avaliar se a FH apresenta propriedades irritantes como a da capsaicina, foi empregado o teste de limpeza dos olhos (*eye wiping*), conforme metodologia descrita por De Petrocellis et al., 2010. Os animais foram divididos em 5 grupos, nos quais foi instilado no olho direito 5 µL de capsaicina (1 nmol) ou FH (10, 30, 50 ou 100 µg). Imediatamente após a instilação ocular, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Os camundongos foram observados durante 2 min, sendo que o número de movimentos de limpeza do olho foi considerado como indicativo de pungência e irritação.

3.3.3.2 Efeito da administração orofacial da FH

Para avaliar se a administração local da FH poderia promover efeitos considerados como nociceptivos ou antinociceptivos, foi realizado o modelo de nocicepção química induzida pela injeção orofacial da FH. Os animais foram separados em 8 grupos, os quais receberam veículo ou FH nas doses de 1; 3; 10; 30 ou 100 µg/20 µL no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Foi realizada uma curva dose e tempo resposta, sendo que os camundongos foram observados em blocos de 10 min, durante 30 min e o tempo em que o animal permaneceu esfregando a região orofacial com as patas dianteiras foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção.

Para analisar possíveis efeitos da administração de doses ainda menores, a FH 0,01 e 0,1 µg/20 µL ou veículo, foram administrados na região orofacial conforme descrito anteriormente, porém o tempo de observação comportamental foi de apenas 10 min.

3.3.3.3 Avaliação do efeito antinociceptivo da administração orofacial da FH

Após a realização das curvas dose-efeito e tempo-resposta da administração orofacial da FH, foi observado que a injeção nas doses menores 0,01, 0,1 e 1 µg não promoveram resposta nociceptiva *per se*. Dessa maneira, a dose de 1 µg foi selecionada para investigar o possível efeito antinociceptivo da FH. Primeiramente, o efeito antinociceptivo da FH 1 µg foi avaliado no teste da formalina, conforme descrito anteriormente. Os animais receberam uma injeção da FH (1 µg/10 µL) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Passados 10 ou 30 min da injeção da FH, os animais receberam uma injeção de formalina 2,5%/10 µL (0,92% de formaldeído em salina) no mesmo local. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45^o para facilitar a observação. Os camundongos foram

observados durante 40 min, sendo o período de 0 a 5 min considerado como a fase I (neurogênica) e de 15 a 40 min a fase II (inflamatória), sendo que o tempo em que o animal permaneceu esfregando a região orofacial com as patas dianteiras foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção.

O segundo teste empregado foi o modelo de nocicepção química induzida pela injeção orofacial de capsaicina, conforme descrito anteriormente. Os animais receberam veículo (10 μL), capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) ou FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Para avaliar o possível efeito antinociceptivo, 2 grupos de animais foram pré-tratados com FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), 10 ou 30 min antes da injeção orofacial de capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$). Outro grupo de animais foi pré-tratado com a FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas e 10 min após, recebeu uma injeção orofacial de capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) no lado contralateral (lábio superior esquerdo próximo à região das vibrissas). Imediatamente após a injeção, os animais foram observados durante 5 min conforme mencionado anteriormente.

3.3.3.4 Avaliação do efeito nociceptivo da administração orofacial da FH

Após a realização das curvas dose-efeito e tempo-resposta da administração orofacial da FH, foi observado que a injeção de doses maiores como 3; 10; 30 e 100 μg promoveram respostas nociceptivas. Dessa maneira, a dose de 30 μg foi selecionada para investigar possíveis mecanismos envolvidos no efeito nociceptivo da FH.

3.3.3.5 Envolvimento do sistema/componente opioidérgico e inflamatório na nocicepção orofacial induzida pela FH

Primeiramente, foi avaliado se a nocicepção orofacial induzida pela FH seria reduzida pelo tratamento com morfina. Os animais foram pré-tratados com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides 10 e 100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas. Passados 10 ou 30 min, os animais receberam FH 30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ no mesmo local.

De maneira similar, para investigar a participação do componente inflamatório, os animais foram pré-tratados com cetoprofeno (anti-inflamatório não-esteroidal, 100 µg/10 µL) no lábio superior direito próximo à região das vibrissas e após 30 min receberam FH 30 µg/10 µL no mesmo local. Imediatamente após a injeção da FH, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45° e foram observados por 10 minutos.

3.3.3.6 Envolvimento de canais TRPs e canais de potássio na nocicepção orofacial induzida pela FH

Os animais foram pré-tratados com vermelho de rutênio (bloqueador não seletivo de canais de cálcio e TRP, 0,3 ou 1 nmol/10 µL), HC-030031 (antagonista seletivo de receptores TRPA1, 100 µg/10 µL), glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (60 µg/10 µL) ou tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canais de potássio) (30 e 100 µg/10 µL). Transcorridos 10 ou 30 min, os animais receberam FH 30 µg/10 µL no mesmo local. Imediatamente após a injeção da FH, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, com espelhos posicionados em um ângulo de 45° e foram observados por 10 e 30 minutos.

3.4 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), exceto os valores de DI50 (doses do EEAO que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI50 foram obtidos através do método de regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 5.0. Para a análise de dois grupos independentes, a diferença estatística foi determinada através do teste t de Student. Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Quando necessário, os dados do tratamento com o EEAO

foram analisados utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando $P < 0,05$.

5.0 Resultados

5.1 Análise em Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC)

N-alquilamidas são um grupo de metabólitos encontrados em *Acmella oleracea*, sendo o espilantol sendo o principal componente. Elas têm sido relacionadas às propriedades anestésica e analgésica da planta (Ley *et al.*, 2006; Ratnasooriya e Pieris, 2005). A presença de *N*-alquilamidas no extrato etanólico de flores de *Acmella oleracea* (fração EEAO foi investigada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) e espectrometria de massas (ESI-MS). Em comparação com Boonen *et al.* (2010), três *N*-alquilamidas foram identificadas com base em seus perfis de absorção em UV e de m/z : pico 1 com $R_t = 4,64$ min, $m/z = 230$ $[M+H]^+$, e $\lambda_{\max} = 259$ nm [(2*E*,4*Z*)-*N*-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida)]; pico 2 com $R_t = 5,15$ min, $m/z = 222$ $[M+H]^+$, e $\lambda_{\max} = 233$ nm [(2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida), espilantol]; e pico 3 com $R_t = 5,41$ min, $m/z = 236$ $[M+H]^+$, e $\lambda_{\max} = 261$ nm [(2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida)]. Nossos resultados demonstraram que o espilantol é a principal *N*-alquilamida presente na fração EEAO, conforme observado na figura 3.

As *N*-alquilamidas são compostos apolares, solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio e o hexano. Deste modo, a partição líquido:líquido da fração EEAO entre etanol-água (1:1 v/v) e hexano, permite a concentração destes compostos na fração hexânica.

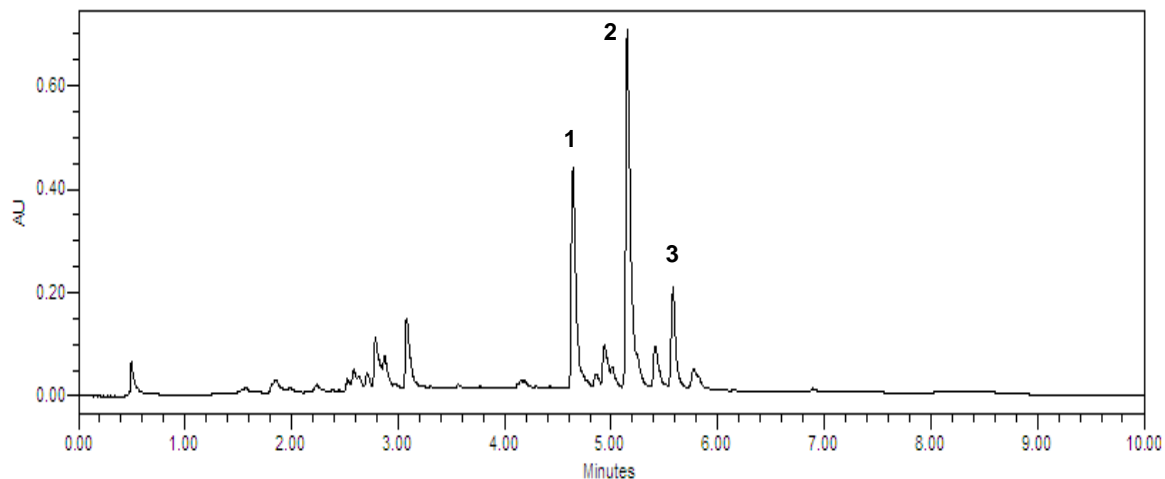


Figura 6: Perfil cromatográfico da fração EEAO em UPLC, com detecção em λ 250 nm. Picos correspondentes a: 1= [(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida]; 2: [(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida), **espilantol e 3: [(2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida)].**

4.2 Estudos com o Extrato Etanólico das flores de *Acmella oleracea* (EEAO)

4.2.1 Avaliação da toxicidade aguda, teste de atividades gerais do EEAO e avaliação da atividade locomotora dos animais

Para estabelecer a segurança do EEAO, a toxicidade aguda foi primariamente avaliada através do teste geral de atividades. A administração intraperitoneal de EEAO nas doses de 5 e 50 mg/kg não apresentaram sinais clínicos de toxicidade significativos e nenhuma morte ocorreu. Na dose de 500 mg/kg, nos primeiros 180 min após a aplicação, todos os animais apresentaram redução na locomoção, 2 animais apresentaram contorções abdominais nos primeiros 30 min e 4 animais apresentaram piloereção nos primeiros 60 min, porém nenhuma morte foi detectada. Todos os animais tratados com a dose de 5000 mg/kg apresentaram convulsão e depressão respiratória e foram a óbito em menos de 3 min, sendo o valor estimado da DL50 de 889 mg/kg (intervalo de confiança 95%: 740,95 – 1066,97 mg/kg).

Adicionalmente, o tratamento dos animais com o EEAO nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg i.p., não promoveu alterações significantes sobre a

atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, quando comparados ao grupo veículo (Figura 7).

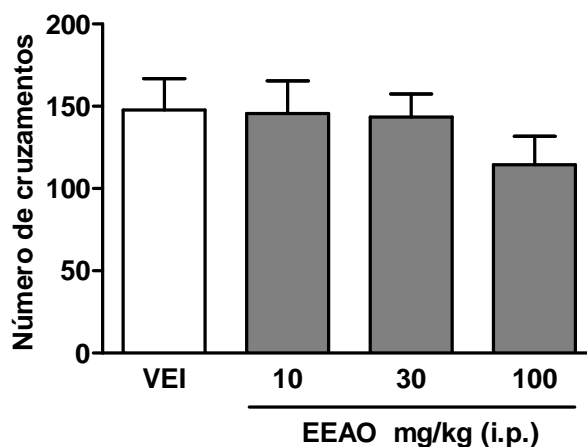


Figura 7: Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) sobre a atividade locomotora no modelo de campo aberto em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n = 5 a 7 animais). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newman-Keuls.

4.2.2 Nociceção orofacial induzida pela injeção de formalina

O modelo da formalina permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). Os resultados descritos na figura 8 (A e B) demonstram que a formalina induz comportamento nociceptivo, aferido como tempo que o animal permanece esfregando a face, por aproximadamente 101 segundos na primeira fase - neurogênica (primeiros 5 minutos após aplicação de formalina) e aproximadamente 212 segundos na segunda fase - inflamatória (de 15 a 40 minutos após a injeção de formalina). A figura 8 (A e B) demonstra que todas as doses testadas do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg, i.p) promoveram antinociceção tanto na primeira quanto na segunda fase de maneira estatisticamente significativa, quando comparado ao controle. Na primeira fase o EEAO nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (i.p) reduziram o comportamento nociceptivo em 34 ± 6 , 35 ± 3 e $41 \pm 8\%$ respectivamente (Figura 8A) e na segunda fase as mesmas doses reduziram de maneira dose-dependente o comportamento nociceptivo dos animais, apresentando valores de inibição de

24 ± 9, 54 ± 10 e 92 ± 4 % respectivamente (Figura 8B) sendo determinado o valor de DI50 (limite de intervalo de confiança de 95%) de 28,6 (20,6 – 39,7) mg/kg.

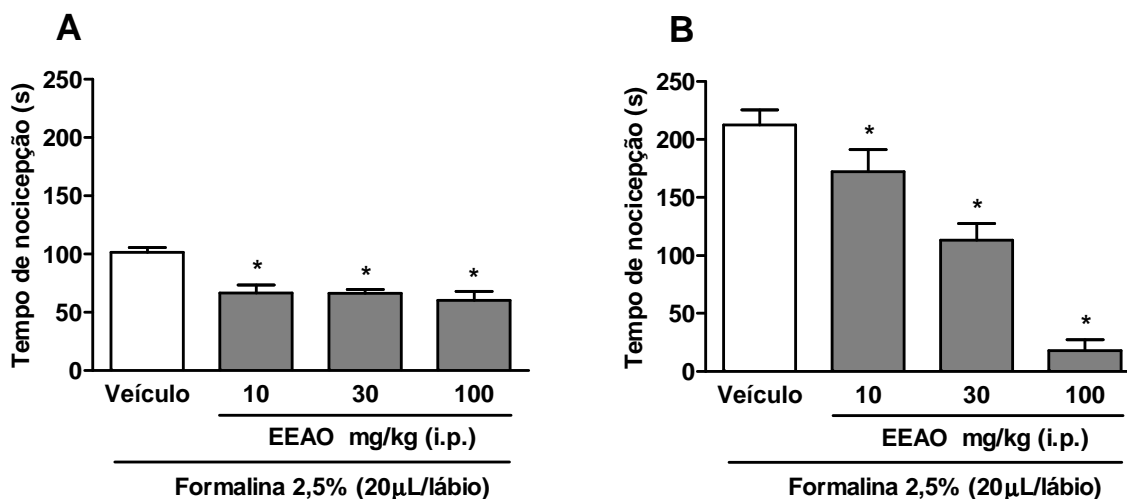


Figura 8: Efeito do EEAO sobre a nociceção induzida por formalina 2,5% em camundongos. A nociceção foi avaliada na primeira fase (0-5 min, painel A) e na segunda fase (15-30 min, painel B). Os resultados estão expressos como médias ± EPM (n = 8-10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newman-Keuls. Asteriscos denotam P < 0,05 quando comparado ao grupo controle (veículo).

4.2.3 Nociceção orofacial induzida pela injeção de capsaicina

Conforme demonstrado na figura 9, a injeção de capsaicina (5,2 nmol/lábio) induziu um comportamento nociceptivo em torno de 42 s, sendo que o EEAO (30 e 100 mg/kg i.p) foi capaz de reduzir este comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina, de maneira significativa, em 65 ± 9 e 69 ± 6 %, respectivamente. O EEAO (10 mg/kg i.p) não reduziu o comportamento nociceptivo, não sendo diferente estatisticamente quando comparado ao grupo controle.

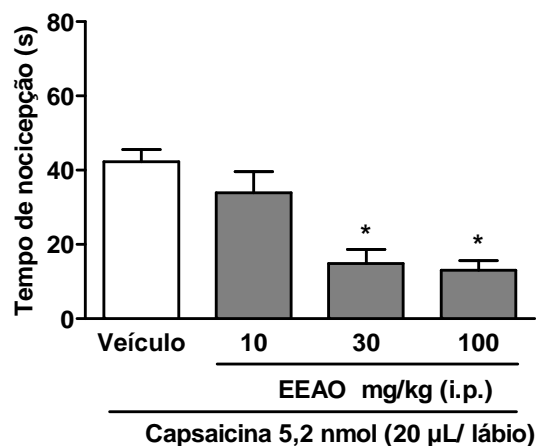


Figura 9: Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) no modelo de nociceção orofacial induzida pela capsaicina (5,2 nmol/lábio) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 9-11 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.4 Nociceção orofacial induzida pela injeção de cinamaldeído

De modo similar à nociceção induzida pela capsaicina, a injeção no lábio superior direito dos animais de cinamaldeído (100 nmol/lábio) induziu comportamentos nociceptivos em torno de 63 s, sendo que o EEAO (30 e 100 mg/kg i.p) reduziu o comportamento nociceptivo induzido pela administração de cinamaldeído de forma dose-dependente em 50 ± 6 e $70 \pm 9\%$, respectivamente (Figura 10), sendo determinado o valor de DI50 (limite de intervalo de confiança de 95%) de 40 (26 – 62) mg/kg. O EEAO (10 mg/kg i.p) não foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo quando comparado ao grupo controle.

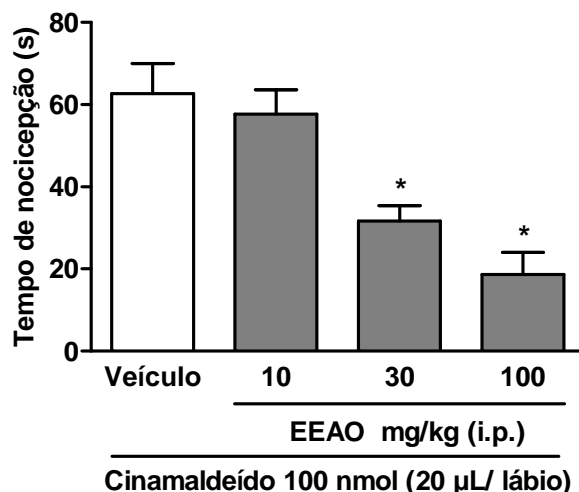


Figura 10: Efeito da administração intraperitoneal do EEO (10, 30 e 100 mg/kg) no modelo de nociceção orofacial induzida pelo cinamaldeído (100 nmol/lábio) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 11 a 14 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (veículo).

4.2.5 Nociceção térmica ao calor

4.2.5.1 Hiperalgisia térmica induzida pela administração intraplantar de capsaicina

Na avaliação da hiperalgisia térmica ao calor (placa quente) induzida pela capsaicina, a latência basal de retirada de pata dos animais foi em torno de 10 s, e do mesmo modo o grupo veículo-veículo se manteve nesta média durante todo o experimento. Após a injeção de capsaicina, essa latência foi reduzida para aproximadamente 5 s nos tempos de 15 e 30 min. Por outro lado a dose do EEO 100 mg/kg aumentou de forma significativa a latência de retirada da pata nos tempos 5, 15 e 30 min, demonstrando efeito anti-hiperalgésico neste teste. Do mesmo modo, o EEO nas doses de 10 e 30 mg/kg i.p também aumentaram a latência nos tempos 15 e 30 min, respectivamente (Figura 11).

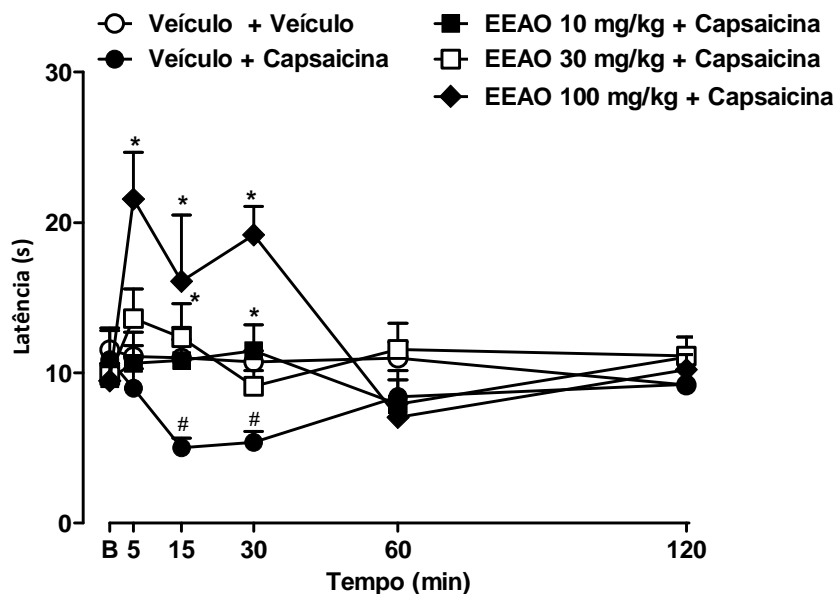


Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal do EEAO (10, 30 e 100 mg/kg) na hiperalgesia térmica ao calor (placa quente) induzido pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 6 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (veículo-veículo) e cerquilhas denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo-veículo.

4.2.5.2 Envolvimento do sistema opioide na hiperalgesia térmica ao calor

Na avaliação da reatividade ao estímulo térmico (placa quente) e o possível envolvimento de receptores opióides, foi observado que os animais que receberam veículo não apresentaram alterações significantes na resposta ao estímulo térmico da placa quente. Por outro lado, o EEAO na dose de 100 mg/kg i.p aumentou a latência de retirada da pata em 31% e 51% somente nos primeiros 10 e 15 min, respectivamente após o tratamento (Figura 12). A droga opióide padrão utilizada como controle positivo foi a morfina (1 mg/kg s.c.) a qual também aumentou o tempo de latência em 41, 69 e 71% nos tempos 10, 15 e 30 min, respectivamente, após o tratamento. Por outro lado, a naloxona 1 mg/kg, i.p (antagonista não seletivo de receptores opióides) foi efetiva em reverter a antinocicepção causada pela morfina (1 mg/kg, s.c.) nos tempos de

10, 15 e 30 min. Contudo, a naloxona foi efetiva em reverter a antinocicepção causada pelo EEAO somente no tempo de 30 min (Figura 12).

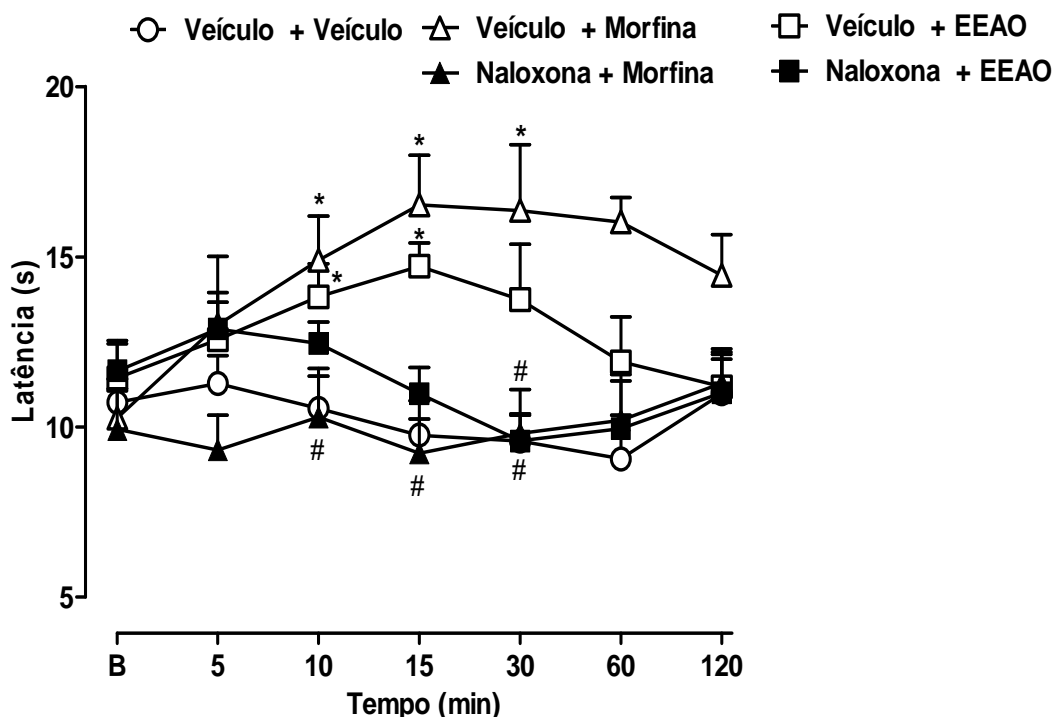


Figura 12: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EEAO (100 mg/kg, i.p.) no modelo de hiperalgesia térmica ao calor (placa quente) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 6 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de duas via seguido pelo teste de Bonferroni. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (veículo) e cerquilhas denotam $P < 0,05$ quando comparado à morfina e ao EEAO.

4.2.6 Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático

Previamente a cirurgia, a frequência de retirada de pata dos animais frente a 10 estimulações com o filamento de von Frey de 0,6 g foi em torno de 13% (B). Após a cirurgia de constrição parcial do nervo ciático, os animais passaram a responder as estimulações, alcançando cerca de 86% de frequência de retirada da pata, caracterizando o aparecimento de alodinia mecânica. A administração de EEAO (100 mg/kg i.p) diminuiu significativamente a alodínia mecânica em $49 \pm 12\%$, $60 \pm 15\%$ e $58 \pm 14\%$ nos tempos de 1, 2 e 3 h respectivamente, após o tratamento (Figura 13). Na dose de 30 mg/kg, o EEAO foi capaz de reduzir a alodinia mecânica somente 1

h após o tratamento ($46 \pm 17\%$). Finalmente, o tratamento dos animais neuropáticos com a fluoxetina (controle positivo), também reduziu a alodinia mecânica em $66 \pm 10\%$, $61 \pm 15\%$ e $45 \pm 10\%$, 1, 2 e 3 h após o tratamento, respectivamente.

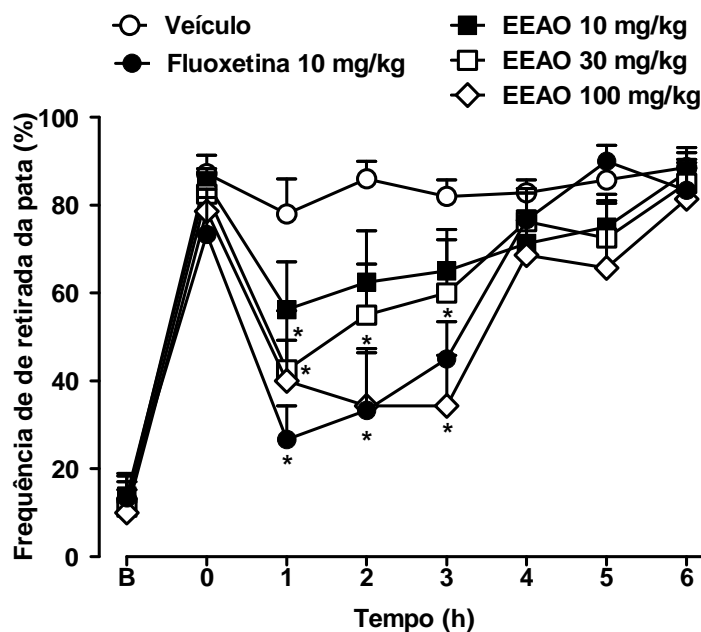


Figura 13: Efeito da administração intraperitoneal do EEO (10, 30 e 100 mg/kg) sobre a alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM ($n= 10$ a 15 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de duas via seguido pelo teste de Bonferroni. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.3 Estudos com a Fração Hexânica das Flores do Jambu (FH)

A FH, purificada e obtida a partir do EEO (figura 6) que é rica em alquilamidas, concentrou ainda mais esses compostos, os quais são os compostos ativos mais estudados, tais como o espilantol, o qual tem demonstrado ser o possível responsável pelas propriedades anestésicas e anti-inflamatórias (Ley et al., 2006; Wu et al., 2008) quando as flores da planta são mascadas. Assim, para caracterizar o(s) possível(is) efeito(s) local(is) da FH, a mesma foi administrada localmente nos camundongos.

4.3.1 Instilação da FH no globo ocular

Conforme a figura 14 é possível observar que os camundongos apresentaram comportamento de limpeza dos olhos após a instilação de capsaicina (0,3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) diretamente no globo ocular, apresentando cerca de 41 movimentos de limpeza (coçar os olhos). Este resultado confirmou que a instilação de capsaicina 0,3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ promove irritação ocular, conforme dados da literatura (Nassini et al., 2011). Com a instilação da FH nas doses de 10 e 30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$, observou-se um comportamento de limpeza de 6 e 13 movimentos, respectivamente, sendo que as doses crescentes de 50 e 100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ apresentaram 43 e 55 movimentos de limpeza, respectivamente.

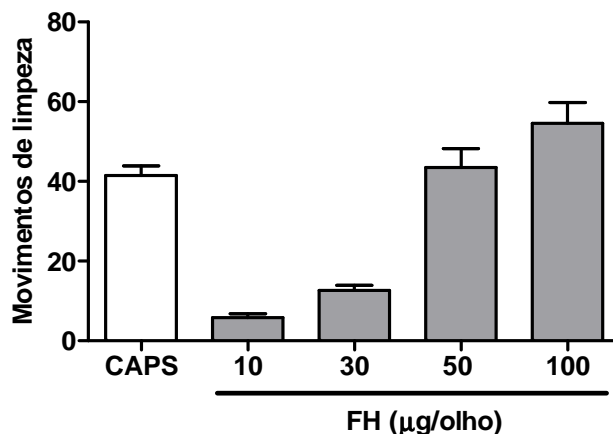


Figura 14: Efeito da instilação de 5 μL de capsaicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{olho}$) e da FH (10-100 $\mu\text{g}/\text{olho}$) na conjuntiva sobre o movimento de limpeza dos olhos de camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM do número de movimentos de limpeza dos olhos avaliados durante 2 min após as aplicações (n= 5 a 6 animais).

4.3.2 Efeito da administração da FH na região orofacial

As figuras 15 A e B demonstram o comportamento resultante da administração orofacial de doses crescentes da FH (0,01 – 100 $\mu\text{g}/\text{láblio}$), avaliados 10, 20 e 30 min após as administrações. Conforme a figura 15 A, os animais do grupo controle que receberam o veículo (salina + 30 μL de tween 80) não manifestaram comportamentos nociceptivos significativos, esfregando a região injetada por 8,0; 9,2 e 2,7 s, nos tempos de 10, 20 e 30 min

respectivamente. Por outro lado, a FH (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/lábio}$) promoveu comportamento nociceptivo pronunciado nos primeiros 10 min (31; 24; 40 e 66 s, respectivamente) decaindo nos tempos de 20 e 30 min. A dose de 1 $\mu\text{g/lábio}$, de modo semelhante ao controle (salina), não induziu comportamentos nociceptivos nos tempos indicados.

Em um segundo experimento, avaliando o comportamento nociceptivo dos animais apenas nos primeiros 10 min (Figura 15 B), as doses menores da FH (0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g/lábio}$) também não promoveram respostas nociceptivas e não diferiram do grupo veículo (10 s). Uma vez que a dose de 1 $\mu\text{g/lábio}$ da FH não diferiu do controle (veículo), a mesma foi selecionada para o prosseguimento nos experimentos subsequentes.

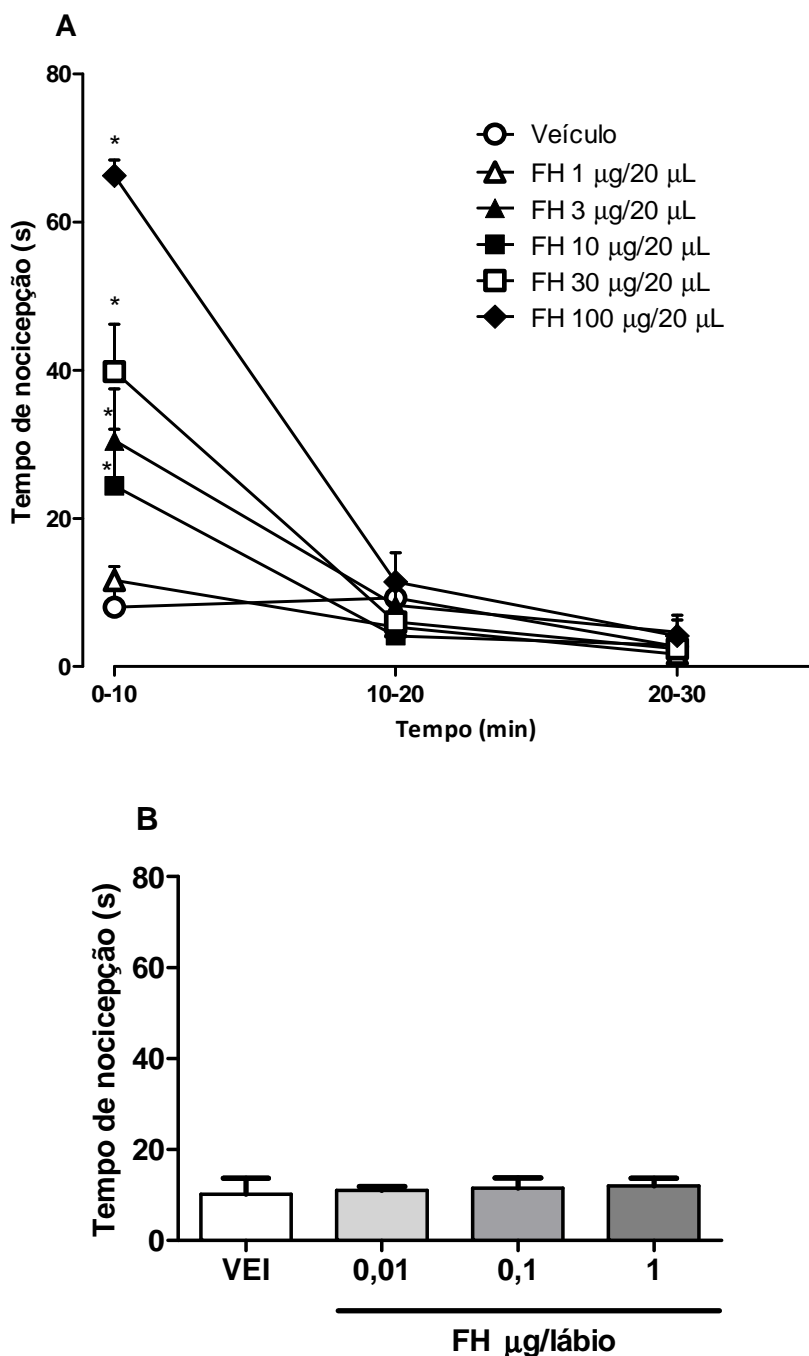


Figura 15: Curvas tempo e dose resposta da administração local da FH (0,01-100 µg/lábio) na região orofacial de camundongos. (A) Curva tempo e dose resposta da administração local de veículo ou FH (1-100 µg/lábio) contabilizados em 10, 20 e 30 min após os tratamentos. (B) Curva dose resposta da administração local da FH (0,01; 0,1 e 1 µg/lábio) contabilizados durante 10 min após os tratamentos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM do tempo em s de execução dos comportamentos nociceptivos (n= 7 a 12 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni e ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (salina+ tween 80).

4.3.3 Avaliação do efeito antinociceptivo da administração orofacial da FH

4.3.3.1 Nocicepção induzida pela injeção orofacial de formalina em camundongos

A figura 16 (A e B) mostra que a administração de formalina na região orofacial induziu comportamentos nociceptivos em torno de 81 s e de 169 s, na primeira e segunda fase, respectivamente. O pré-tratamento com a FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 10 ou 30 min antes da injeção de formalina aboliu a nocicepção na primeira fase (neurogênica) com valores de inibição de $91 \pm 4\%$ (10 min) e $90 \pm 3\%$ (30 min) (Figura 16A). De maneira similar, a segunda fase (inflamatória) foi reduzida em $80 \pm 2\%$ (10 min) e $59 \pm 8\%$ (30 min) (Figura 16B).

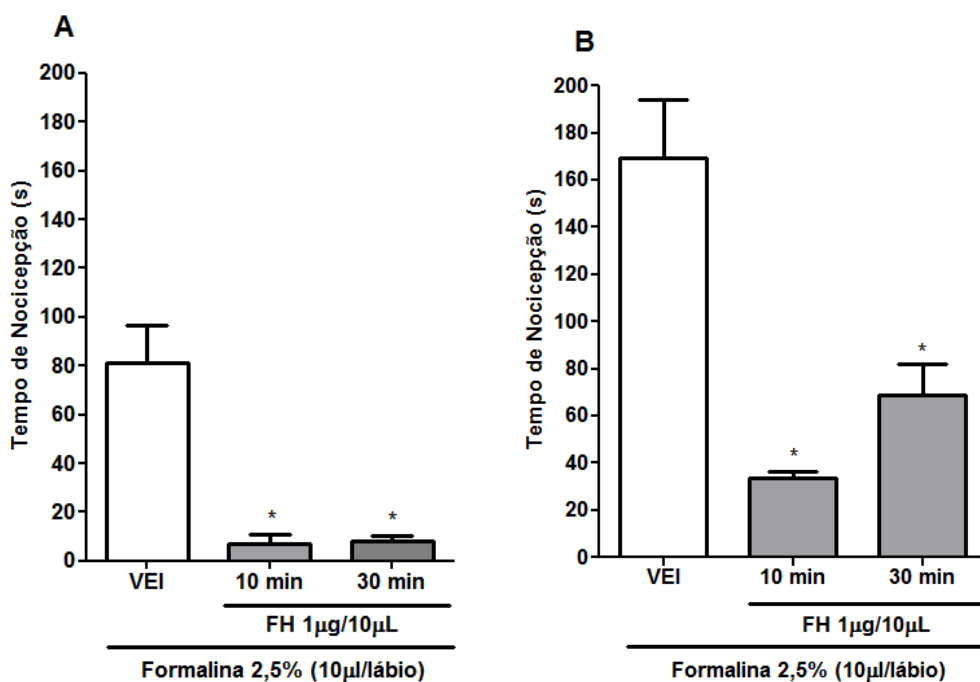


Figura 16: Efeito do pré-tratamento (10 e 30 min) da administração orofacial da FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina (2,5%) orofacial em camundongos. A nocicepção foi avaliada na primeira fase (0-5 min, painel A) e na segunda fase (15-40 min, painel B). Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 5 a 6 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

Tendo em vista o pronunciado efeito antinociceptivo promovido pela FH 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ no teste de formalina orofacial, foi realizado um experimento adicional (Figura 17). A lidocaína (0,2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), um anestésico local clássico, foi administrada no lábio superior direito dos animais 30 min antes da administração orofacial de formalina (2,5%/10 μL). A lidocaína reduziu significativamente a primeira fase em 85% e a segunda fase em 30%, quando comparada ao grupo controle (Figura 17).

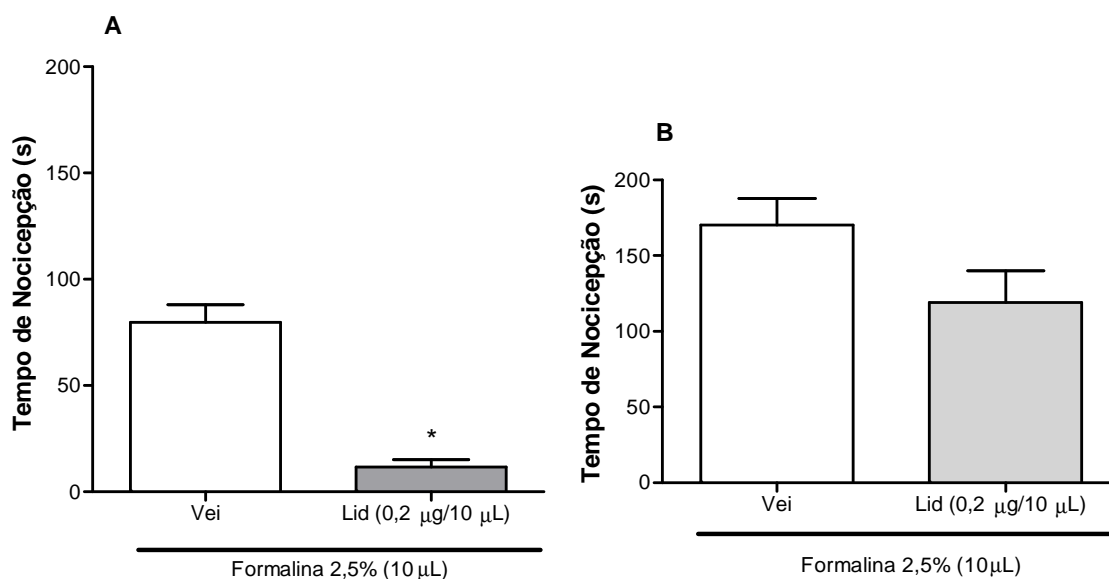


Figura 17: Efeito da administração orofacial local da lidocaína (Lid) (0,2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) na fase neurogênica (A) e fase inflamatória (B) da nociceção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM do tempo em s de execução dos comportamentos nociceptivos avaliados durante 5 min na fase I (A) e 25 min na fase II (B) do teste da formalina (n= 5 a 6 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando o teste T de Student. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (Vei).

4.3.3.2 Nociceção induzida pela injeção orofacial de capsaicina em camundongos

O tratamento dos animais com veículo ou FH (1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) no lábio superior direito dos camundongos não induziu comportamentos nociceptivos *per se*, diferente do observado com a capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$). Contudo, o pré-tratamento com a FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), 10 ou 30 min antes da injeção de

capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), reduziu significativamente a nocicepção em $91 \pm 4\%$ e $86 \pm 6\%$, respectivamente (Figura 18A). De maneira similar, o pré-tratamento com FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) na região orofacial do lado esquerdo, 10 min antes da injeção orofacial de capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) do lado direito também reduziu a nocicepção em $81 \pm 4\%$ (Figura 18B).

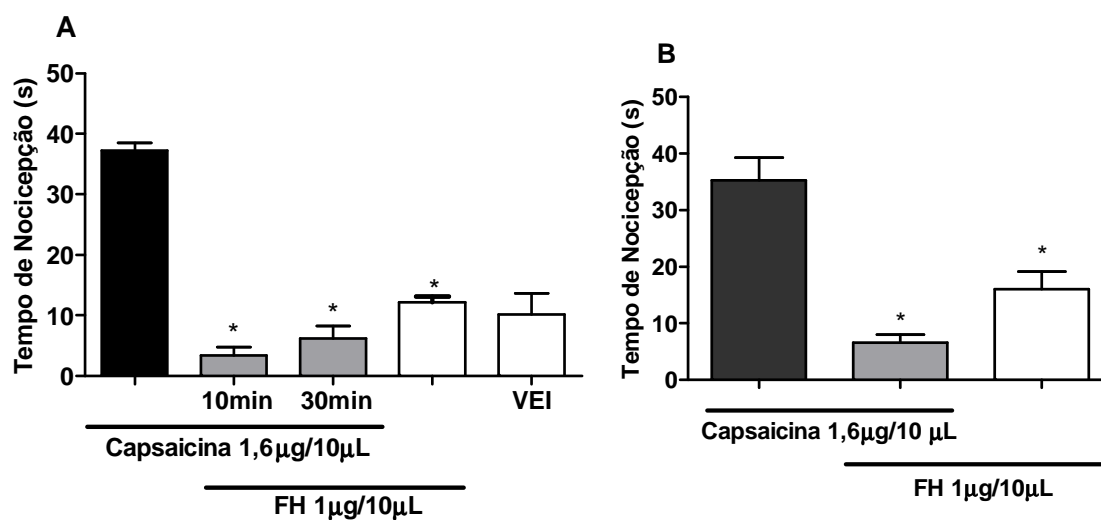


Figura 18: Efeito da administração local da FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) no modelo de nocicepção orofacial induzida pela capsaicina (1,6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) em camundongos. (A) Efeito da administração local ipsilateral da FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) e (B) Efeito da administração local contralateral da FH (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$). Os resultados estão expressos como médias \pm EPM do tempo em s de execução dos comportamentos nociceptivos avaliados durante 5 min após os tratamentos (n= 4 a 7 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (veículo).

4.3.4 Avaliação do efeito nociceptivo da administração orofacial da FH

4.3.4.1 Envolvimento do sistema/componente opioidérgico e inflamatório na nocicepção orofacial induzida pela FH

Conforme a análise da curva dose-efeito e tempo-resposta representado na figura 15, foi possível observar que a administração da FH nas doses de 3; 10; 30 e 100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ promoveram respostas nociceptivas. Desta forma a dose de 30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ foi selecionada para prosseguimento dos experimentos seguintes. Os animais que receberam a FH 30 $\mu\text{g}/\text{láblio}$ exibiram 46 s de

comportamento nociceptivo, sendo que o pré-tratamento com a dose mais baixa de morfina (10 µg/10 µL), 10 min e 30 min antes da administração da FH, apresentaram 62 s e 38 s de comportamento nociceptivo, respectivamente. Em contrapartida, o pré-tratamento com a dose maior de morfina (100 µg/10 µL), 30 min antes da FH, reduziu de forma significativa o comportamento nociceptivo dos animais em 78 % (Figura 19A).

Em adição, o pré-tratamento com o anti-inflamatório não esteroideal cetoprofeno (100 µg/10 µL), 10 min antes da FH, não reduziu a nocicepção induzida pela da FH (30 µg/10 µL).

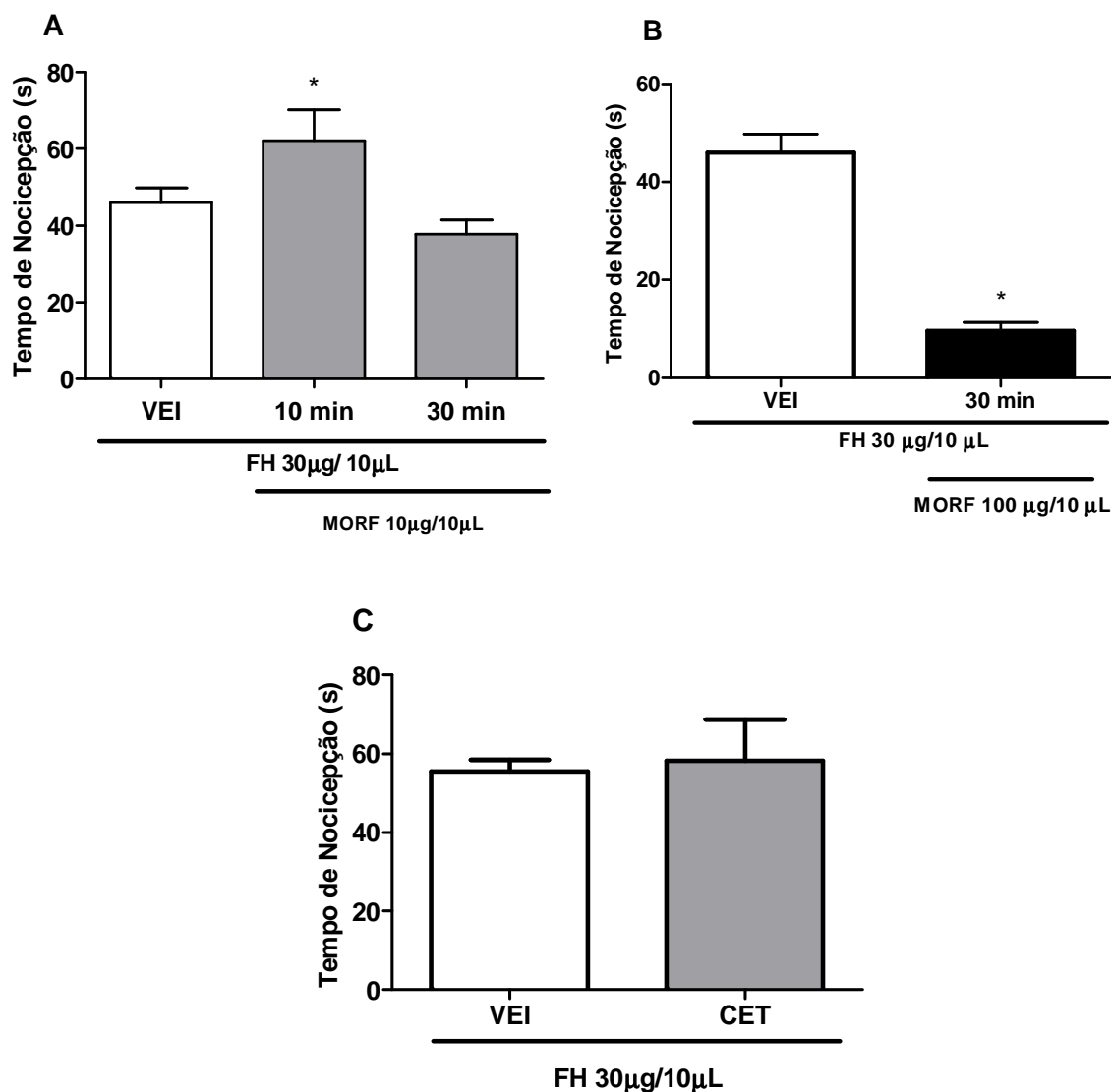


Figura 19: Efeito do pré-tratamento com morfina e cetoprofeno sobre a nociceção orofacial induzida pela FH (30 µg/10 µL) em camundongos. (A) Efeito do pré-tratamento com morfina (10 µg/10 µL) sobre a nociceção orofacial induzida pela FH (30 µg/10 µL) com tempo de pré-tratamento de 10 e 30 min. (B) Efeito do pré-tratamento com morfina (100 µg/10 µL) sobre a nociceção orofacial induzida pela FH (30 µg/10 µL) com tempo de pré-tratamento de 30 min. (C) Efeito do pré-tratamento com cetoprofeno (100 µg/10 µL) sobre a nociceção orofacial induzida pela FH (30 µg/10 µL) com pré-tratamento de 10 min. Os resultados estão expressos como médias ± EPM do tempo em s de execução dos comportamentos nociceptivos avaliados durante 10 min após os tratamentos (n= 6 a 10 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Asteriscos denotam $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

4.3.4.2 Envolvimento de canais iônicos na nocicepção orofacial induzida pela FH

Com a finalidade de avaliar o possível envolvimento de canais iônicos na atividade nociceptiva da FH, alguns bloqueadores e antagonistas foram testados, conforme demonstrado na figura 20. Assim, os animais foram pré-tratados com: tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canais de potássio) (30 e 100 µg/10 µL), glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})) (60 µg/10 µL), vermelho de rutênio (bloqueador não seletivo de canais de cálcio e TRP, 0,3 ou 1 nmol/10 µL) e HC-030031 (antagonista seletivo de receptores TRPA1, 100 µg/10 µL), no lábio superior direito próximo à região das vibrissas 10 min antes da injeção orofacial da FH (30 µg/10 µL). Nenhum pré-tratamento modificou e apresentaram comportamento nociceptivo de 52; 42; 58 e 57 s, respectivamente. Assim, um segundo experimento foi realizado com o aumento de doses de alguns bloqueadores e tempo de pré-tratamento de 30 min para cada droga testada, conforme demonstrado na figura 20B. O TEA (30 e 100 µg/10 µL), glibenclamida 60 mg/10 µL, vermelho de rutênio (0,3 e 1 nmol/10 µL) e o HC-030031 (100 µg/10 µL) apresentaram tempo de nocicepção de 54 e 65 s; 51 s; 58 e 44 s e 54 s, respectivamente.

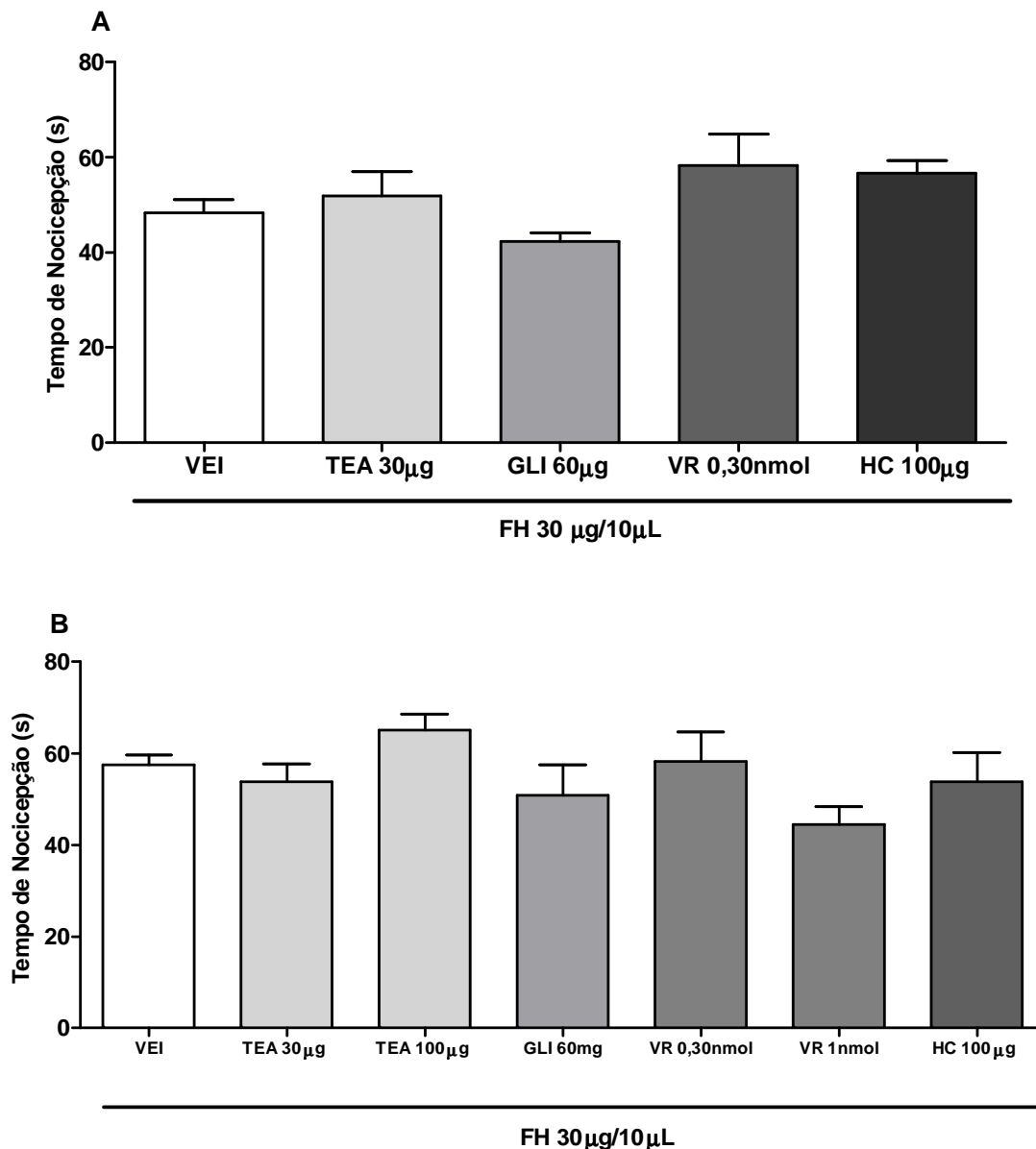


Figura 20: Efeito do pré-tratamento com bloqueadores e antagonistas de canais iônicos sobre a nociceção induzida pela FH (30 µg/10 µL) em camundongos. (A) Os animais foram pré-tratados com bloqueadores de canal de potássio (glibenclamida (GLI) e tetraetilamônio (TEA)), bloqueador não seletivo de canais de cálcio e do receptor TRPV1 (vermelho de rutênio (VR)) e antagonista seletivo do receptor TRPA1 (HC-030031) sobre a nociceção induzida pela FH (30 µg/10 µL) com tempo de pré-tratamento de 10 min. (B) Influência de bloqueadores de canal de potássio (glibenclamida (GLI) e tetraetilamônio (TEA)), bloqueador não seletivo de canais de cálcio e do receptor TRPV1 (vermelho de rutênio (VR)) e antagonista seletivo do receptor TRPA1 (HC-030031) sobre a nociceção induzida pela FH (30 µg/10 µL) com tempo de pré-tratamento de 30 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM do tempo em s de execução dos comportamentos nociceptivos avaliados durante 10 e 30 min após os tratamentos e administração orofacial da FH (30 µg/10 µL) (n= 5 a 7 animais). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5. Discussão

Como visto anteriormente, muito se tem utilizado das folhas e flores da *Acmella oleracea* na medicina popular, mais especificamente para o tratamento de afecções bucais e da garganta - aftas, herpes (Nigrinis et al., 1986; Ramsewak et al., 1999; Torres et al., 2001) assim como para o alívio da dor de dente (Torres et al., 2001; Chakraborty et al., 2010). Além disso, amplas evidências e estudos demonstram uma possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Acmella oleracea* (Ong et al., 2011; Chakraborty et al., 2010; Wu et al., 2008; Chakraborty et al., 2004), porém apenas um estudo evidenciou especificamente a atividade antinociceptiva das flores da *Acmella oleracea*, visto que é a parte da planta onde se encontra em maior concentração o espilantol (1%), principal composto pungente e responsável pelo efeito anestésico e analgésico (Ratnasooraya et al., 2004). Contudo, até a realização deste estudo, ainda não existiam relatos na literatura sobre o efeito da administração local na região orofacial de preparações vegetais da *Acmella oleracea*.

Desta forma, primeiramente foram realizados os experimentos com o extrato etanólico das flores da *Acmella oleracea* (EEAO) para avaliação de sua atividade sistêmica em modelos de nocicepção química, térmica e neuropática, e na sequência foram efetuados os experimentos com a fração hexânica rica em alquilamidas, para a verificação da atividade local na região trigeminal (orofacial) de camundongos.

Segundo princípios da toxicologia, todas as substâncias, independente de sua origem, podem ser consideradas agentes tóxicos, dependendo das condições de exposição, via de administração, tempo de uso e sua frequência. Frente a estas condições, surge a necessidade de se conhecer melhor essa substância, tendo conhecimento de que sua utilização pode ocasionar danos à saúde ao invés do efeito realmente desejado (Oga, 1996). Sendo assim, qualquer substância cuja finalidade é a aplicação terapêutica, deve-se analisar previamente seus parâmetros toxicológicos em que são calculadas doses possíveis de utilização para que não resultem em eventos adversos ao organismo, devido ao seu efeito tóxico (Vaz et al., 1997). Desta forma, inicialmente foi realizado o teste geral de atividades e avaliação da toxicidade

aguda do EEAO, o qual também é muito utilizado como um teste preliminar de triagem para plantas medicinais (Malone e Robichaud, 1962). Os resultados deste estudo demonstraram que o EEAO não apresentou toxicidade e é seguro nas doses testadas, resultando em um valor de DL50 de 889 mg/kg. Ainda, tendo em vista que várias drogas analgésicas que possuem ação depressora sobre o sistema nervoso central, podem reduzir tanto a atividade locomotora quanto a expressão comportamental nociceptiva em animais (Soja et al., 2002), realizamos o teste de atividade locomotora. Através do teste do campo aberto, nenhum dos animais apresentou qualquer alteração significativa no desempenho locomotor ou sinais de sedação e/ou depressão do sistema nervoso central, em todas as doses testadas.

Após, foi utilizado o modelo de nocicepção induzido pela administração de formalina orofacial buscando avaliar a atividade do EEAO. Este é um modelo que permite avaliar uma resposta bifásica de nocicepção em uma região densamente inervada pelo nervo trigeminal, onde é o foco da maioria das dores agudas assim como de estados patológicos do dente e de estruturas relacionadas. O teste de formalina orofacial é um modelo válido e confiável para avaliação do processamento e modulação da nocicepção (Luccarini et al., 2006), em que a primeira fase (neurogênica) é caracterizada pela ativação direta de neurônios aferentes primários (fibras C e A δ) pela formalina, seguida da liberação de substância P e glutamato (Shibata et al., 1989; Le Bars et al., 2001) produzindo um comportamento característico, padronizado como indicativo de nocicepção (Tjolsen et al., 1992). A segunda fase (inflamatória) é caracterizada principalmente devido a uma reação inflamatória subsequente no tecido periférico mediado pela liberação de vários mediadores inflamatórios (prostaglandinas, óxido nítrico, histamina, serotonina e bradicinina) (Le Bars et al., 2001; Parada et al., 2001). Estudos demonstraram que drogas que agem primariamente no sistema nervoso central, inibem igualmente a resposta tanto da fase I quanto da fase II, enquanto drogas que agem primeiramente na periferia inibem somente a resposta da fase II (Tjolsen et al., 1992). Ainda é relatado que drogas anestésicas locais, como a lidocaína, as quais agem através do bloqueio de canais de sódio voltagem dependentes, também afetam a primeira fase do teste de formalina (Abbadie et al., 1997). Neste contexto, os dados do presente estudo demonstraram que o tempo em que os animais

gastaram esfregando a área (perinatal) injetada com formalina foi significativamente reduzida pela administração do EEAO, o qual inibiu tanto a fase neurogênica quanto a fase inflamatória, sendo esta última de forma significativa e dependente da dose. Assim, nossos resultados sugerem que o EEAO promoveu uma ação antinociceptiva através do bloqueio de canais iônicos presentes nas fibras nociceptivas (visto que anestésicos locais, como a lidocaína, inibem a primeira fase do teste de formalina (Abbadie et al., 1997)) e ainda que pode apresentar propriedades analgésicas e/ou anti-inflamatórias. O efeito do EEAO neste modelo foi semelhante ao descrito por Ong e colaboradores (2011), que observaram que a administração por via oral do extrato metanólico de *Acmella uliginosa*, uma espécie de mesmo gênero da *Acmella oleracea*, reduziu o comportamento nociceptivo em ambas as fases da nocicepção induzida pela injeção de formalina na região intraplantar em camundongos. Do mesmo modo, Ratnasooriya e colaboradores (2005) também observaram que a administração por via oral do extrato aquoso das flores de *Spilanthes acmella* também reduziu o comportamento nociceptivo em ambas as fases no modelo de formalina intraplantar em ratos. Conforme Tjolsen e colaboradores (1992), é possível que esta redução do comportamento nociceptivo na primeira fase seja devido a uma interrupção da transmissão nociceptiva através das fibras sensoriais do tipo C. Além disso, o EEAO pode estar modulando os sinais nociceptivos nas fibras C aferentes pela ação dos canais iônicos operados por ligantes (TRPV1) que respondem à estimulação química (Walker et al., 2003).

É sabido que os canais TRPs possuem um papel essencial na detecção de estímulos nocivos (McCleskey e Gold, 1999; Tominaga, 2007) e são responsáveis pela modulação da liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato e peptídeos transmissores) pelo terminal pré-sináptico do nociceptor (Patapoutian et al., 2009). Desta forma a ativação do canal TRPV1 pela capsaicina (agonista de receptor TRPV1) e do TRPA1 pelo óleo de mostarda (agonista de receptor TRPA1), quando aplicados isoladamente na medula espinhal, causam aumento na liberação sináptica de glutamato e neuropeptídeos (Yang et al., 2005; Ferrini et al., 2007; Kosugi et al., 2007). Também está bem estabelecido que os canais TRPV1 estão distribuídos nos neurônios trigeminais da cavidade oral (Caterina et al., 1997) e a sensação de

pungência é devido a ativação destes neurônios quando os canais são abertos (Tominaga, 2007). Além disso, os canais TRPV1 estão envolvidos em vários processos sensoriais como a nocicepção térmica, sensação mecânica e hiperalgesia inflamatória, assim como tem se mostrado um importante alvo dos mediadores inflamatórios (Bautista et al., 2006). Por outro lado, canais do tipo TRPA1 são ativados pelo frio nocivo, pelo óleo de mostarda e da canela, alho entre outros, e também é relatada sua ativação por anestésicos locais (Matta et al., 2008; Nilius e Voets, 2005). Adicionalmente estudos relatam que canais TRPA1 presentes em neurônios sensoriais são o principal alvo de ação da formalina e possuem um importante papel na dor inflamatória (McNamara et al., 2007). Nossos resultados demonstraram que o EEAO (30 e 100 mg/kg) administrados intraperitonealmente inibiram efetivamente a resposta nociceptiva induzida por injeções orofaciais de capsaicina e cinamaldeído os quais são agonistas altamente seletivos de receptores TRPV1 e TRPA1, respectivamente. Considerando os resultados obtidos, é possível sugerir que o pronunciado efeito antinociceptivo do EEAO também pode estar relacionado com a modulação de canais do tipo TRPV1 e TRPA1.

Foi também observado que no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina, o EEAO aumentou consideravelmente o tempo de latência de retirada da pata ao calor nocivo, sugerindo uma possível regulação da ativação de receptores TRPV1 pelo EEAO e um provável efeito anestésico, visto que o EEAO aumentou o tempo de latência de retirada de pata de forma considerável quando comparado aos valores basais. Além disso, ainda utilizando a placa quente, o efeito antinociceptivo/anestésico do EEAO *per se* foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com naloxona somente no tempo de 30 min, sugerindo que opióides endógenos poderiam estar envolvidos, mas não exclusivamente. Como esperado, a morfina aumentou de forma significativa o tempo de latência ao estímulo de calor quando comparado ao grupo controle e o pré-tratamento com a naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) reverteu o efeito antinociceptivo da morfina. Este pré-tratamento com a naloxona no grupo EEAO (100 mg/kg) parece ter revertido a ação somente entre 15 e 60 min após o tratamento. Ong e colaboradores (2011) também obtiveram resultados semelhantes com a administração oral do extrato metanólico da *Acmella uliginosa* no mesmo teste (placa quente) em

camundongos, porém a naloxona foi capaz de reverter o efeito do extrato metanólico desde o primeiro minuto de administração, mantendo-se até o final dos 210 min de avaliação. Esta discrepância pode ter ocorrido devido às diferentes espécies vegetais utilizadas nos experimentos (*Acmella uliginosa* x *Acmella oleracea*), a forma de preparação do extrato (metanólico x etanólico) ou ainda, a diferença entre as doses de naloxona utilizada. Adicionalmente Ratnasooriya e Pieris (2005) demonstraram que no modelo de hiperalgisia térmica (placa quente) induzida por carragenina, o extrato aquoso das flores de *Spilanthus acmella* também foi capaz de prolongar o tempo de permanência de ratos na placa quente, sugerindo que o extrato possui característica anti-hiperalgésica. O modelo da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida frente a um estímulo nocivo, sendo mediada pela ativação de fibras C e A δ . A capsaicina ativa as fibras nervosas sensoriais através da interação com o receptor TRPV1, o qual também é responsável pela sensibilização das fibras em resposta ao calor nocivo (Dickenson e Besson, 1997, Julius e Basbaum, 2001, Caterina et al., 1997). Estes dados reforçam o importante efeito antinociceptivo do EEAO, frente a estímulos químicos e térmico de calor.

Além da sensibilidade ao estímulo térmico, a redução no limiar de ativação dos canais TRP também pode ser responsável pela hipersensibilidade mecânica, o qual é um importante sintoma da dor neuropática (Premkumar e Abooj, 2013). Pesquisas têm descrito que a dor neuropática ocorre devido a lesões no sistema nervoso central e periférico e é caracterizada por dor espontânea, respostas exacerbadas a um estímulo previamente doloroso (hiperalgesia) ou resposta de dor a um estímulo inócuo (alodinia) (Moalem e Tracey, 2006). Estudos também demonstram que lesões no nervo periférico induzem a uma sensibilização central através da liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento (os quais facilitam a transmissão da dor) pela ativação microglial resultando no desenvolvimento da dor neuropática. Entretanto, este mecanismo ainda permanece desconhecido e o tratamento com drogas analgésicas padrão tem sido limitado (Marchand et al., 2005; Tsuda et al., 2005). Considerando que o emprego do arsenal terapêutico disponível para este tipo de dor crônica não promove o alívio adequado nos pacientes, foi avaliado o efeito antinociceptivo do extrato na dor

neuropática induzida pela lesão parcial do nervo ciático em camundongos. O EEAO reduziu a alodinia mecânica nas primeiras 3 h, sugerindo uma atividade pronunciada do extrato no alívio da nocicepção neuropática. A droga padrão utilizada neste experimento foi a fluoxetina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) que age inibindo especificamente a recaptação de serotonina. A maioria dos efeitos colaterais, relacionados aos ISRS, é imediata e de curta duração, com desenvolvimento de tolerância; isso leva a uma melhor aceitação do tratamento em longo prazo (Kraychete et al., 2003). Porém, neste estudo, mesmo apesar de o efeito antinociceptivo ter sido pronunciado, mais estudos devem ser realizados para se estudar o possível mecanismo de ação envolvido.

Dessa maneira, os resultados apresentados até o presente momento nos permitem sugerir que o pronunciado efeito antinociceptivo do EEAO pode estar relacionado com o bloqueio de canais iônicos, sejam eles canais de sódio dependentes de voltagem ou ainda da família dos TRPs. Reforçando essa hipótese, o efeito do EEAO poderia ser semelhante ao observado com a utilização de anestésicos locais. Estudos relatam a existência de no mínimo 6 tipos de canais de sódio identificados em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) e que podem estar atribuídos tanto a condições dolorosas fisiológicas (nociceptivas) quanto patológicas (neuropática) (Waxman et al., 1999a,b), sendo que a atividade anormal e a mudança da expressão de canais de sódio em condições neuropáticas vem despertando a atenção para novas pesquisas. Desta forma, a administração sistêmica de lidocaína tem sido utilizada terapêuticamente na tentativa de tratar quadros de dor neuropática, uma vez que a mesma inibe descargas ectópicas espontâneas após uma lesão de nervo periférica, sem causar o bloqueio da condução nervosa normal (Mao e Chen, 1999). Contudo, seu uso tem sido limitado devido aos seus efeitos colaterais quando administrado sistemicamente (Liu e Wood, 2011). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que o EEAO poderia ser considerado uma alternativa e trazer novas perspectivas para o tratamento da dor crônica/neuropática.

De uma forma geral, nossos resultados demonstram uma atividade antinociceptiva interessante do EEAO quando administrado sistemicamente em

modelos de nociceção química, térmica e neuropática, reforçando seu uso popular como um analgésico.

6.2 Atividade antinociceptiva local da FH

Devido ao uso etnofarmacológico das flores da *Acmella oleracea*, no presente estudo foram empregados alguns modelos animais de nociceção na região orofacial, objetivando estudar a dor na região trigeminal, a qual é considerada como uma das áreas do corpo mais densamente inervadas e relacionadas com a maioria das dores agudas mais frequentes no ser humano, como a neuralgia pós-herpética, dores agudas acompanhadas de estados patológicos do dente e estruturas relacionadas, enxaquecas e dores referidas (Luccarini et al., 2006). Além do lábio, a córnea também é utilizada para estudos de nociceção envolvendo o sistema trigeminal (Meng et al., 1997), pois os nociceptores da córnea respondem a estímulos nocivos químicos, mecânicos e térmicos, sendo altamente representados no gânglio trigeminal através da ramificação oftálmica do nervo trigeminal (de Felipe et al., 1999). (Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993). Em ratos, a limpeza dos olhos com as patas dianteiras é um limiar evidente de resposta ao estímulo químico da córnea. Assim, alguns pesquisadores tem utilizado o teste de limpeza dos olhos para investigar a pungência e/ou a irritação de compostos químicos sobre fibras C (Farazifard et al., 2005; Karai et al., 2004). Desta forma, com o objetivo de avaliar se a FH nas doses utilizadas apresentavam alguma irritação ocular, foi efetuado o teste de limpeza de olhos, também conhecido como “eye wiping”. Os resultados do presente estudo demonstraram através deste modelo, que a FH em baixas doses não parece causar irritação ocular significativa quando comparadas à capsaicina, enquanto que as doses mais elevadas promoveram irritação semelhante ao observado com a capsaicina.

De maneira interessante, a administração da FH no lábio superior direito dos animais promoveu efeitos semelhantes. Foi possível observar que a administração de doses menores da FH (0,01; 0,1; 1 µg/lábio) não promoveram comportamentos indicativos de nociceção nos animais, uma vez que não apresentaram diferenças significativa quando comparadas ao grupo que recebeu veículo na região orofacial. Em contrapartida, doses maiores da FH (3;

10; 30 e 100 µg/lábio) administradas da mesma forma, promoveram de forma pronunciada, comportamentos considerados nociceptivos nos animais. Desta forma foi possível verificar que a FH possui um papel dual dependente da dose, em que doses menores parecem não causar dor, enquanto doses maiores sugerem comportamento nociceptivo acentuado. Este resultado pode estar associado à concentração de alquilamidas presentes nas diferentes doses da FH administradas.

Assim, a FH na dose de 1 µg foi selecionada para os experimentos relacionados ao possível efeito analgésico/anestésico enquanto que a dose maior, de 30 µg foi escolhida para avaliar os mecanismos envolvidos na sua ação nociceptiva.

No teste de formalina, independente dos tempos de pré-tratamento (10 ou 30 min), a FH (1 µg/10 µL) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo dos animais tanto na primeira quanto na segunda fase, sendo que a redução na primeira fase foi mais pronunciada. É possível sugerir que este resultado esteja relacionado com a concentração de alquilamidas na flores, uma vez que Ley e colaboradores (2006) e Wu e colaboradores (2008) descreveram que esse grupo de metabólitos secundários seriam os principais responsáveis pelas propriedades anestésicas e anti-inflamatórias da planta. Além disso, foi sugerido que a atividade anti-inflamatória do espilantol, a principal alquilamida do gênero, pode envolver uma inibição dual de COX e LOX, uma vez que a estrutura química do espilantol é muito similar a do ácido araquidônico, o qual é o precursor da síntese de prostaglandinas e leucotrienos (Hernández e colaboradores, 2009).

Como já mencionado anteriormente, tendo em vista que os anestésicos locais são compostos que tipicamente afetam a primeira fase do teste de formalina (Abbadie et al., 1997), foi possível constatar que tanto a lidocaína (0,2 µg/10 µL) como a FH (1 µg/10 µL) reduziram significativamente a primeira fase na nocicepção induzida pela injeção de formalina na região orofacial. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo da FH pode estar ocorrendo provavelmente a nível periférico e que pode estar associado a propriedades analgésicas e possivelmente anestésicas. Esse efeito, pode estar relacionado, em parte ao bloqueio de canais de sódio ativados por voltagem, os quais possuem extrema importância e constituem a base para o início e a

propagação de potenciais de ação de neurônios sensoriais (Hodgkin e Huxley, 1952; Hunt e Koltzemburg, 2005). Tem sido demonstrado também, que tanto canais TRPV1 quanto canais de sódio dependentes de voltagem presentes em nociceptores, são moléculas críticas que estão envolvidas no processo de transdução e transmissão da dor na região orofacial (Fang et al., 2007; Park et al., 2006).

Como já descrito previamente a capsaicina é o composto pungente das pimentas vermelhas e é amplamente utilizada como ferramenta no estudo da dor em humanos e em animais (Holzer, 1991; Szallasi e Blumberg, 1999). Ainda o uso da capsaicina como um estímulo químico possui algumas vantagens, dentre as mais importantes destaca-se sua ação seletiva em fibras sensoriais do tipo C que transmitem as sensações de dor (Baumann et al., 1991; Gallar et al., 1993; Ikeda et al., 1997) e que resultam na ativação do receptor TRPV1, um canal de íon ativado por ligante e pelo calor, presente nos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro (Caterina et al., 1997). Através do modelo de nocicepção orofacial induzido pela injeção de capsaicina no lábio superior direito dos animais, foi possível demonstrar que independente dos tempos de pré-tratamento (10 ou 30 min) e da forma de injeção (ipsilateral ou contralateral) a FH (1 µg/lábio) reduziu o comportamento nociceptivo nos animais de forma significativa e acentuada. Esta pronunciada atividade antinociceptiva reforça uma provável ação anestésica de doses mais baixas da FH (1 µg/lábio), a qual pode estar bloqueando canais de sódio voltagem dependentes ou ainda receptores TRPV1. Estudos anteriores também sugerem que este gênero apresenta atividade anestésica local. Empregando modelos de pápula intracutânea em cobaias e de anestesia do plexo lombar em sapos com o extrato aquoso das partes aéreas da *Spilanthes acmella* e xilocaína a 2% como controle, Chakraborty e colaboradores (2010) observaram uma atividade anestésica local significativa, e atribuíram esse efeito a presença de alquilamidas na composição da *Spilanthes acmella*. Mc Ferren (2002) observou que a *Piper piscatorum*, de maneira similar a *Acmella oleracea*, também é empregada popularmente para o alívio da dor de dente e também é composta por isobutilamidas, sendo que seu mecanismo de ação parece envolver a modulação de canais de sódio voltagem dependentes.

Do mesmo modo, foi observado que o eugenol, amplamente empregado como um anestésico local em odontologia, promove este efeito na região orofacial através do bloqueio da condução nervosa por modular a neurotransmissão mediada por canais de sódio voltagem dependentes (Park e colaboradores, 2009). No entanto, existem estudos com resultados antagônicos com relação ao seu efeito anestésico em relação a modulação de receptores TRPV1. Enquanto Park e colaboradores, (2009) demonstraram que o eugenol ativa receptores TRPV1 para promover analgesia, Li e colaboradores observaram que a anestesia depende da inibição de correntes de potássio de maneira independente da ativação do receptor TRPV1.

Contudo, mais estudos devem ser realizados para esclarecer quais os possíveis mecanismos de ação anestésica da fração rica em alquilamidas da *Acmella oleracea*.

Com relação ao efeito algíco promovido pela maior dose da FH, foi observado a redução do comportamento nociceptivo em animais previamente tratados com morfina (100 µg/lábio), sugerindo o envolvimento do sistema opioidérgico, provavelmente através de uma ação periférica da FH sobre receptores opióides. Adicionalmente, sabe-se que os opióides são capazes de inibir ambas as fases (neurogênica e inflamatória) da nocicepção induzida pela formalina (Hunskar e Hole, 1987; Shibata et al., 1989). Segundo Cunha e colaboradores (2009), a morfina é um dos opióides mais efetivo e prescrito para o tratamento de dores agudas intensas, crônicas e pós-operatórias. Além de seu efeito central, já foi evidenciado que ela também promove analgesia a nível periférico, porém através de mecanismos ainda não totalmente elucidados. Segundo o mesmo autor, a analgesia periférica promovida pela morfina parece envolver a ativação de receptores opióides periféricos em neurônios sensoriais primários, ativando uma cascata de sinalização intracelular, através da ativação da PI3Ky/Proteína quinase B (AKT); da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e consequente produção de óxido nítrico (NO), o qual induz um aumento nas correntes dos canais de potássio dependentes de ATP, levando a uma hiperpolarização dos neurônios nociceptivos (Cunha e colaboradores, 2009).

Ainda com o intuito de se avaliar o possível envolvimento de um componente inflamatório na nocicepção induzida pela FH, foi utilizado o

cetoprofeno (anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) inibidor de COX-1 e COX-2). Os AINE's são substâncias que se destacam pelo efeito analgésico, além de suas propriedades anti-inflamatórias e antipiréticas sendo indicados para o tratamento de dores de grau leve a moderado (Mathews et al., 2001). Esse efeito analgésico pode estar relacionado com o bloqueio do potencial de ação mediante uma ação periférica, através da inibição da síntese das prostaglandinas (Martindale, 2002). O cetoprofeno é um inibidor da COX-1 e da COX-2, responsável por inibir de forma acentuada a produção de prostaglandinas no sistema nervoso central e periférico (Papich, 1997; Walker, 1995). Entretanto, o cetoprofeno não reduziu o comportamento nociceptivo induzido pela administração da FH, excluindo a participação do componente inflamatório no mecanismo de ação da mesma.

Assim como as plantas do gênero *Spilanthes*, plantas do gênero *Xanthoxylum* têm sido utilizadas com o mesmo propósito, principalmente no alívio de condições dolorosas na região orofacial. Seu principal composto bioativo é o hidróxi- α -sanshool, o qual tem sido associado a sua ação analgésica e pelas sensações de formigamento e amortecimento da língua. Inicialmente estudos indicavam que o principal mecanismo de ação do sanshool seria o bloqueio de canais de potássio de 2 poros (Bautista et al., 2008). Porém, estudos recentes do mesmo grupo revelaram que o sanshool também é capaz de inibir a transmissão de fibras mecanonociceptoras do tipo A δ , responsáveis por mediar tanto a dor aguda quanto a dor inflamatória. Além disso, o sanshool também seria responsável pela inibição dos disparos dos potenciais de ação pelo bloqueio de correntes de sódio voltagem dependentes em uma subpopulação de neurônios somatosensoriais, em que o canal de sódio do tipo Nav1.7 é o mais fortemente inibido pelo sanshool, quando comparado a outros canais de sódio expressos em neurônios sensoriais. Desta forma estas evidências sugerem que o alvo do sanshool seja os canais de sódio voltagem dependentes em nociceptores do tipo A δ mecanossensíveis, reduzindo a excitabilidade e culminando com a analgesia na dor aguda (Tsunozaiki et al., 2013). Tendo em vista a semelhança entre as características e estrutura química das plantas do gênero *Spilanthes* e do gênero *Xanthoxylum* e tendo conhecimento, de que o principal composto bioativo (hidróxi- α -sanshool) pudesse estar atuando em canais iônicos, foram realizados

experimentos neste estudo para avaliar um possível envolvimento de canais TRPs e de potássio na atividade nociceptiva da FH (30 µg/lábio). Os resultados demonstraram que tanto a glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP)), o tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canais de potássio), assim como os antagonistas vermelho de rutênio (bloqueador não seletivo de canais de cálcio e TRP) e HC-030031 (antagonista seletivo de receptores TRPA1), nas doses utilizadas, não foram efetivos em reduzir o comportamento nociceptivo nos animais. Com nossos resultados, é possível sugerir, que nas doses utilizadas, o possível mecanismo de ação da FH parece não envolver diretamente canais de potássio ou o antagonismo de receptores do tipo TRPA1 e TRPV1. De qualquer forma, mais estudos são necessários para avaliar profundamente o mecanismo de ação algico da FH.

6. Conclusão

Este trabalho evidenciou que o EEAO não apresentou efeitos tóxicos em nossas condições experimentais, quando aplicado de forma aguda uma única vez, sendo seguro nas doses utilizadas. Além disso, o EEAO não afetou a atividade locomotora dos animais, nas doses em que foi observado um pronunciado efeito antinociceptivo contra estímulos nocivos químicos (formalina, capsaicina e cinamaldeído) em camundongos. Além disso, o EEAO reduziu o tempo de latência na placa quente, indicando sua propriedade anti-hiperalgésica, e de maneira importante, também reduziu o limiar de retirada de pata no teste de alodinia mecânica em animais neuropáticos, demonstrando pronunciado efeito no alívio desse tipo de dor crônica.

Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que a FH apresentou uma ação dual dependente de dose, onde doses menores causam analgesia e doses maiores causam um efeito álgico nos animais. Em baixas doses, a FH promoveu um efeito antinociceptivo e/ou anestésico pronunciado que pode estar agindo a nível periférico.

Desta forma, podemos concluir que as alquilamidas presentes na *Acmella oleracea*, possuem importante efeito antinociceptivo tanto na dor aguda quanto na dor neuropática (crônica), reforçando a importância desta planta para o desenvolvimento de fármacos terapeuticamente úteis no controle da dor. No entanto, estudos adicionais sobre o mecanismo de ação são necessários para confirmar a importância terapêutica destas alquilamidas.

Referências

Abbadie, C., Taylor, B. K., Peterson, M. A., Basbaum, A. L. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine. **Pain**, v.69, n.1-2, p.101-10, 1997.

Almeida, T. F., Roizenblatt, S., Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.

Andrade, E. L., Luiz, A. P., Ferreira, J., Calixto, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neurosc.**, v.152, n.2, p. 511-20, 2008.

Attal, N., Cruccu G., Baron R., Haanpää M., Hansson P., Jensen T. S., Nurmikko T. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, v.17, p.1113–e88, 2010.

Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neurosc.**, v. 211, p. 39-50, 2012.

Baumann, T. K., Simone, D. A., Shain, C. N., LaMotte, R. H. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary afferent nerve fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. **J Neurophysiol**, v. 66, p. 212–227, 1991.

Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v.124, p.1269–1282, 2006.

Bautista, D.M., Sigal, Y. M., Milstein, A. D., Garrison, J. L., Zorn, J.A., Tsuruda, P. R., Nicoll, R. A., Julius, D. "Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels". **Nat. Neurosci.** v.11 (7), p.772–9, 2008.

Belmonte, C., Gallar, J., Pozo, M.A., Rebollo, I. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. **J. Physiol.**, v.437, p. 709–725, 1991.

Besson, J. M., Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, v.67, n.1, p.67-186, 1987.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n. 9164, p.1610-5, 1999.

Boonen, J., Baert, B., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., De Sielgeleer, B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.53, p.243-249, 2010.

Boonen J., Baert B., Roche N., Burvenich C., Spiegeleer B. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthus acmella* (Compositae) extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.8, n.127(1), p.77-84, 2010.

Bortalanza, L. B., Ferreira, J., Hess, S. C., Delle, M.F., Yunes, R. A., Calixto, J. B. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.453, n.2-3, p.203-8, 2002.

Botticelli, L. J., Cox, B. M. Goldstein, A. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.78, p.7783-7786, 1981.

Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., Yunes, R. A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phyto. Res.**, v.14, p.1-18, 2000.

Cardoso, M. O., Garcia, L. C. Jambu (*Spilanthus oleracea* L.). In: Cardoso, M.O. (Co.). **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Brasília: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA, p.133-140, 1997.

Carr, D. B., Gordas, L.C. Acute Pain. **Lancet**, v.353, n.205, p.1-8, 1999.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosent, T. A., Levine, J. D., Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p.816-24, 1997.

Catterall, W. A. e Mackie, K. Local Anesthetics. In: Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B. *et al.* , - **Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9 th Ed., New York, McGraw-Hill, p.331-347, 1996.

Chakraborty, A., Devi, R. K. B., Rita, S., Sharatchandra, K. H., Singh, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthus acmella* in experimental animal models. **Ind. J. Pharm.**, v.36, n.3, p. 148-150, 2004.

Chakraborty, A., Devi, R. K. B., Sanjebam, R., Khumbong, S., Thokchom, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthus acmella* Murr. in experimental animals models. **Ind. J. Pharm.**, n.42, p.277-279, 2010.

Cortright, D. N., Krause, J. E., Broom, D. C. TRP channels and pain. **Bioc. Bio. Acta**, v.1772, p. 978-988, 2007.

Coutaux, O. A., Adam, F., Willer, J. C., Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.

Cunha, T. M., Roman-Campos. D., Lotufo, C. M., Duarte, H.L., Souza, G. R., Verri, W.A., Funez, M. I., Dias, Q. M., Schivo, I. R., Domingues, A. C., Sachs,

D., Chiavegatto, S., Teixeira, M. M., Hothersall, J. S., Cruz, J.S., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci.**, v.107(9), p.4442-7, 2010.

D'Amour, F. E., Smith, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **J Comp neurol**, v.72, p.74-79, 1941.

Djoughri, L. e Lawson, S. N. A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Rev**, v.46, p.131–145, 2004.

Ekanem, A. P., Wang, M., Simom, J. E., MORENO, D. A. Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. **Phyto Res**, v.21, p.1253 – 1255, 2007.

Erin, D. M. e Linda, R. W. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosc**, v.10, p.23-36, 2009.

Estrella, E. **Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas**. Lima: TCA, p.301, 1995.

Fang, Z., Park, C. K., Li, H. Y., Kim, H. Y., Park, S. H., Jung, S. J., Kim, J. S., Monteil, A., Oh, S. B., Miller, R. J. Molecular basis of Ca(v)2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. **JBiol Chem**, v.282, p.4757–64, 2007.

Farazifard, R., Safarpour, F., Sheibani, V., e Javan, M. Eye-wiping test: a sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. **Brain Res. Brain Res. Protoc.**, v.16 (1-3), p.44-9, 2005.

Favoreto, R., Gilbert, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v.5, n.1, p.83-90, 2010.

de Felipe, C., González, G.G., Gallar, J., Belmonte, C. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. **Eur. J. Pain**, v. 3, p.31–39, 1999.

Ferrini, F., Salio, C., Vergnano, A. M., Merighi, A. Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. **Pain**, v.129, p. 195-209, 2007.

Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull**, v.48(2), p.129-41, 1999.

Galeotti, N., Bartolini, A., Ghelardini, C. Role of intracellular calcium in acute thermal pain perception. **Neurop.**, v.47, p.935-944, 2004.

Gallar, J., Acosta, M.C., Belmonte, C., 2003. Activation of scleral cold thermoreceptors by temperature and blood flow changes. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, v. 44, p. 697–705.

Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P. e Belmonte, C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. **J. Physiol.**, v.468, p.609-622, 1993.

Garcia-Martinez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La Pena, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p.2374-2379, 2002.

Garland, E. L., Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Prim Care.**, v. 39(3), p.561-71, 2012.

Haddad, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. **Biochem Biophys Res Commun**, v.353, n.2, p.217-24, 2007.

Hind, N. and Biggs, N. *Acmella oleracea*: Compositae. **Curti's Botanical Magazine**, v. 20, n.1, p. 31-39, 2003.

Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. **J Physiol.**, v. 116(4), p.497-506, 1952.

Holzer, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev.**, v.43, p.143-20, 1991.

Hunskar, S., Hole, K. The Formalin Test In Mice: Dissociation Between Inflammatory And Non-Inflammatory Pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

Hunt, S. P. and Koltzenburg, M. The neurobiology of pain: (molecular and cellular neurobiology). **Oxford: Oxford University Press**. v.ix, p.403, [4] leaves of plates p. (Molecular and cellular neurobiology series), 2005.

Hunt, S. P., Mantyh, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**,v.2, p.83-91, 2001.

Iadarola, M.J., Caudle, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, v. 287, p.240,1997.

Ikeda H., Tokita Y., Suda, H. Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp. **J Dent Res.**, v.76, p.1341-1349, 1997.

Jacobson, K.A., Gao, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Rev. Drug Disc.**, v.5, p.247-264, 2006.

Julius, D., Basbaum, A. I. Review article Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, pg. 203-210, 2001.

Karai, L., Brown C. D., Andrew J. Mannes, J. A., Connelly T. S., Brown J., Gandal M., Wellisch M. O., John K. Neubert, K. J., Olah Z., and Iadarola, J. M.

Deletion of vanilloid receptor 1--expressing primary afferent neurons for pain control. **The Journal of Clinical Investigation**, p.1344-1352, 2004.

Kidd, B. L., Photiou, A., Inglis, J.J. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. **Novartis Found Symp.**, v.260, p.122-33, 2004.

Kosugi, M., Nakatsuka, T., Fujita, T., Kuroda, Y., Kumamoto, E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **J Neurosci**, v.27, p. 4443–451, 2007.

Kraychete, D., Sakata, R. K., Khan, P., Carvalho, M. G., Gusmão, A., Carvalho, E. M. Eficácia dos antidepressivos para dor crônica. **Rev. Bras. Med**; v. 60(5), p.283-288,2003

Lao, L., Song, B., Chen, W., and Marvizón G. C. J. Noxious mechanical stimulation evokes the segmental release of opioid peptides that induce mu-opioid receptor internalization in the presence of peptidase inhibitors. **Brain Research**, v. 1197, p. 85-93, 2008.

Latorre, R., Zaelzer C. and Brauchi, S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. **Q. Rev. Biophys**, v.42, p.201-246, 2009.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53(4), p.597–652, 2001.

Leffler, A., Fischer, M. J., Rehner, D., Kienel, S., Kistner, K., Sauer, S. K., Gavva, N. R., Reeh, P. W. and Nau, C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local *anesthetics in rodent sensory neurons*. **J Clin Invest**, v.118, p.763-776, 2008.

Ley, J. P., Krammer, G., Looft, J., Reinders, G., Bertram, H. J. Structure Activity Relationships Of Trigeminal Effects For Artificial And Naturally Occurring Alkamides Related To Spilanthol. **Flavour Science: Recent Advances And Trends**, p. 21-24, 2006.

Li, H.Y., Park, C.K., Jung, S.J., Choi, S.Y., Lee, S.J., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B. Eugenol inhibits K⁺ currents in trigeminal ganglion neurons. **J Dent Res.**, v. 86(9), p.898-902, 2007.

Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. Simple Method Of Fitting Dose Effect Curve. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.95, p.99-113, 1949.

Loeser, J.D., Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

Luccarini, P., Childeric, A., Gaydier, A. M., Voisin, D., Dallel, R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **J Pain**, v.7, p.908-914, 2006.

Ma, C., Zhang, J. M. Animal models of pain. A book. **Springer Protocols**, Humana Press, 2011.

Malmberg, A., Basbaum, A. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v.76, p. 215-222, 1998.

Malone, M.H., Robichaud, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

Malosso, M.G., Barbosa, E.P., Nagao, E.O. Micropropagação do Jambu (*Acmella oleracea* (L) R.K. Jansen. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, **Botucatu**, v. 10, p. 91-95, 2008.

Mao, J., Chen, L. L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. **Pain**, v.87, p. 7-17, 2000.

Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S. B. Role Of The Immune System In Chronic Pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, 2005.

Marcon, R., Luiz, A. P., Werner, M. F., Freitas, C. S., Baggio, C. H., Nascimento, F. P., Soldi, C., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. Evidence Of Trpv1 Receptor And Pkc Signaling Pathway In The Antinociceptive Effect Of Amyrin Octanoate. **Brain Res**, v.1295, p.76-88, 2009.

Martindale. **The Complete Drug Reference**. 33 Ed. Pharmaceutical Press, 2002.

Mathews, K. A., Pettifer, G. G., Foster, R. R. and McDonell, W. W. Safety and efficacy of preoperative administration of meloxicam, compared with that of ketoprofen and butorphanol in dogs undergoing abdominal surgery. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.6, p.882-888, 2001.

Matta, J. A., Cornett, P. M., Miyares R.,L., Abe, K., Sahibzada, N., Ahern, G. P. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and Inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.105, p.8784-8789, 2008.

Mccleskey, E. W., Gold, M. S. Ion channels of nociception. **Annu Rev Physiol**, v.61, p.835-56, 1999.

Mcferrren, M. A., Cordova, D., Rodriguez, E., Rauh, J. J. In Vitro Neuropharmacological Evaluation Of Piperovatine, An Isobutylamide From Piper Piscatorum (Piperaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.83, p.201-207, 2002.

McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., Fanger, C. M. Trpa1 Mediates Formalin-Induced Pain. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 104, n. 33, p. 13525-30, 2007.

Melzack, R., Loeser, J. D. Pain: An Overview. **Pain**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

Meng, I. D., Hu J. W., Benetti, A. P., Bereiter, D. A. Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. **J. Neurophysiol.**, v.77, p.43–56, 1997.

Merskey, H., Bogduk, N. **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. Seattle: IASP Press, 1994.

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

Moalem, G., Tracey, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev**, v.51, p.240–64, 2006.

Mori, L.S., Boller, S., Kassuya, C. A., Stefanello, M. E., Zampronio, A. R. Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopine, a semi-synthetic analogue of xylopine. **Phitomed**, v.18(2-3), p.143-7, 2010.

Nigrinis, L. S. O., Caro, J. O., Olarte, E. N. Estudio Fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio Fitoquímico. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v.15, p.37-47, 1986.

Nilius, B., Voets, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels, **Pflügers Arch.**, v.451, p.1–10, 2005.

Ninkovic, M., Hunt, S. P., Gleave, J. R. W. Localization Of Opiate And Histamine H1- Receptor In The Primate Sensory ganglia and spinal cord. **Brain Res**, v.241, p.197–206,1982.

Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 28-70, 1996.

Ong, H. M., Mohamad, A. S., Makhtar, N. A., Khalid, M. H., Khalid, S., Perimal, E. K., Mastuki, S. N., Zakaria, Z. A., Lajis N., Israf, D. A., Sulaiman, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass., **J Ethnopharm**, v.133, p.227-233, 2011.

Oseguera, J.A, Simon, S. A., Rosenbaum, T. TRPV1: on the road to pain relief. **Current Molecular Pharmacology**, v.1, p.255-69, 2008.

Papich, M. G. Principles of analgesic drug therapy. **Seminar Veterinary Medicin Surgery**, v.12, p.80-93, 1997.

Parada, C. A., Tambeli, C. H., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102(4), p.937–944, 2001.

Park, C. K., Kim, M. S., Fang, Z., Li, H. Y., Jung, S. J., Choi, S.Y., Lee, S. J., Park, K., Kim, J. S., Oh, S. B. Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. **J Biol Chem.**, v.281, p.17304–17311, 2006.

Park, C. K., Kim, K., Jung, S.J., Kim, M.J., Ahn, D. K., Hong, S. D., Kim, J. S., Oh, S. B. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. **Pain**, v.144, p. 84–94, 2009.

Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C. J. Transient Receptor Potential Channels: Targeting Pain At The Source. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

Pelissier, T., Pajot, J., Dallel, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, v.96, n.1, p.81-87(7), 2002.

De Petrocellis, L., Guida, F., Moriello, A. S., De Chiaro, M., Piscitelli, F., de Novellis, V., Maione, S., Di Marzo, V. N-palmitoyl-vanillamide (palvanil) is a non-pungent analogue of capsaicin with stronger desensitizing capability against the TRPV1 receptor and anti-hyperalgesic activity. **Pharmacol Res**, v.63, p.294–9, 2010.

Plevury, B.J. & Lauretti, G.R. Biochemical Aspects Of Chronic Pain And Its Relationship To Treatment. **Pharmacol. Ther.**, v.71, p.313-324, 1996.

Prado, W.A. Involvement Of Calcium In Pain And Antinociception. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p.449-461, 2001.

Premkumar, L. S., Abooj, M. TRP channels and analgesia. **Life Sci**, v.92, p.415, 2013.

Ramsewak, R. S., Erickson, A. J., Nair, M. G. Bioactive *N*-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v.9, p.732, 1999.

Rang, H. P. & Urban, L. New Molecules In Analgesia. **Br. J. Anaesth.**, v.75, p.145-156, 1995.

Ratnasooriya, W. D., Pieris, K. P. P. Attenuation of persistent pain and hyperalgesia by *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p.614-619, 2005.

Ratnasooriya, W. D., Pieris, K. P. P., Samaratunga, U., Jayakody, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 91, p.317–320, 2004.

Rebello, F. K. e Homma, A. K. O. **Uso da Terra na Amazônia: Uma Proposta Para Reduzir Desmatamentos e Queimadas. Amazônia: Ci. & Desenv., Belém**, v.1, n.1, p. 197 – 234, 2005.

Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiocotecnologia**. São Paulo: Editora Premier, 1997

Saraf, D. K., Dixit, V. K. *Spilanthes acmella Murr.*: Study on Its Extract Spilanthol as Larvicidal Compound. **Asian J Exp Sci**, v. 16, n.1&2, p.9-19, 2002.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**. v.38(3), p.347–352, 1989.

Soja, P. J., Taepavarapruk, N., Pang, W., Cairns, B. E., Mcerlane, S. A., Fragoso, M. C. Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p.1178-88, 2002.

Stein, C., Hassan, A. H., Przewłocki, R., Gramsch, C., Peter, K., Herz, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.87, p.5935-5939,1990.

Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H. Attacking Pain at its Source: New Perspectives on Opioids. **Nat Med**, v.9, p.1003–1008, 2003.

Szallasi, A. and Blumberg M. P. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. **Pharmacol Rv**, v.51, n. 2, p.159-212, 1999.

Tadaiesky, M. T., Andreatini, R., & Vital, M.A. B. F. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **Eur J Pharmacol**, v.535, p.199-207, 2006.

<Thieneman's Herbal & Perennials> Disponível em: http://www.thienemans.com/photos/index.php/Herbs/IMG_1058, acesso em: 20/06/2013.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. The Formalin Test: An Evaluation Of The Method. **Pain**, v.51, n.1, p.5-17,1992.

Todd, A. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Rev Neurosci**, v.11, p.823–836, 2010.

Tominaga, M. Nociception and TRP channels. **Handb Exp Pharmacol**, v.179, p.489-505, 2007.

Torres, J. M. e Chávez, A. G. Alcamidas em plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v.20, p.377-387, 2001.

Tracey, I. & Manthly, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**. v.55, p.377-391, 2007.

Tsuda, M., Inoue, K. & Salter, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia. **Trends Neurosci** v.28, p.101–107, 2005.

Tsunozaki, M., Lennertz, R. C., Vilceanu, D., Katta, S., Stucky, C. L. and Bautista, D. M. A 'toothache tree' alkylamide inhibits A δ mechanonociceptors to alleviate mechanical pain. **J Physiol**, jun.17, 2013.

Vaz, Z.R., Mata, L.V., Calixto, J.B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal end chemical models of nociception in mice. **Phyt Res**, v.11, p.101-6, 1997.

Walker, K. M., Urban, L., Medhurst, S. J., Patel, S., Panesar, M., Fox, A.J. and McIntyre, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v.304, p.56–62, 2003.

Walker, J. S. NSAID: an update on their analgesic effects. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.22, p.855–860, 1995.

Wall, P. D. e Melzack, R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, p.1152, 1999.

Waxman, S. G., Cummins, T. R., Dib-Hajj, S., Fjell, J., Black, J. A. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, p.1177±1187, 1999a.

Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R., Black, J. A. Sodium channels and pain. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, p. 7635±7639, 1999b.

Weng, H. R., Lee, J. I., Lenz, F. A., Schwartz, A., Vierck, C., Rowland. L., and Dougherty, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **J Neurosci Methods**, v.101, p.393–401, 2000

Willis, W. D., Coggeshall, R. E. **Sensory Mechanisms of the Spinal Cord**, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991.

Wittert, G., Hope, P., Pyle, D. Tissue Distribution Of Opioid Receptor Gene Expression In The Rat. **Biochemical And Biophysics Research Communications**, v.218, p.877-881, 1996.

Woolf, C. J. An overview of the mechanisms of hyperalgesia. **Pulm Pharmacol**, v.8, n.4-5, p.161-7,1995.

Woolf, C. J., Ma, Q. Nociceptors--Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v.55, n.3, p. 353-64, 2007.

Wu, L. C., Fan, N. C., Lin, M. H., Chu, I. R., Huang, S. J., Hu, C. Y., Han, S. Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators, **J Agric Food Chem**, v.56(7), p.2341-9, 2008.

Yang, S., Liu, Z. W., Wen, L., Qiao, H. F., Zhou, W. X., Zhang, Y. X. Interleukin-1beta Enhances Nmda Receptor-Mediated Current But Inhibits Excitatory Synaptic Transmission. **Brain Res**, v.1034, n.1-2, p.172-9, 2005.

Zamponi, G.W. & Snutch, T.P. Modulation Of voltage-dependent calcium channels by G proteins. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.8, p.351-356, 1998.

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