



Universidade Estadual do Ceará

Daniel de Castro Alves Moreira Lobo

Efeitos do eugenol sobre variáveis elétricas de neurônios do  
gânglio cervical superior de ratos

Fortaleza-Ceará  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL DE CASTRO ALVES MOREIRA LOBO

EFEITOS DO EUGENOL SOBRE VARIÁVEIS  
ELÉTRICAS DE NEURÔNIOS DO GÂNGLIO  
CERVICAL SUPERIOR DE RATOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

Fortaleza-Ceará  
2008

L779e Lobo, Daniel de Castro Alves Moreira  
Efeitos do Eugenol Sobre Variáveis Elétricas de  
Neurônios do Gânglio Cervical Superior de Ratos/Daniel de Castro  
Alves Moreira Lobo.\_ Fortaleza, 2008.  
56p.; il.  
Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências  
Fisiológicas)-Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de  
Ciências Biomédicas.

1.Eugenol. 2. Gânglio Cervical Superior. 3. Potencial de  
Ação. I. Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de  
Ciências Biomédicas.

CDD: 574.1

Daniel de Castro Alves Moreira Lobo

EFEITOS DO EUGENOL SOBRE VARIÁVEIS  
ELÉTRICAS DE NEURÔNIOS DO GÂNGLIO  
CERVICAL SUPERIOR DE RATOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Curso de  
Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da  
Universidade Estadual do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso - Orientador.  
Universidade Estadual do Ceará

---

Profa Dra. Vânia Marilande Ceccatto  
Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz  
Universidade Federal de Minas Gerais

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores do Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.

Ao meu orientador: professor José Henrique Leal Cardoso.

À professora Vânia Ceccatto pelo incentivo e participação na minha banca em uma manhã de sábado entre o natal e o ano novo.

Ao professor Jader dos Santos Cruz pela participação em minha banca em ocasião tão inóspita.

Aos colegas do laboratório de eletrofisiologia.

À Manu que me acompanho nesse trabalho desde o seu início.

Aos meus amigos e família.

A CAPES e a FUNCAP cujo financiamento tornou possível a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INDICE DE GRÁFICOS .....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Química e Farmacologia do Eugenol.....	13
1.2. Efeitos Eletrofisiológicos do Eugenol.....	17
1.3. O Gânglio Cervical Superior .....	21
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS. ....</b>	<b>24</b>
3.1. Material Biológico .....	24
3.2. Microeletrodos e Configuração do “set up” .....	24
3.3. Protocolo de “current clamp” e compensação de resistência.....	27
3.4. Análise dos dados.....	30
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>

**INDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1: EUGENOL E OUTROS COMPOSTOS RELACIONADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 2: BIODSSÍNTESE DA FENILALANINA E DA TIROSINA EM <i>E. COLI</i> (STRYER <i>ET AL.</i> 2002).....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 3: BIODSSÍNTESE DE ALGUNS FENILPROPANOIDES A PARTIR DA FENILALANINA .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 4: CÂMARA DE SUPERFUSÃO.COM DETALHE DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 5: PROTOCOLO DE INJEÇÃO DE CORRENTE.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 6: COMPENSAÇÃO DA RESISTÊNCIA: DIAGRAMA DOS CIRCUITOS DO AXOCLAMP 2B.....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 7: CURSO TEMPORAL DA INIBIÇÃO E RECUPERAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO. ....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 8: REGISTRO DO POTENCIAL DE AÇÃO. ....</b>	<b>36</b>

**INDICE DE GRÁFICOS**

**GRÁFICO 1: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A AMPLITUDE PICO A PICO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR. .... 33**

**GRÁFICO 2: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A DURAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR. .... 34**

**GRÁFICO 3: TEMPOS REQUERIDOS PARA A INIBIÇÃO E RECUPERAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 39**

**GRÁFICO 4: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A EXCITABILIDADE DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR. .... 40**

**GRÁFICO 5: EFEITO DO EUGENOL SOBRE O POTENCIAL DE REPOUSO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 41**

**GRÁFICO 6: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A RESISTÊNCIA DE ENTRADA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 43**

**ÍNDICE DE TABELAS**

**TABELA 1. EFEITO DO EUGENOL SOBRE A AMPLITUDE PICO A PICO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 33**

**TABELA 2: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A DURAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 34**

**TABELA 3: TEMPOS REQUERIDOS PARA A INIBIÇÃO E RECUPERAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 39**

**TABELA 4: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A EXCITABILIDADE DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 40**

**TABELA 5: EFEITO DO EUGENOL SOBRE O POTENCIAL DE REPOUSO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 41**

**TABELA 6: EFEITO DO EUGENOL SOBRE A RESISTÊNCIA DE ENTRADA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR..... 43**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AP</b>	Action Potential
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração na qual uma droga exerce seu efeito com metade da potência máxima
<b>EUG</b>	Eugenol
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GCS</b>	Ganglio Cervical Superior
<b>GIRK</b>	G-Protein-Gated-Potassium-Channels
<b>HEK</b>	Human Enbrionary Kidney
<b>HVACC</b>	High Voltage Activated Calcium Channels
<b>P.M.</b>	Peso Molecular
<b>SCG</b>	Superior Cervical Ganglia
<b>TRP</b>	Transient Receptor Potential
<b>TRPV-1</b>	Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1
<b>US\$</b>	Dólar Americano

**ABSTRACT**

Eugenol (EUG) is a fenilpropanoid obtained from the essential oils of plants such as clove and basil which has widespread use in dentistry on the sealing of the dental root cavity. EUG possesses, amongst others, an analgesic effect that may be due to a local anesthetic like inhibition of sodium currents, to a capsaicin like activation of TRPV-1 receptors or to both. Sharp microelectrode current clamp experiments were carried out in non dissociated neurons of rat superior cervical ganglia (SCG) which do not express TRPV-1 channels. EUG (0,1 – 2.0mM) reversibly inhibited the peak to peak amplitude of the SCG neurons action potential in a concentration and time dependent manner. EUG 0,1mM induced no significant alteration of action potential (AP) parameters in all 14 cells tested while 0,6mM and 2mM EUG induced reversible AP inhibition in 6 out of 17 and 10 out of 12 cells tested, respectively. These frequencies of occurrence of AP inhibition at 0,6 and 2mM were significantly different ( $p = 0,002$ , chi-square test). EUG 0,6mM also took longer than 2mM for both establishment and recovery of this effect. The time for establishment of EUG-induced AP inhibition, 50% recovery and maximum recovery suffered a 3, 9 and 11 fold increase respectively. EUG 0,6mM also produced a reversible decrease in membrane input resistance while 2mM did not. Those effects have lead us to propose that EUG besides acting on the voltage-dependent sodium channels of the SCG neurons, possesses a yet second mode of action that is dependent on time, responsible for the decrease in input resistance and capable of increasing the potency of EUG analgesic effect.

Keywords: eugenol, superior cervical ganglia, action potential.

## RESUMO

O eugenol (EUG) é um fenilpropanoide (pequenas substâncias aromáticas voláteis sintetizadas por plantas a partir da fenilalanina) obtido pelo fracionamento dos óleos essenciais de plantas bastante familiares como o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) e o manjeriço (*Ocimum basilicum*). O EUG é empregado com o óxido de zinco na composição de uma resina utilizada para o selamento e desinfecção da raiz dentária no tratamento de canal possuindo, dentre outros, efeito analgésico. Esse efeito pode se dever ao bloqueio de canais para sódio ativados por voltagem (assim como os anestésicos locais), a um mecanismo similar ao da capsaicina, via ativação do receptor TRPV-1 ou a uma combinação de ambos. Neste trabalho, realizamos experimentos de “current clamp” com microeletrodos em neurônios não dissociados do gânglio cervical superior (GCS) de ratos com o objetivo de avaliar os efeitos do EUG sobre o potencial de ação e sobre as propriedades passivas (potencial de repouso e resistência de membrana) dessas células. O EUG inibiu o potencial de ação desses neurônios de um modo dependente de concentração e de tempo. O EUG 0,1mM não induziu nenhuma alteração significativa no potencial de ação de 14 células testadas, enquanto o EUG 0,6mM e 2mM inibiram o potencial de ação em 6 de 17 e 10 de 12 células respectivamente. Essas frequências de ocorrência de inibição diferiram estatisticamente (teste do qui-quadrado com  $p = 0,002$ ). O EUG 0,6mM produziu seus efeitos mais vagarosamente e também a recuperação desses efeitos foi mais lenta. Os tempos para estabelecimento do efeito, 50% de recuperação e recuperação máxima nessa concentração foram respectivamente 3, 9 e 11 vezes maiores do que na concentração 2mM. O EUG 0,6mM também causou redução reversível na resistência de entrada dos neurônios do GCS. Esses resultados nos levam a acreditar que, além de atuar sobre canais de sódio dependentes de voltagem, o EUG ainda deve exercer um segundo efeito dependente de tempo, responsável pela alteração da resistência de entrada e capaz de aumentar a potência do seu efeito analgésico.

Palavras chave: eugenol, gânglio cervical superior, potencial de ação.

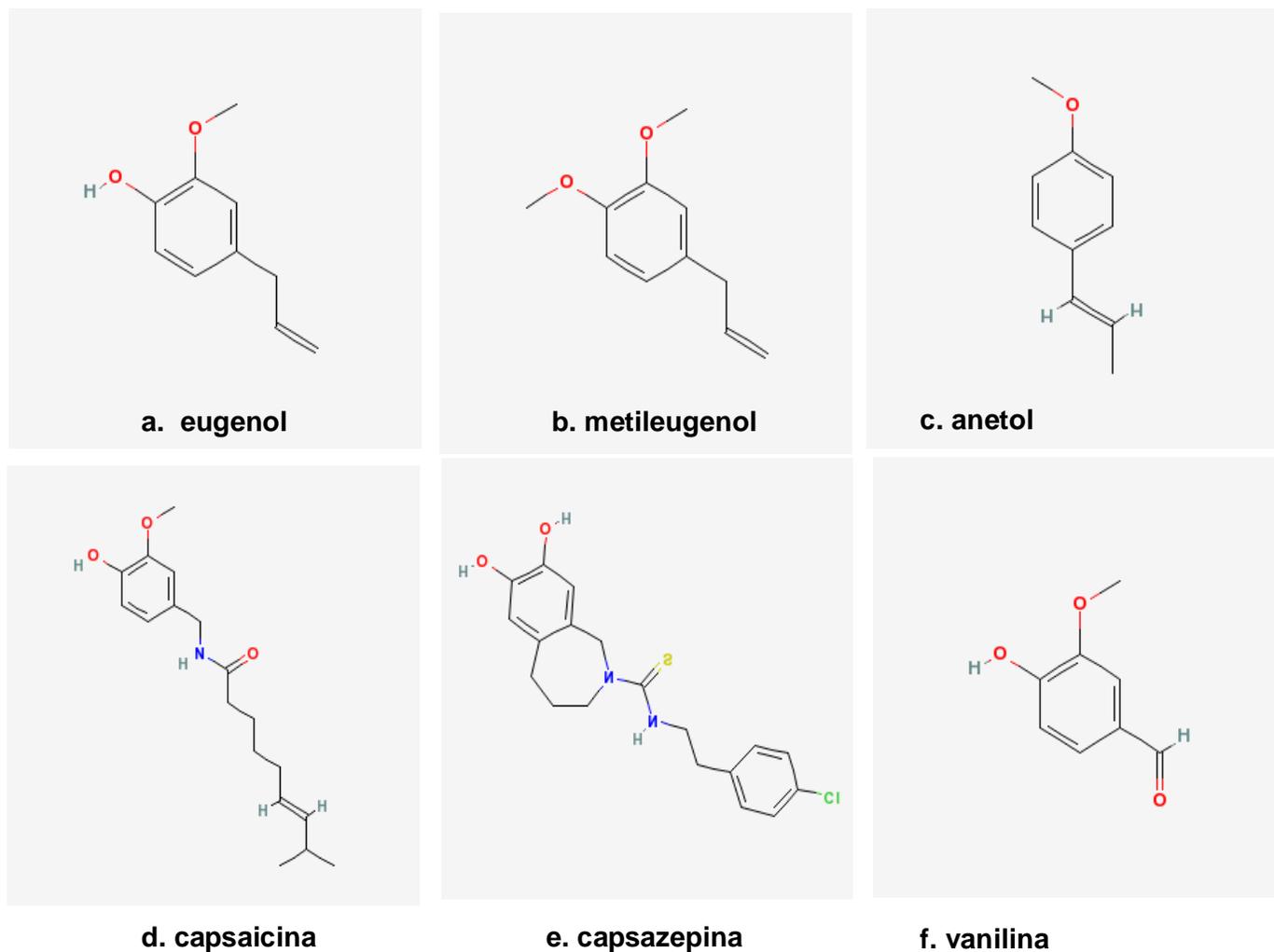
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Química e Farmacologia do Eugenol.

O eugenol (Figura 1.a.) é um fenilpropanóide obtido pelo fracionamento dos óleos essenciais, dentre outras, de plantas bastante familiares como o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) e o manjeriço (*Ocimum basilicum*) (Carvalho de Souza, 2005).

Fenilpropanóides constituem uma categoria de substâncias de pequeno peso molecular (Figura 1), aromáticas e em geral voláteis na qual se incluem além do eugenol, compostos tais como o ácido salicílico, a lignina e as antocianinas, sendo sintetizados por plantas a partir da fenilalanina (Weisshaar & Jenkins, 1998). A fenilalanina, assim como os demais aminoácidos aromáticos, deriva de uma via metabólica que se inicia com a condensação do fosfoenolpiruvato - um intermediário da via glicolítica - e da eritrose 4-fosfato - um intermediário do ciclo das pentoses fosfato - (Figuras 2 e 3). Deste modo, não é correto se referir a esses compostos como monoterpenos que são sintetizados através de uma via completamente diferente a partir da acetil-Coenzima A (Stryer *et al.* 2002).

Não obstante, tanto terpenos como fenilpropanóides, alcalóides e outros compostos voláteis de plantas se enquadram na categoria geral de metabólitos secundários ou mais propriamente metabólitos especiais de plantas. Essa denominação visa enfatizar o fato de que não se tratam de compostos de importância secundária ou de resíduos do metabolismo vegetal e sim de compostos produzidos através de vias metabólicas específicas e que possuem funções bem definidas como atração de dispersores de sementes e de polinizadores e proteção contra herbívoros. (Gang, 2005; Noel *et al.* 2005). Esses compostos, todavia, não possuem atividades biológicas restritas aquelas que desempenham nos organismos que os produzem. Uma vez que se tratam em geral de substâncias aromáticas com fragrâncias e sabores variados, muitos têm sido utilizados nas indústrias de alimentos e cosméticos (Gang, 2005). Além disso, frequentemente exibem efeitos que os qualificam como drogas de uso terapêutico ou na pesquisa.



**Figura 1: Eugenol e outros compostos relacionados.**

**a. Eugenol** (2-methoxy-4-prop-2-enylphenol). P.M.: 164.201080 g/mol

**b. Metileugenol** (1,2-dimethoxy-4-prop-2-enylbenzene. P.M.: 178.227660 g/mol

**c. Anetol** (1-methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]benzene). P.M.: 148.201680 g/mol

**d. Capsaicina** ((E)-N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl] -8-methylnon -6-enamide). P.M.: 305.411880 g/mol

**e. Capsazepina** (N-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-7,8-dihydroxy-1,3,4,5-tetrahydro-2-benzazepine-2-carbothioamide). P.M.: 376.900240 g/mol

**f. Vanilina** (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde). P.M.: 52.147320 g/mol

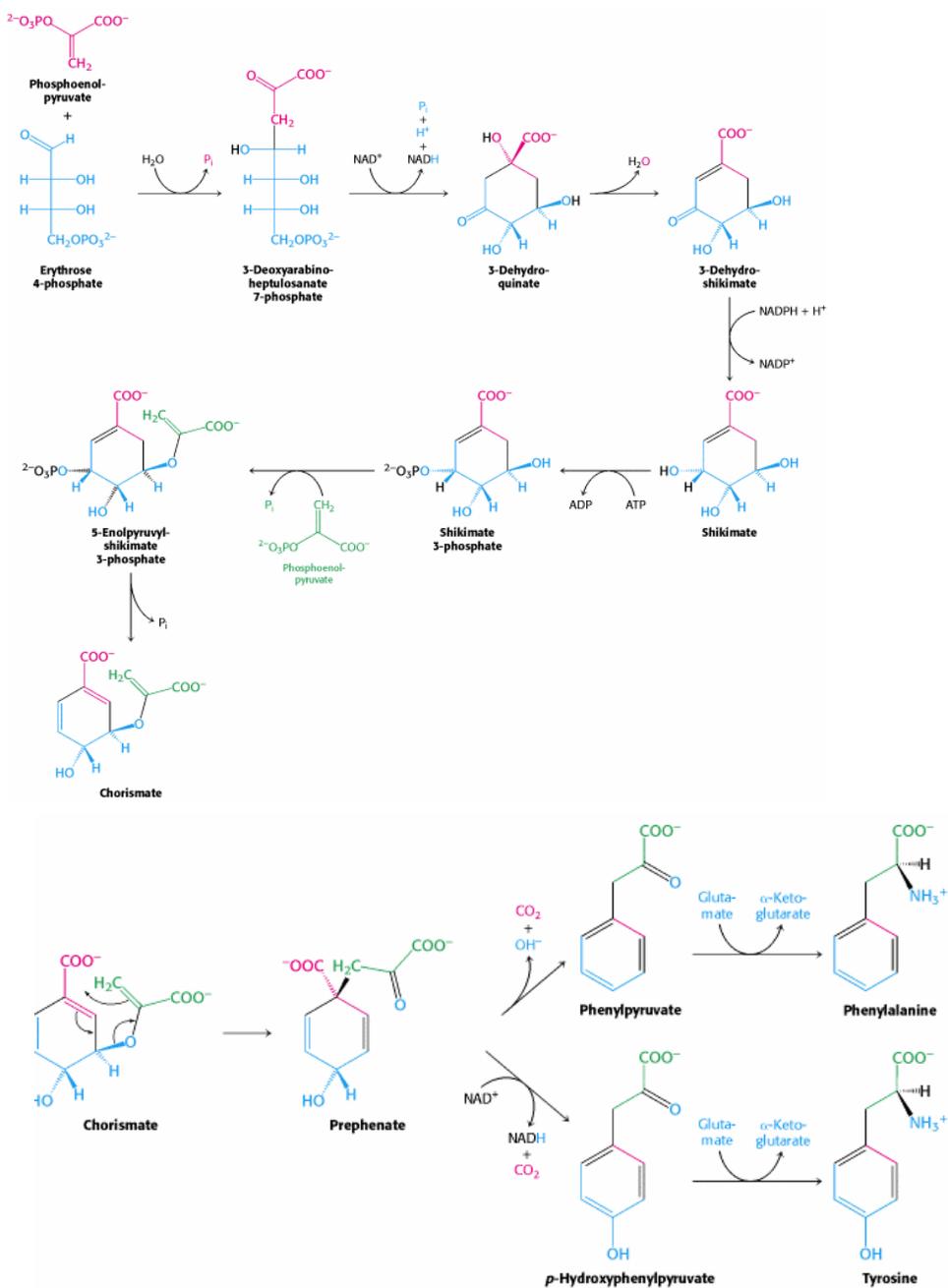


Figura 2: Biossíntese da fenilalanina e da tirosina em *E. Coli* (Stryer *et al.* 2002).

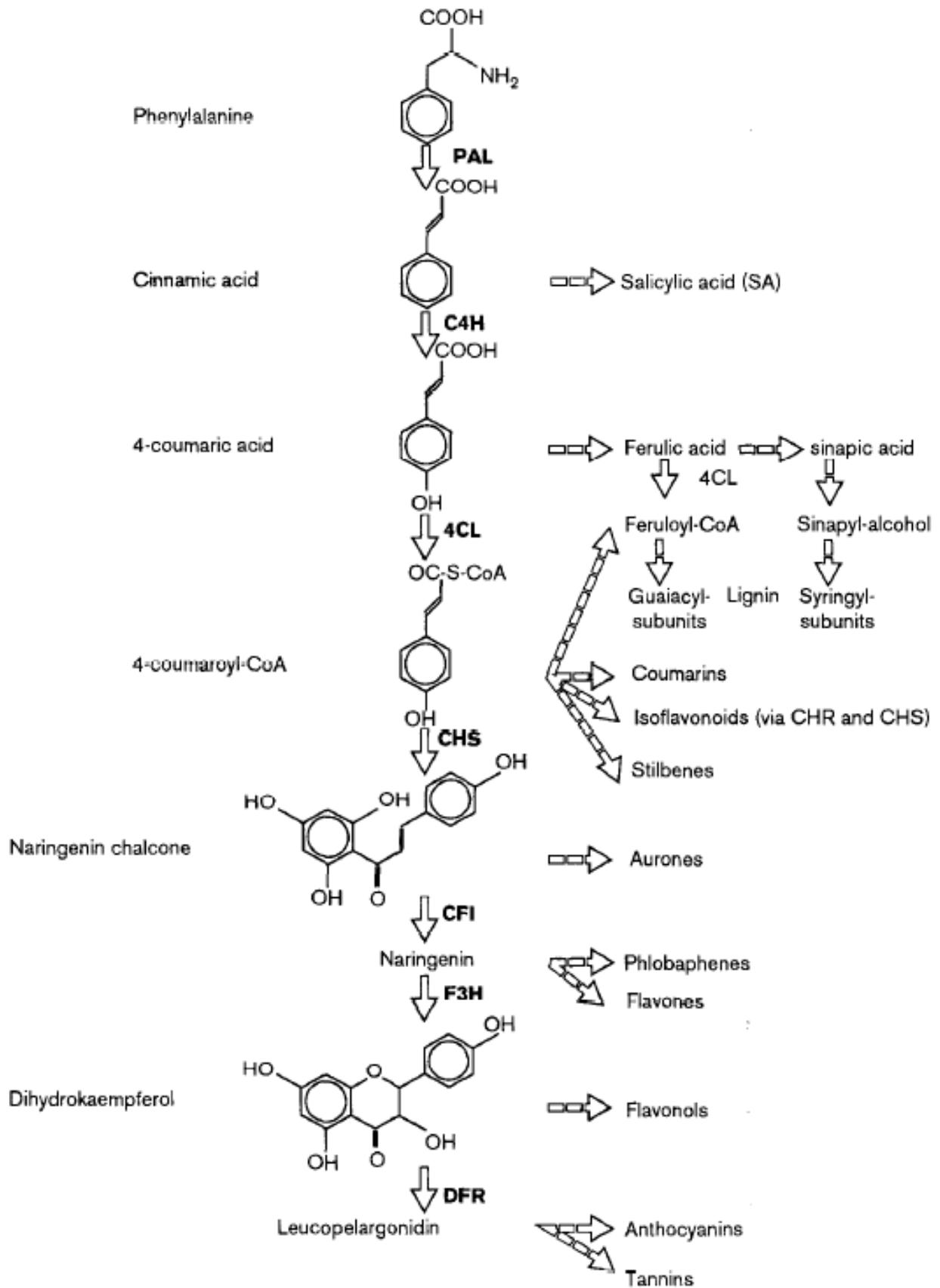


Figura 3: Biossíntese de alguns fenilpropanoides a partir da fenilalanina (Weisshaar & Jenkins, 1998).

Para que se tenha uma idéia da aplicabilidade desses compostos na indústria farmacêutica, o mercado global de medicamentos derivados de plantas movimentou, em 2005, US\$18 bilhões. De 2000 à 2006, foram lançados no mercado 26 novos medicamentos derivados de plantas e até setembro 2007 mais 97 destes se encontravam e fase de testes clínicos com aplicação em áreas como: doenças cardiovasculares, infecciosas, parasitárias e neurológicas, câncer, dor e inflamação (Saklani & Kutty, 2008).

O eugenol, em particular, é empregado com o óxido de zinco na composição de uma resina utilizada para o selamento e desinfecção da raiz dentária no tratamento de canal. Essa resina possui eficácia bem estabelecida contra fungos, bactérias tanto gram-positivas como gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias e nas quais se incluem patógenos conhecidos como o *Staphylococcus aureus* e o *Bacillus subtilis* (Amorim *et al.* 2006; Pizzo *et al.* 2006). Tanto o eugenol como a resina obtida de sua mistura com o óxido de zinco, também possuem efeito antiinflamatório que tem sido atribuído a um mecanismo que está ligado à inibição do fator de transcrição Kappa B e da ciclooxigenase 2. Esse mecanismo é compartilhado com outras drogas como o anetol (Figura 1.c) e a capsaicina (Figura 1.d) e tem sido mostrado que ele pode ser responsável não apenas por efeitos antiinflamatórios como também por efeitos anti-tumorais. (Hashimoto *et al.*, 1988; Huss *et al.* 2002; Aggarwal *et al.* 2004; Aggarwal & Shishodia, 2004; Dorai & Aggarwal, 2004).

O eugenol também foi capaz de prevenir completamente a queda na velocidade de condução no nervo ciático em ratos tratados com estrepzotocina, um modelo experimental para o diabetes que goza de bastante aceitação nos dias de hoje (Nangle *et al.* 2006). É digno de nota, que inibidores específicos da ciclooxigenase-2 (mas não das ciclooxigenases 1 e 3) atenuam a hiperalgesia em ratos tratados com estrepzotocina e que o eugenol, como já comentado, pode inibir a expressão dessa enzima (Matzunaga *et al.* 2007).

## **1.2. Efeitos Eletrofisiológicos do Eugenol.**

O foco desse trabalho, todavia, está nos efeitos eletrofisiológicos do eugenol que são muito

relevantes pelo fato de que podem constituir o mecanismo através do qual o eugenol exerce efeitos antinociceptivo e anestésico, documentados na literatura. O efeito antinociceptivo do eugenol pôde ser demonstrado tanto no teste da formalina - nesse modelo ele foi capaz de reduzir a dor de origem neurogênica na primeira fase do teste enquanto o metileugenol (Figura 1.b) foi capaz de suprimir a dor de origem inflamatória na segunda fase (Ohkubo & Shibata, 1997; Yano *et al.* 2006) - como no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Okubo, & Shibata, 1997). Guenette *et al.* (2006) puderam também demonstrar efeito anestésico geral do eugenol administrado intravenosamente em ratos e atribuíram tal efeito a uma modulação (anteriormente descrita) pelo eugenol de receptores GABA (Yano *et al.* 2006; Aoshima & Hamamoto, 1999) em acordo com a hipótese que atribui a ação dos anestésicos gerais a um mecanismo que consiste da hiperpolarização dos neurônios da alça hipotalâmica-cortical devido à ativação desses receptores. (Ärhen *et al.* 2003). Meyer (2006) sustenta, todavia, que o efeito anestésico geral do eugenol observado em ratos pode não se dever a antinocicepção, mas ao bloqueio da transmissão neuromuscular e a propagação do potencial de ação no músculo esquelético devido à inibição de receptores nicotínicos assim como se observa em altas doses de anestésicos locais. De fato, o eugenol parece se comportar como um agente local, sendo capaz de inibir a propagação do potencial de ação composto tanto no nervo vago quanto no ciático de ratos (Brodin, 1985; Cruz, 2002). Ainda não está claro, todavia, se o eugenol produz esses efeitos através do bloqueio de canais de sódio ativados por voltagem (assim como os anestésicos locais) ou por um mecanismo similar ao da capsaicina via ativação do receptor TRPV-1 (agonistas desses receptores também são capazes de gerar bloqueio da condução em nervos periféricos - Kissin, 2008).

Algumas evidências sustentam a hipótese da ação do eugenol através de um mecanismo semelhante aquele dos anestésicos locais. Foi demonstrado, por exemplo, que o eugenol bloqueia os canais de sódio ativados por voltagem em neurônios dos gânglios da raiz dorsal ligando-se ao canal de sódio preferencialmente em seu estado fechado, mas também com menor afinidade ao canal em estado inativado (Carvalho de Souza, 2005) e que em neurônios do gânglio trigêmeo, o eugenol inibe

os potenciais de ação e correntes de sódio em células tanto sensíveis como insensíveis a capsaicina ou a tetrodotoxina e em nenhum caso a capsazepina (um antagonista seletivo de canais TRPV-1: Figura 1.e) foi capaz de bloquear esses efeitos (Park *et al.* 2005). Nesse mesmo modelo e mais uma vez tanto em células sensíveis como insensíveis a capsaicina, o eugenol também foi capaz de inibir correntes de cálcio ativadas por voltagem (HVACC: “Hight Voltage Activated Calcium Currents”) bem como correntes de potássio. Muito embora a capsaicina também seja capaz de inibir correntes de cálcio ativadas por voltagem (HVACC), o eugenol foi capaz de inibir essas correntes mesmo na presença da capsazepina ou em sistemas que não expressam receptores TRPV-1 (Lee *et al.* 2005; Li, *et al.* 2007).

Outros resultados, todavia, tem apontado na direção de um mecanismo de ação para o efeito antinociceptivo do eugenol similar aquele da capsaicina. O eugenol compartilha similaridade estrutural com esse composto em sua porção aromática e muito embora esse seja conhecido por seu efeito analgésico enquanto aquela é prontamente identificada por sua ação irritante, tanto o eugenol pode provocar irritação quando em contato com as mucosas como a capsaicina pode exibir efeito antinociceptivo. De fato, ambos são reconhecidos como agentes bifásicos que provocam num primeiro momento irritação para adiante exibir um efeito analgésico tardio (Yang, *el al.* 2003; Carvalho de Souza, 2005).

Um estudo recente (Wang *et al.* 2007) mostrou que a capsaicina também é capaz de inibir canais de sódio tanto de células musculares como nervosas expressos em sistemas heterólogos, todavia o mecanismo clássico para a atuação da capsaicina é aquele que se dá via ativação do receptor TRPV-1. Os receptores TRP (“transient receptor potential”) constituem uma grande família de canais de cátions não específicos e em geral sem dependência de voltagem. Esses canais são ativados por uma série de agentes químicos e também físicos outros além da voltagem, como o calor e estímulos mecânicos. A subfamília TRPV é assim denominada devido ao fato do canal TRPV-1, o primeiro da família a ser identificado e clonado, ser modulado por vanilóides - substâncias que apresentam uma porção aromática similar à vanilina (Figura 1.f). Os canais TRPV-1 são permeáveis

preferencialmente ao cálcio exibindo condutância 10 vezes maior para esse íon do que para o sódio, esse canal também é modulado por temperatura e voltagem, mas a ligação de vanilóides permanece como mecanismo principal para seu acionamento (Pedersen, 2005; Caterina *et al.* 2007).

A ativação dos canais TRPV-1 em nervos periféricos, leva a um influxo de cálcio que despolariza os mesmos e pode iniciar potenciais de ação e a percepção da dor. A excitação de neurônios sensitivos por agonistas de receptores TRPV-1, todavia, é seguida por um período refratário com a eventual dessensibilização dos receptores TRPV-1 e no qual a excitabilidade desses neurônios é reduzida (Baamonde *et al.* 2005; Kissin, 2008) daí resulta um efeito analgésico do qual se tem tirado proveito no tratamento da dor ligada a processos neuropáticos como aqueles decorrentes do diabetes (Forst *et al.* 2006).

Graças à utilização da capsazepina, que antagoniza com grande especificidade os efeitos da capsaicina, alguns resultados puderam sugerir a hipótese de que o eugenol agiria em um sítio celular comum ao da capsaicina mesmo antes da identificação desse sítio após a clonagem do receptor TRPV-1. Ohkubo & Shibata (1997) mostraram que a capsazepina é capaz de abolir o efeito anti-noceptivo tanto do eugenol quando do guaiacol no teste da formalina enquanto Ohkubo & Kitamura (1997) mostraram que o eugenol é capaz de gerar, em neurônios dos gânglios da raiz dorsal, uma corrente de entrada sensível a capsazepina. Essa corrente foi fortemente inibida pela depleção do cálcio na solução extracelular, mas apenas fracamente inibida pela depleção do sódio (o canal TRPV1 tem condutância cerca de 10 vezes maior para o cálcio). O dado mais consistente em favor da ação do eugenol sobre receptores TRPV-1, todavia, foi a demonstração direta por Yang *et al.* (2003) do efeito do eugenol sobre esses canais. Uma vez transfectadas com esses receptores, células HEK exibiram, quando perfundidas tanto pelo eugenol como pela capsaicina, uma corrente de entrada tendo sido mostrado que se tratava de uma corrente de cálcio através de microscopia de fluorescência com fura-2. Essa corrente pôde ainda em ambos os casos ser inibida pela capsaicina. Yang *et al.* (2003) utilizando os mesmos métodos ainda puderam mostrar que o eugenol foi capaz de gerar uma corrente de cálcio em células sensíveis a capsaicina do gânglio trigêmio e que essa

corrente era bloqueada pela capsazepina, resultando, portanto, da ativação do receptor TRPV-1.

Em síntese, os resultados dos estudos do efeito do eugenol sobre células nervosas e canais iônicos, em especial aqueles obtidos no gânglio trigêmio, parecem sustentar bem ambas as hipóteses que buscam explicar o efeito analgésico do eugenol. Uma comparação da potência dos efeitos do eugenol sobre canais de sódio e sobre canais TRPV-1 poderia ser decisiva em determinar qual desses mecanismos tem ação proeminente (ou se atuam em conjunto), mas esses dados são escassos. Nos gânglios da raiz dorsal onde estão disponíveis eles favorecem a ação através do canal TRPV-1 uma vez que a  $CE_{50}$  para geração da corrente para dentro registrada nessas células em resposta a aplicação do eugenol é bem menor (0,73mM) do que aquela registrada para a inibição das correntes de sódio nesse mesmo modelo (3,35mM) (Ohkubo, & Kitamura, 2007; Carvalho de Souza, 2005). É válido lembrar, todavia, que a despeito do valor elevado da  $CE_{50}$  do efeito eugenol sobre as correntes de sódio nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal, no nervo ciático (que compreende os axônios desses neurônios) o eugenol inibe o potencial de ação composto com potencia máxima na concentração de 600 $\mu$ M (Cruz, 2002).

### **1.3. O Gânglio Cervical Superior**

Até o momento, os estudos eletrofisiológicos com o eugenol têm sido realizados no gânglio trigêmio (a escolha do mesmo se devendo ao fato de que é ele o gânglio que recebe as fibras aferentes que inervam a boca) ou em modelos de uso corrente na técnica de patch clamp como os gânglios da raiz dorsal e sistemas heterólogos.

Nenhum estudo até agora foi realizado no gânglio cervical superior, um que modelo se firmou no passado como ideal para o estudo com microeletrodo da sinapse colinérgica (suas sinapses são essencialmente deste tipo e foi nesse modelo que os receptores nicotínicos foram primeiramente descritos). O Ganglio Cervical Superior apresenta conveniências como possuir 80% dos seus neurônios de um mesmo tipo (80% fásicos, 15% de hiperpolarização lenta e 5% tônicos) facilitando a realização dos experimentos e comparação dos resultados (Leal-Cardoso, 1993). Além disso, a

escolha de microeletrodos ao invés de eletrodos de patch permite preservar a integridade do meio intracelular (o microeletrodo não dialisa tão drasticamente o citoplasma como a pipeta de patch) o que é importante uma vez que o eugenol também exerce atividades metabólicas que podem ser relevantes na produção de seus efeitos farmacológicos. O eugenol e alguns dos seus análogos apresentam um largo espectro de atividades metabólicas. O eugenol, o isoeugenol, o anetol são potentes moduladores das concentrações intracelulares de glutathione e da enzima glutathione-N-transferase (Drukarch *et al.*, 1997; Rompelberg *et al.*, 1993; Bouthillier *et al.*, 1996; Budavari, 1996; Stohs *et al.*, 1986). Essas substâncias são agentes antioxidantes (Rajakumar & Rao, 1993; KO *et al.*, 1995) inibidoras da peroxidação lipídica (Stohs *et al.*, 1986; Nagababu & Lakshmaiah, 1994; Mansuy *et al.*, 1986) e que atuam como removedores de radicais hidroxila (Taira *et al.*, 1992). Em fibroblastos da mucosa oral humana, *in vitro*, foi demonstrado, em estudo que usou o eugenol em concentrações entre 2 e 4mM que essa substância promove diminuição da concentração intracelular de glutathione e de ATP, que inibe a peroxidação lipídica e o sistema xantina/xantina oxidase (Jeng *et al.*, 1994).

O mais importante, contudo, é o fato de que os neurônios do gânglio cervical superior parecem não expressar receptores TRPV-1 (Helliwell, *et al.* 1998; Ichikawa & Sugimoto, 2001) se qualificando como um modelo conveniente para o estudo isolado dos efeitos do eugenol sobre canais de sódio sem a interferência dos efeitos sobre canais TRPV-1.

Sendo assim, decidimos estudar os efeitos do eugenol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios do gânglio cervical superior, uma vez que esse modelo nos permite investigar os efeitos do eugenol, sem a interferência dos efeitos da ativação do receptor TRPV-1 e mantendo preservado o meio intracelular onde o eugenol exerce seus efeitos metabólicos.

## 2. OBJETIVOS

Geral:

Investigar os efeitos do eugenol sobre o potencial de ação e sobre as propriedades passivas (potencial de repouso e resistência de entrada) dos neurônios do gânglio cervical superior de ratos.

Específicos:

- a. Determinar os efeitos do eugenol sobre o do potencial de ação e sobre as propriedades passivas (potencial de repouso e resistência de entrada) dos neurônios do gânglio cervical superior;
- b. Determinar a dependência de concentração (potência) desse efeito;
- c. Determinar a possível relação entre potência e tempo de exposição;
- d. Investigar o mecanismo de ação através do qual esses efeitos se instalam.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS.**

#### **3.1. Material Biológico**

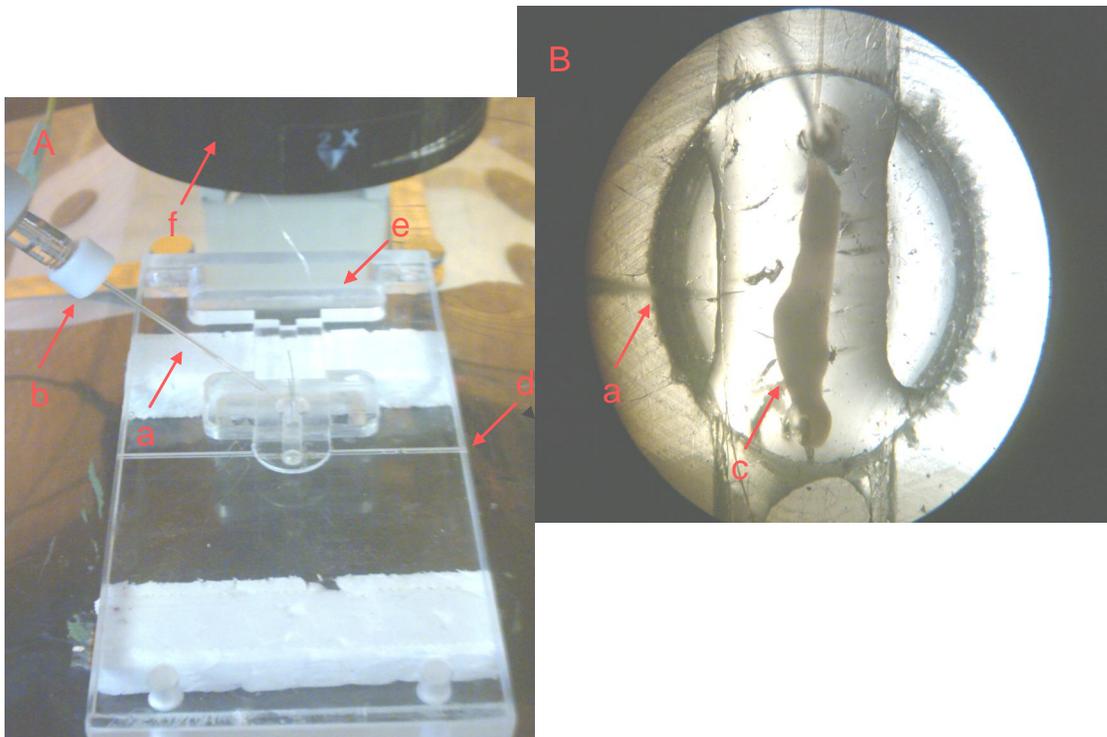
Foram utilizados ratos *wistar* albinos, de ambos os sexos pesando entre 100 e 150g. Os animais foram sacrificados através de concussão cervical e imediatamente após o sacrifício os gânglios cervicais superiores foram dissecados e imersos em solução de Locke (NaCl 136mM, KCl 5,6mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,3mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2mM. pH: 7,2-7,4). Todo tecido conjuntivo aderente era então cuidadosamente removido dos gânglios que eram utilizados de imediato ou no dia seguinte, situação na qual eram mantidos na geladeira a 4°C. Para realização dos experimentos, os gânglios eram fixados no fundo de Sylgard (Dow Corning, Midland, MI, USA) de uma câmara de superfusão onde eram mantidos sob um fluxo constante de solução de Locke + dimetil-sulfóxido 0,2 % ou solução de Locke + dimetil-sulfóxido 0,2 % + eugenol. O eugenol era administrado através da troca da solução de perfusão. O fluxo era mantido por gravidade e o líquido era removido da câmara por uma bomba peristáltica que retirava a solução de um reservatório no fundo da câmara onde também era ligado o aterramento da solução extracelular (Figura 4).

#### **3.2. Microeletrodos e Configuração do “set up”**

Para o empalamento dos neurônios, foram utilizadas micropipetas fabricadas a partir de capilares de borosilicato (Diâmetro externo: 1mm; diâmetro interno: 0,5mm: Sutter Instruments, Novato, CA, USA) em um puxador de micropipetas (modelo P-97, Sutter Instruments,). Depois de preenchidas com solução de KCl 3M e conectadas a um holder (modelo HL-U, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) com fio de prata delgado eram obtidos microeletrodos de prata/cloreto de prata com resistência de ponta entre 40 e 100 MΩ. O holder era conectado a um “headstage” (modelo 34198 HS-2A, ganho: 0,1x - Axon Instruments) esse conjunto era móvel preso a um micromanipulador hidráulico (Narishige Scientific Instruments, 27 9 Minami Karasuyama, 4 Chome Setagaya, Tokyo Japan) utilizado para se realizar os empalamentos e mantido no interior da

gaiola de Faraday. O restante do equipamento eletrônico era conectado ao “headstage” e mantido fora da gaiola.

Esse equipamento consistia de um eletrômetro axoclamp 2b (Axon Instruments) conectado ao headstage e a uma placa de interface analógico-digital de 12 bits (digidata 1.200 series, Axon Instruments) a qual fazia a conexão desse a um computador equipado com o software pClamp 6.1 (Axon Instruments). Um sincronizador “homemade” era também conectado à digidata e sinalizava o início de cada episódio de geração de protocolos e aquisição de dados para todo o sistema.



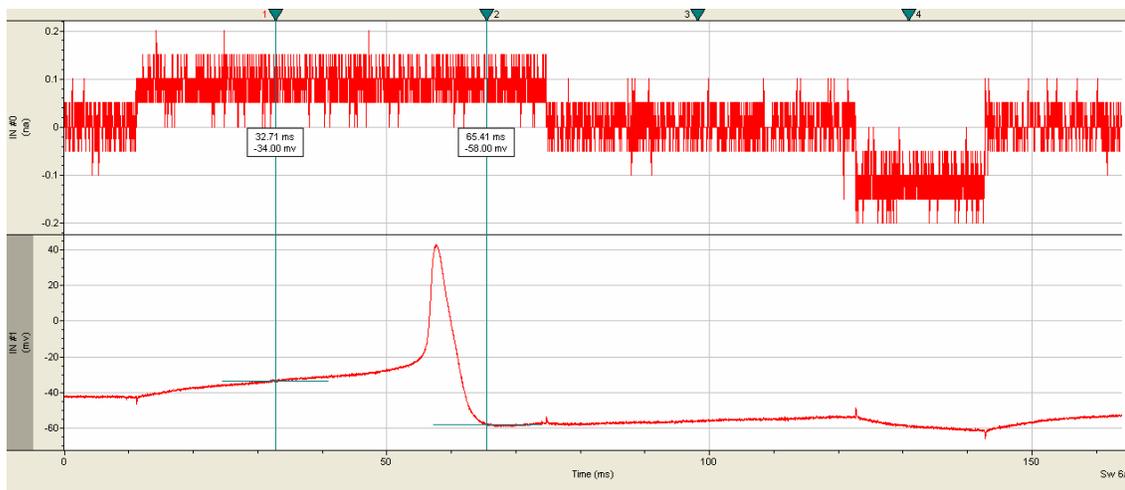
**Figura 4: Câmara de superfusão.** **A.** câmara de superfusão **B.** gânglio cervical superior preso ao fundo de Sylgard. Setas: **a.** micro eletrodo **b.** holder **c.** gânglio cervical superior **d.** entrada do fluxo **e.** reservatório **f.** objetiva.

### 3.3. Protocolo de “current clamp” e compensação de resistência

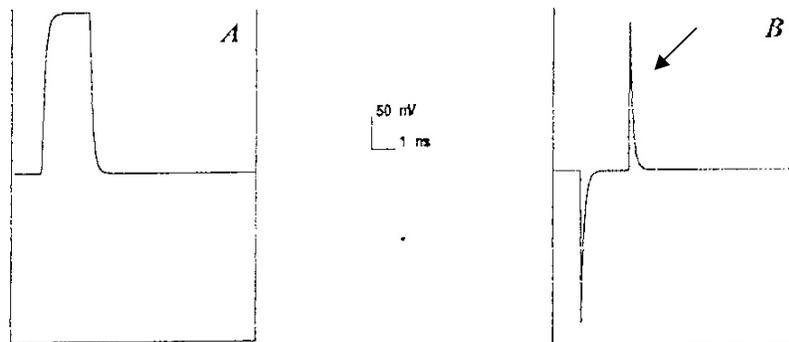
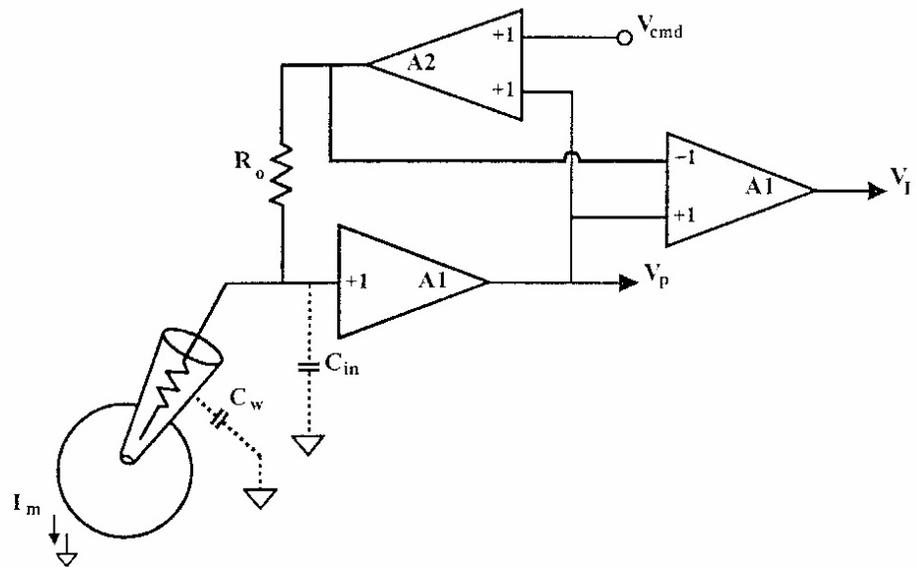
Os protocolos gerados no pClamp 6.1 consistiam de pulsos retangulares de corrente negativos (50ms x 0,1nA) ou positivos (10-500ms x 0,05-0,5nA) para registro da resistência de entrada e geração de potenciais de ação, respectivamente (Figura 5). A injeção de corrente para geração dos protocolos e o registro de voltagem eram contínuos (modo bridge) e a frequência de amostragem era de 20-50 KHz.

Em modo contínuo (bridge) a deflexão de voltagem através do eletrodo era compensada através de um pré-amplificador operacional nos circuitos do axoclamp 2b como mostrado da figura 6. Nesse circuito, as correntes geradas para estimulação das células são passadas tanto para o “headstage” quanto para a entrada inversora de um pré-amplificador operacional. Na entrada não inversora desse pré-amplificador é ligado o sinal colhido pelo microeletrodo. Introduzindo-se no circuito entre o gerador de corrente e a entrada inversora do pré-amplificador uma resistência de valor igual aquela do microeletrodo, chega à entrada inversora uma voltagem igual àquela gerada pela passagem de corrente pelo microeletrodo (uma vez que passa nesse circuito a mesma corrente que passa pelo microeletrodo e que ambos possuem a mesma resistência). Desse modo, a deflexão de voltagem devida à resistência do microeletrodo é completamente subtraída do sinal de saída do pré-amplificador. Essa “compensação” da resistência do eletrodo é feita antes do início dos experimentos introduzindo-se o eletrodo diretamente na solução de Locke.

Nessa situação a única resistência do circuito é aquela do microeletrodo que pode ser compensada variando a resistência entre o gerador de corrente e a entrada inversora do pré-amplificador operacional até que se observe no monitor um traço de voltagem com deflexão zero (Figura 6.).



**Figura 5: Protocolo de injeção de corrente.** O traço superior mostra a corrente injetada na célula, enquanto o inferior mostra o registro da voltagem transmembrana. Os traços são mostrados sem filtragem do modo que foram colhidos. No traço de voltagem, no início e no final de cada pulso é possível notar os transientes devidos à capacitância do microeletrodo.



**Figura 6: Compensação da resistência.** Acima: circuitos do axoclamp 2b no modo bridge. **A** deflexão de voltagem devida à resistênci do eletrodo não compensada. **B**. resistênci compensada, a seta indica o transiente devida à capacitância do eletrodo, (AXON INSTUMENTS INC).

Uma vez que a capacitância dos circuitos do axoclamp é muitas vezes menor que aquela do microeletrodo, mesmo após a resistência deste ter sido adequadamente compensada, pode persistir um transiente como o mostrado na figura 6. Em modo contínuo (bridge), todavia, nenhum esforço é feito para neutralizar a capacitância do microeletrodo uma vez que a duração desse transiente é muito curta (0,25-2ms) e não é concomitante com os sinais que se desejava colher (figura 5).

Os neurônios eram expostos ao eugenol até que se observasse inibição do potencial de ação ou até um tempo máximo de 5 minutos. Em muitos casos, esse tempo não foi suficiente para que fosse atingido o estado estacionário do efeito do eugenol, mas optamos por não estendê-lo para que fosse possível observar a reversão do mesmo. Os registros realizados antes da exposição ao eugenol serão referidos daqui em diante como controle e aqueles realizados no período pós-exposição serão referidos como recuperação.

### **3.4. Análise dos dados**

Só foram considerados para análise experimentos nos quais os efeitos observados fossem reversíveis após lavagem (mesmo que apenas parcialmente) e nos quais os neurônios apresentassem antes da exposição ao eugenol potencial de repouso  $\leq 45\text{mV}$ , potencial de ação de amplitude  $\geq 50\text{mV}$  e resistência de entrada  $\geq 30\text{M}\Omega$ . Os traçados foram analisados inicialmente com o software clampfit 8.1 (Axon Instruments), mas as análises estatísticas foram realizadas com os softwares sigmaplot 9.0 e sigmastat 3.1 (Systat software, Inc. San Jose, CA, USA). A análise estatística foi feita através de OneWay ANOVA e turkey ou do teste do qui-quadrado. Todos os resultados considerados estatisticamente significantes passaram nesses testes com 95% de confiança.

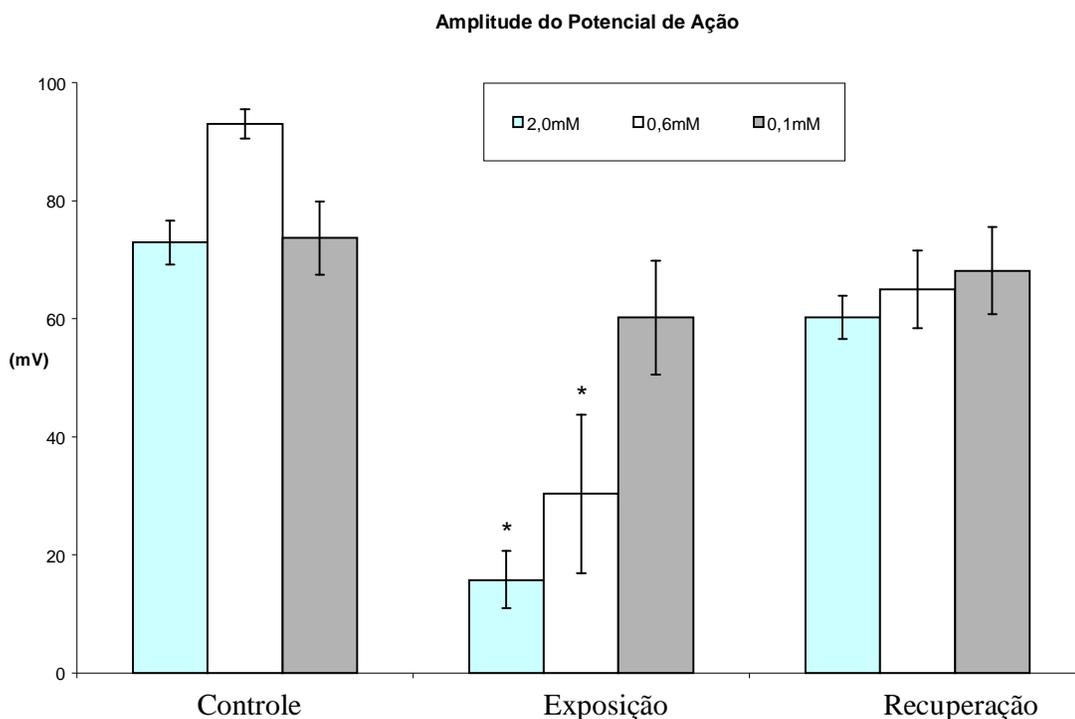
#### 4. RESULTADOS

O eugenol (0,1 – 2,0mM) provocou inibição dependente de concentração do potencial de ação dos neurônios do GSC. O eugenol 0,1mM não induziu nenhuma alteração significativa no potencial de ação de 14 células testadas enquanto o eugenol 0,6mM e 2mM inibiu o potencial de ação em 6 de 17 e 10 de 12 células respectivamente. Essas frequências de ocorrência de inibição diferiram estatisticamente (teste do qui-quadrado com  $p = 0,002$ ).

Nas 6 células em que o eugenol 0,6mM inibiu o potencial de ação, a resposta de voltagem (que antes correspondia ao potencial de ação) teve sua amplitude reduzida em média para 32,6 % do seu valor de controle. Após remoção do eugenol da solução de perfusão houve recuperação em todos os experimentos para um potencial de ação que possuía amplitude em média igual 69,8% da amplitude antes da exposição, esse valor não apresentou diferença estatística quando comparado ao valor de controle. (Gráfico 1 / Tabela 1). Também não houve diferença estatística na duração no nível de 50% da amplitude do potencial de ação entre controle e a recuperação. (Gráfico 2 / Tabela2). Nas 11 células nas quais consideramos não haver bloqueio, o potencial de ação, durante a exposição ao eugenol, apresentou amplitude em média igual a 90,6% daquela registrada durante o controle.

Nas 10 células em que o eugenol 2,0mM inibiu o potencial de ação, a resposta de voltagem teve a sua amplitude reduzida em média para 21,6% do valor de controle ( $n=18$ : uma vez que foi possível realizar até 4 exposições em algumas células) sendo que em treze experimentos esses valores foram menores que 10mV podendo tratar-se apenas de uma resposta local e em três (entre esses dez) deles o bloqueio do potencial de ação foi completo. Após remoção do eugenol da solução de perfusão houve recuperação em todos os experimentos para um potencial de ação que possuía amplitude em media igual 82,6 % da

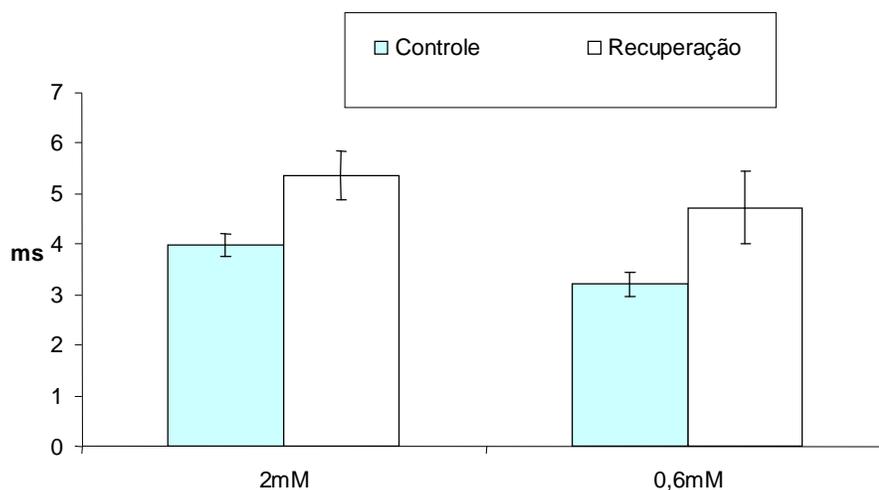
amplitude antes da exposição ao eugenol não havendo diferença estatística entre esses valores. Mais uma vez, também não houve diferença estatística na duração no nível de 50% da amplitude do potencial de ação entre o controle e a recuperação. (Gráfico 2 / Tabela 2). Nas 2 células nas quais consideramos não haver bloqueio, o potencial de ação apresentou amplitude em média igual a 92,47% do controle. (Gráfico1 / Tabela 1/ Figuras 7 e 8).



**Gráfico 1: Efeito do eugenol sobre a amplitude pico a pico do potencial de ação.** Efeito do eugenol sobre a amplitude pico a pico do potencial de ação dos neurônios do GCS, em milivolts (mV). As barras representam o erro padrão. Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes das médias dos demais grupos (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

	2mM		0,6mM		0,1mM	
	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n
	mV		mV		mV	
Controle	72,89 ± 3,73	18	93 ± 2,5	6	73,66 ± 6,2	6
Exposição	15,78* ± 4,82	18	30,3* ± 13,4	6	60,1 ± 9,63	6
Recuperação	60,23 ± 3,64	18	65 ± 3,6	6	68,16 ± 7,42	6

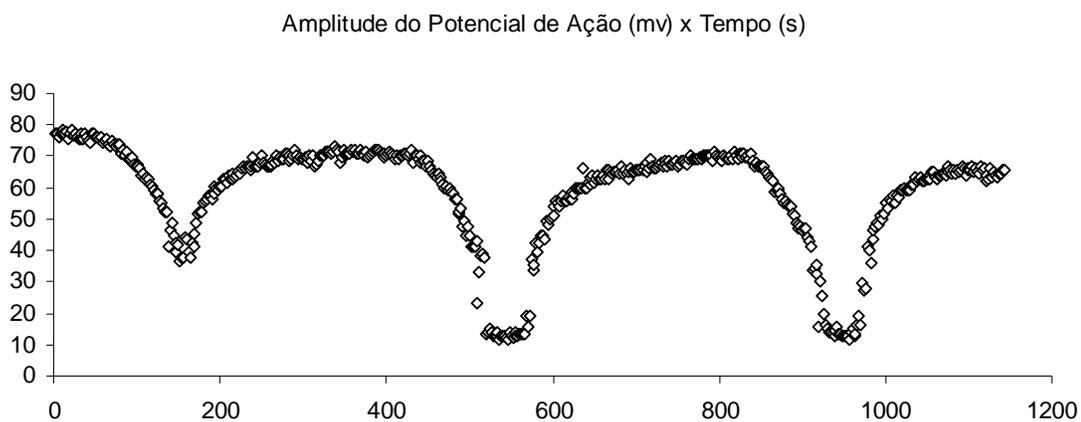
**Tabela 1. Efeito do eugenol sobre a amplitude pico a pico do potencial de ação.** Efeito do eugenol sobre a amplitude pico a pico do potencial de ação dos neurônios do GCS, em milivolts (mV). Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes das médias dos demais grupos (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.



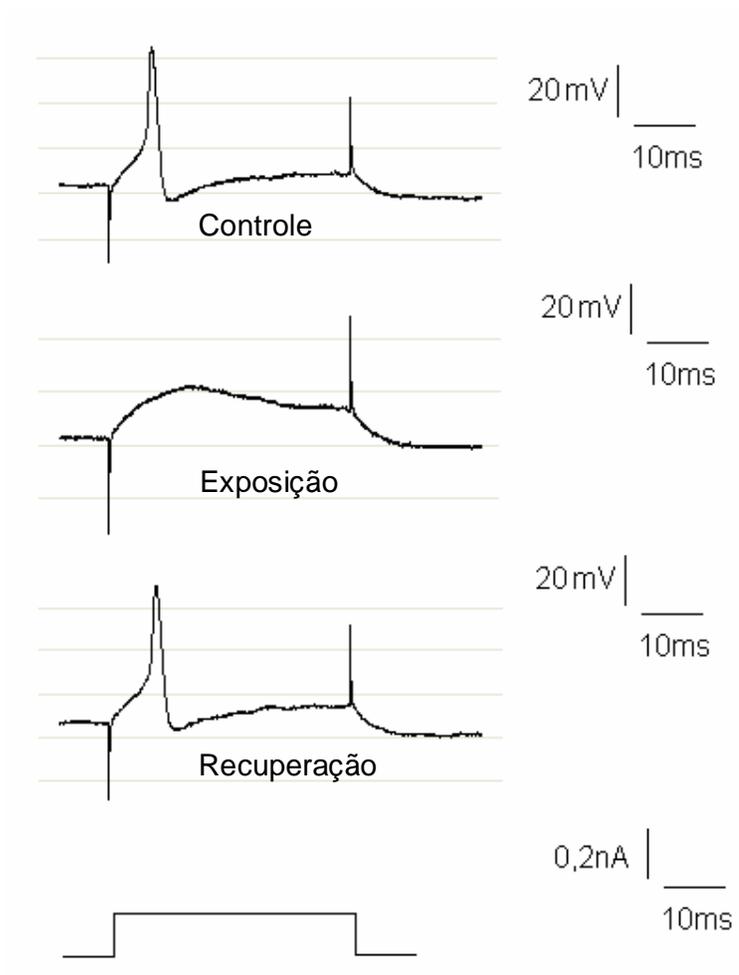
**Gráfico 2: Efeito do eugenol sobre a duração do potencial de ação.** Efeito do eugenol sobre a duração do potencial de ação no nível de 50 % da amplitude máxima (intervalo de tempo transcorrido entre o instante em que o potencial alcança 50% da sua depolarização máxima e o instante em que ele retorna a esse valor), em milisegundos (ms). As barras representam o erro padrão. Não há diferença estatística entre os valores de controle e recuperação para nenhuma das concentrações (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança).

2mM		0.6mM		
Controle	Recuperação		Controle	Recuperação
3,98 ± 0,223	5,367 ± 0,482	média ± Erro Pad.(ms)	3,21 ± 0,24	4,72 ± 0,723
6	6	<i>n</i>	12	12

**Tabela 2: Efeito do eugenol sobre a duração do potencial de ação.** Efeito do eugenol sobre a duração do potencial de ação no nível de 50 % da amplitude máxima (intervalo de tempo transcorrido entre o instante em que o potencial alcança 50% da sua depolarização máxima e o instante em que ele retorna a esse valor), em milisegundos (ms). Não há diferença estatística entre os valores de controle e recuperação para nenhuma das concentrações (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança).



**Figura 7: Curso temporal da inibição e recuperação do potencial de ação.** Amplitude do potencial de ação, em milivolts (mv), registrada em cada episódio de aquisição de dados (frequência dos episódios = 0,5Hz). A célula mostrada sofreu três exposições sucessivas ao eugenol.



**Figura 8: Registro do potencial de ação.** Registro do potencial de ação, de cima para baixo, antes durante a após a exposição ao eugenol. O traço inferior representa a onda quadrada de corrente.

Quanto ao curso temporal para o estabelecimento e recuperação do efeito, estabelecemos três parâmetros para sua análise, a saber: i) o tempo transcorrido para o estabelecimento do efeito com potência máxima (inibição), ii) o tempo transcorrido para recuperação máxima (rec. max.) e iii) o tempo transcorrido para 50% de recuperação (rec. 50%).

O eugenol 0,6mM apresentou notável aumento desses parâmetros. O tempo para estabelecimento do efeito nessa concentração foi cerca de 5 vezes maior que aquele para o eugenol 2mM, o tempo para rec. 50% foi cerca de 9 vezes maior e o tempo para rec. máx. cerca de 11 vezes maior. Para o eugenol 2mM também não existe diferença estatística e os tempos de inibição, recuperação 50% e recuperação máxima, enquanto que para o eugenol 0,6mM existe diferença estatística entre o tempo de recuperação máxima e os demais (Gráfico 3 / Tabela 3).

No que tange ao efeito do eugenol sobre a excitabilidade nos neurônios do GCS, o eugenol 0,6mM ocasionou acréscimo de 125% na corrente limiar para geração do potencial de ação com redução desse acréscimo para 41,6% após remoção do eugenol da solução de perfusão, valor que não foi estatisticamente diferente da controle.

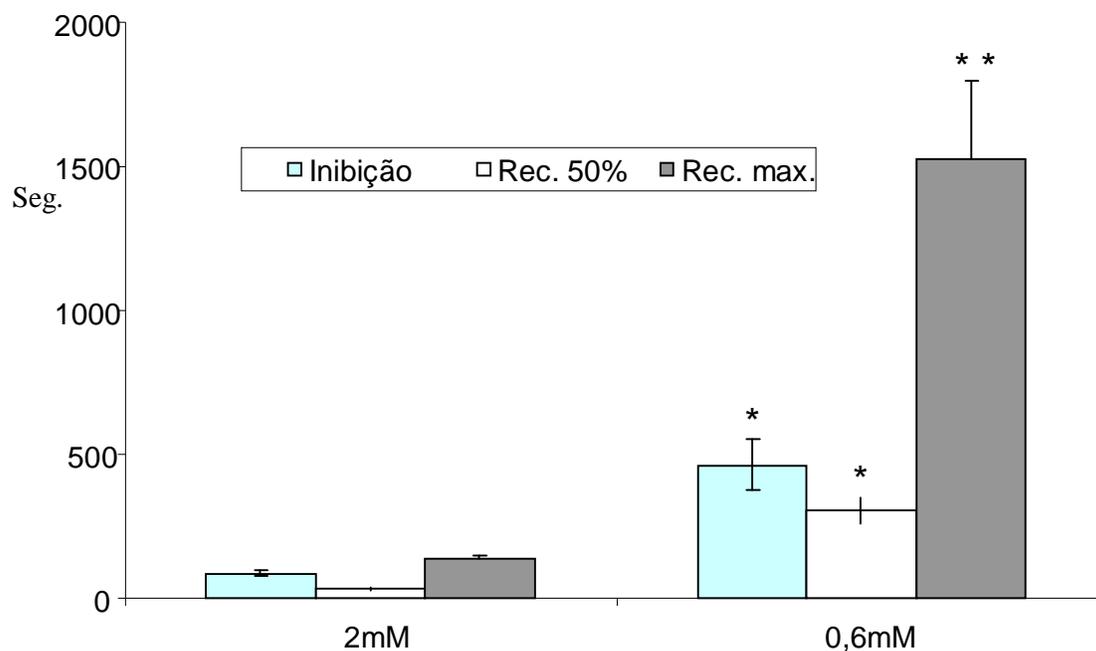
O eugenol 2,0mM ocasionou acréscimo de 178,7% na latência do potencial de ação (intervalo entre o início da onda quadrada de corrente e o pico de amplitude do potencial de ação) para um pulso de corrente de duração e amplitude constante. Após remoção do eugenol da solução de perfusão esse acréscimo foi reduzido para 25% não havendo diferença estatística entre os valores de controle e recuperação. (Gráfico 4 / Tabela 4).

Nenhuma das concentrações testadas alterou o potencial de repouso dos neurônios do gânglio cervical superior. As médias para a exposição ao eugenol e recuperação foram iguais respectivamente a 102% e 101,6% do controle para o eugenol 0,1mM; 95,3 e 93,7% do controle para o eugenol 0,6mM e 98,5 e 106,3 % do controle para o eugenol 2mM, nenhum

desses valores foi estatisticamente diferente dos respectivos valores na fase de controle.

(Gráfico 5 / Tabela 5).

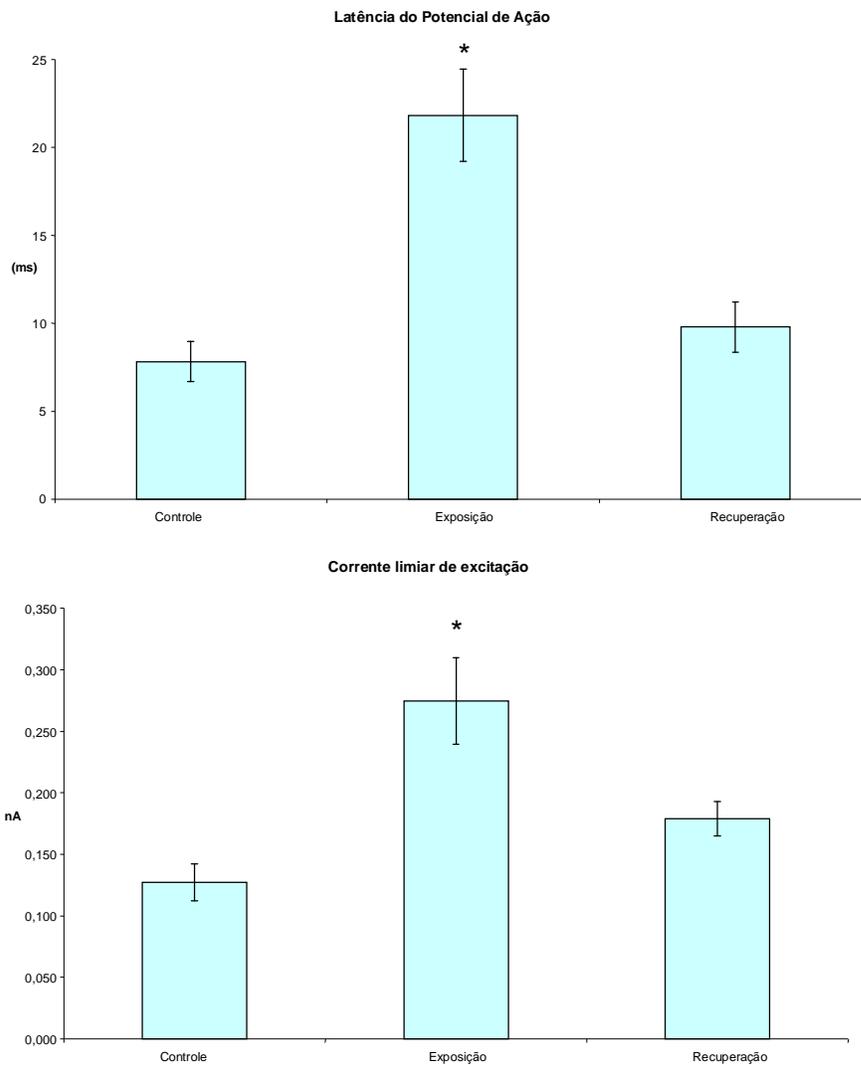
### Curso temporal da inibição do potencial de ação



**Gráfico 3: Tempos requeridos para a inibição e recuperação do potencial de ação.** Tempos de inibição, rec. 50 e rec. max. (ver texto: pág. 31) do potencial de ação dos neurônios do gânglio cervical superior, em segundos (seg). As barras representam o erro padrão. Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes dos valores na concentração 2mM (um asterisco) ou diferentes de todos os demais valores (dois asteriscos) (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança).

	0,2 mM		0,6mM	
	média ± Erro Pad (s)	n	média ± Erro Pad (s)	n
Inibição	464 ± 88,42	11	87,27* ± 7,53	5
Rec 50	304,00 ± 45,02	11	33,33 *± 4,96	5
Rec max.	1528 ± 269,34	11	134,54 **± 14,67	5

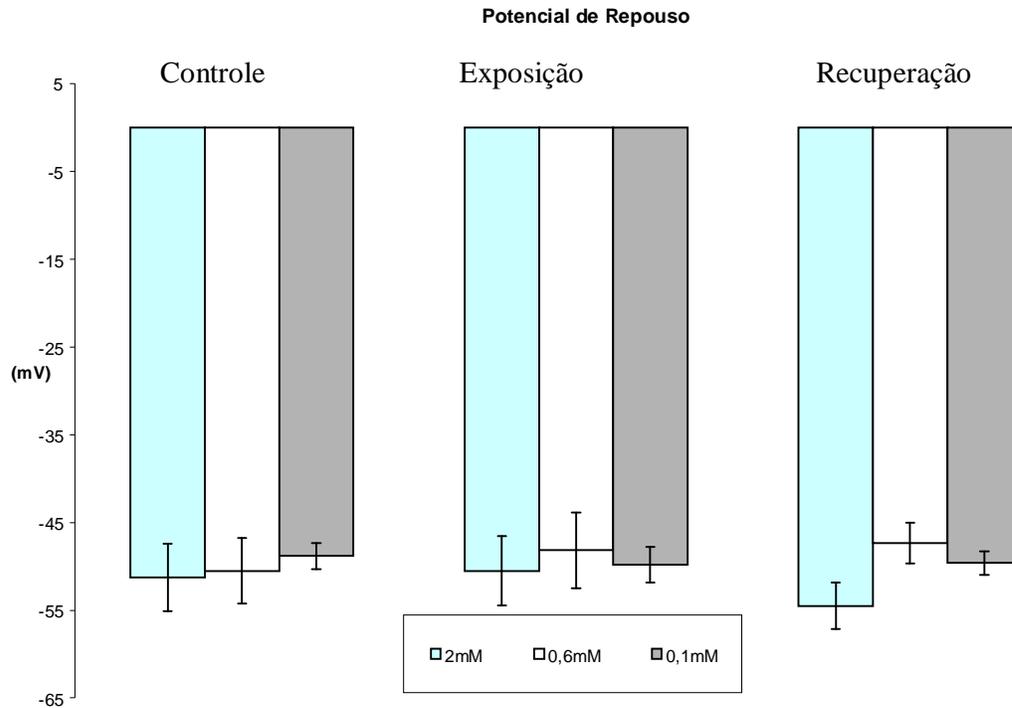
**Tabela 3: Tempos requeridos para a inibição e recuperação do potencial de ação.** Tempos de inibição, rec. 50 e rec. max. (ver texto: pág. 31) do potencial de ação dos neurônios do gânglio cervical superior, em segundos (seg.). Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes dos valores na concentração 2mM (um asterisco) ou diferentes de todos os demais valores (dois asteriscos) (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança).



**Gráfico 4: Efeito do eugenol sobre a excitabilidade dos neurônios do gânglio cervical superior.** Efeito do eugenol sobre a excitabilidade dos neurônios do gânglio cervical superior expressa através da latência do potencial de ação em milissegundo (ms) para um pulso de corrente supra-limiar constante para a concentração 2mM (acima) e da corrente limiar de excitação em nanoamperes (nA) para a concentração 0,6mM (abaixo). As barras representam o erro padrão. Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes do controle (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). São consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

0,6mM Corrente Limiar (nA)			2mM Latência (ms)			
Estabilização	Eugenol	Recuperação		Estabilização	Eugenol	Recuperação
0,127 ± 0,015	0,275* ± 0,035	0,179 ± 0,014	média ± Erro Pad.	7,83 ± 1,14	21,83* ± 2,63	9,79 ± 1,43
6	6	6	N	13	13	13

**Tabela 4: Efeito do eugenol sobre a excitabilidade dos neurônios do gânglio cervical superior.** Efeito do eugenol sobre a excitabilidade dos neurônios do gânglio cervical superior expressa através da latência do potencial de ação em milissegundo (ms) para um pulso de corrente supra-limiar constante para a concentração 2mM e da corrente limiar de excitação em nanoamperes (nA) para a concentração 0,6mM. Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes do controle (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). São consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

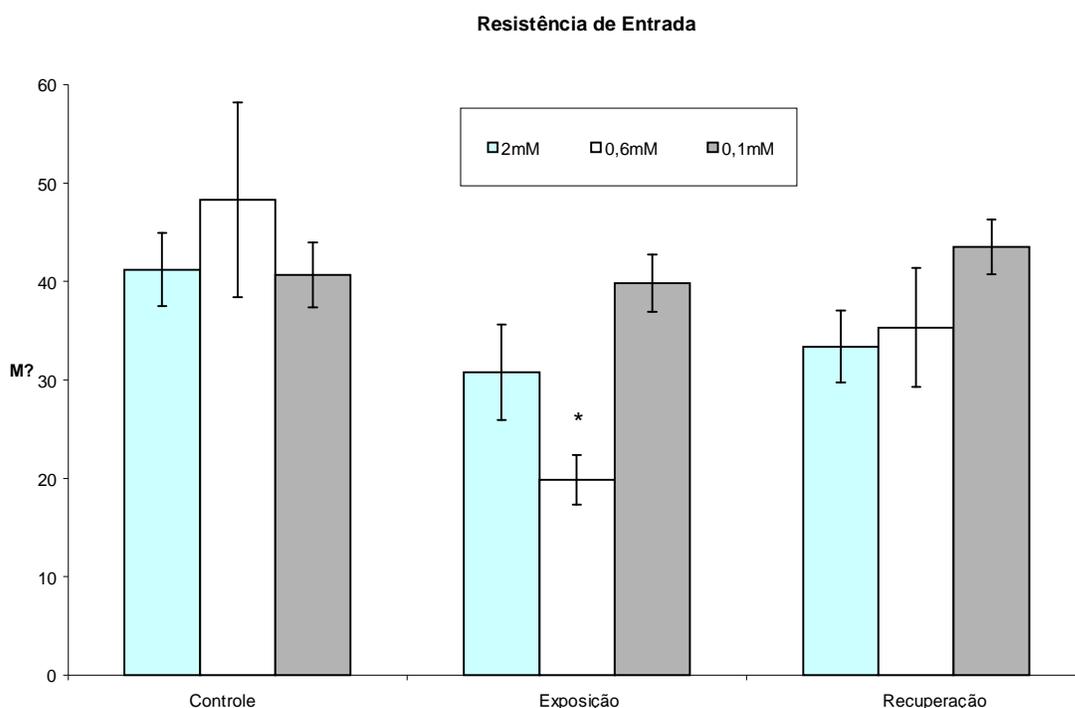


**Gráfico 5: Efeito do eugenol sobre o potencial de repouso.** Efeito do eugenol sobre o potencial de repouso dos neurônios do gânglio cervical superior, em milivolts (mV). As barras representam o erro padrão. Nenhum dos grupos diferiu estatisticamente dos demais (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

	2mM		0,6mM		0,1mM	
	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n
	mV		mV		mV	
Controle	-51,2 ± 3,81	4	-50,5 ± 3,72	6	48,88 ± 1,48	5
Exposição	-50,5 ± 3,92	4	-48,16 ± 4,3	6	48,8 ± 2,01	5
Recuperação	-54,5 ± 2,66	4	-47,3 ± 2,91	6	49,6 ± 1,32	5

**Tabela 5: Efeito do eugenol sobre o potencial de repouso.** Efeito do eugenol sobre o potencial de repouso dos neurônios do gânglio cervical superior, em milivolts (mV). Nenhum dos grupos diferiu estatisticamente dos demais (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

O eugenol 0,6mM foi capaz de provocar redução reversível da resistência de entrada em todas as células em que foi capaz de inibir o potencial de ação. Nessa concentração a resistência de entrada foi reduzida para 41% do valor da fase de controle e durante a recuperação retornou para 73,1% do mesmo, valor que não diferiu estatisticamente do controle. O eugenol 2mM contudo não foi capaz de alterar significativamente a resistência de entrada dos neurônios do gânglio cervical superior o mesmo acontecendo com o eugenol 0,1mM, nessa concentração foram registrados durante a exposição e a recuperação médias que corresponderam respectivamente a 97,5% e 106,9% dos valores na fase de controle e para aquela médias que corresponderam respectivamente a 74,7 e 81% dos valores na fase de controle. Nenhum desses valores diferiu estatisticamente dos seus respectivos controles. (Gráfico 6 / Tabela 6).



**Gráfico 6: Efeito do eugenol sobre a resistência de entrada.** Efeito do eugenol sobre a resistência de entrada dos neurônios do gânglio cervical superior, em megaohms ( $M\Omega$ ). As barras representam o erro padrão. Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes dos demais (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

	2mM		0,6mM		0,1mM	
	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n	média ± Erro Pad.	n
	$M\Omega$		$M\Omega$		$M\Omega$	
Controle	41,2 ± 5,28	5	48,33 ± 9,88	6	40,66 ± 3,28	6
Exposição	30,8 ± 4,16	5	19,83* ± 2,53	6	39,83 ± 2,49	6
Recuperação	33,4 ± 4,51	5	35,33 ± 6,02	6	43,5 ± 2,77	6

**Tabela 6: Efeito do eugenol sobre a resistência de entrada.** Efeito do eugenol sobre a resistência de entrada dos neurônios do gânglio cervical superior, em megaohms ( $M\Omega$ ). Os asteriscos indicam grupos com médias estatisticamente diferentes dos demais (OneWay ANOVA e turkey com 95% de confiança). Para as concentrações de 0,6 e 2mM são consideradas apenas as células onde houve bloqueio do potencial de ação.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos o bloqueio do potencial de ação de neurônios do GCS de ratos pelo eugenol, a dependência de concentração e de tempo para instalação e recuperação desse efeito e ainda que o eugenol o exerce sem provocar quaisquer alterações no potencial de repouso, mas que todavia altera a resistência de entrada da membrana de um modo (curso temporal) que sugere pelo menos duas fases na ação do eugenol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dessas células.

O bloqueio do potencial de ação induzido pelo eugenol 2mM parece sugerir um efeito seletivo sobre canais de sódio acionados por voltagem uma vez que nessa concentração, o eugenol inibe reversivelmente o potencial de ação sem contudo exercer quaisquer efeitos apreciáveis sobre a resistência de entrada ou sobre o potencial de repouso dos neurônios do gânglio cervical superior. Esse resultado coaduna com aqueles de Carvalho de Souza (2005) Park *et.al.* (2005) e Cho *et al.* (2008) e é também consistente com o fato do gânglio cervical superior não expressar receptores TRPV-1 (Helliwell *et al* 1998; Ichikawa & Sugimoto, 2001).

O eugenol 0,6mM todavia bloqueia potencial de ação dos neurônios do GCS de modo algo diferente merecendo destaque: i) o aumento na latência para o estabelecimento e reversão do efeito e ii) o bloqueio do potencial de ação é acompanhado de uma redução na resistência da membrana.

O aumento na latência para o estabelecimento e reversão do efeito do eugenol 0,6mM aponta uma notável dependência de tempo para o estabelecimento desse efeito em baixas concentrações. Quando iniciamos esse trabalho, a literatura registrava grande contradição quanto potência do efeito do eugenol. Carvalho de Souza (2005), por exemplo, apontava efeito inibitório sobre as correntes de sódio dos gânglios da raiz dorsal com uma  $CE_{50} = 3,35mM \pm 0.33$  portanto muito maior do que a concentração (0,6mM) na qual o eugenol inibe com potência máxima o potencial de ação composto no nervo ciático (Cruz, 2002). Obviamente a diferença entre os dois modelos é suficientemente

grande para justificar alguma discrepância, de um lado temos neurônios dissociados em cultura e do outro os axônios daquelas mesmas células seccionados dos seus corpos celulares no nervo íntegro. Não obstante, nossos resultados apontam para uma dependência de tempo para que se possa observar efeito em baixas concentrações do eugenol, tempo que foi um fator de distinção entre os experimentos de Cruz (2002) nos quais o nervo ciático era exposto ao eugenol por até três horas e os experimentos de Carvalho de Souza (2005) com exposições de poucos segundos. A publicação de Cho *et al.* (2008) no momento da escrita desse trabalho trouxe grande apoio a essa hipótese uma vez que esse autor utilizou o mesmo modelo experimental que Carvalho de Souza (2005), mas com tempos de exposição de até dez minutos obtendo assim uma  $CE_{50}$  cerca de dez vezes menor (0,308 ou 0,543mM para células sensíveis ou resistentes ao TTX respectivamente).

Consideramos ainda a possibilidade de que essa dependência de tempo não se deva unicamente ao fato de que lidamos com concentrações mais baixas (de modo que se torna perfeitamente natural se esperar que elas requeressem um tempo maior para exercer seus efeitos), mas que na verdade, ela reflita a existência de um segundo mecanismo de ação distinto da inibição seletiva dos canais de sódio.

Especulamos o seguinte: em primeiro lugar admitimos com base nos nossos resultados com o eugenol 2mM e naqueles de Carvalho de Souza (2005) e Cho *et al.* (2008) que o eugenol se ligue diretamente aos canais de sódio ativados por voltagem. Nesse cenário, seria perfeitamente natural esperar, devido a lei da ação das massas, que o eugenol 0,6mM requisesse um tempo maior para se ligar a uma fração similar de canais de sódio.

Uma vez que utilizamos um tempo de exposição mais alto para o eugenol 0,6mM admitimos também que ele se ligou a uma fração similar de canais de sódio (o percentual de inibição nas duas concentrações não difere estatisticamente). Sendo assim, após a substituição da solução de perfusão, conforme o eugenol deixasse os canais, esperar-se-ia que em ambas as concentrações fossem obtidos tempos de recuperação similares. Todavia, não apenas a latência para instalação do efeito do eugenol 0,6mM é mais alta, mas também a latência para recuperação desse efeito, aliás, principalmente a

latência para recuperação é maior nessa concentração. Assim, nos parece bastante provável que exista um segundo mecanismo de ação para o eugenol, independente da ligação com canais de sódio dependente de voltagem. Levando em consideração que esse efeito se manifesta em pequenas concentrações e com grande dependência de tempo, a ativação de um segundo mensageiro intracelular é uma hipótese atraente. Cascatas de sinalização são capazes de produzir efeitos proeminentes quando ativadas (ou desativadas) por pequenas concentrações de ligantes e os efeitos dos segundos mensageiros podem persistir mesmo depois que esses ligantes não estejam mais presentes (Albers *et al.* 2002).

O eugenol 0,6mM também reduziu a resistência de entrada da membrana celular, não sendo possível verificar efeito sobre o potencial de repouso. É possível que a presença de artefatos tenha mascarado alterações no potencial de repouso que deste modo não foram registrados. Pelo fato do cloro ser mais leve do que o potássio (embora a diferença seja pequena) ele se difunde mais rapidamente da pipeta e o acúmulo de cargas leva ao surgimento bastante lento de potenciais na ponta no eletrodo. Esses potenciais ainda que se formem com muita lentidão, não sendo, portanto capazes de interferir com registro do potencial de ação, podem interferir com o registro do potencial de repouso.

Considerando que de fato não houve alteração do potencial de repouso, resta especular que corrente poderia causar alteração na resistência de entrada sem alterar o potencial de repouso. Retificadores de entrada além de serem modulados por segundos mensageiros, apresentam uma maior condutância em potenciais mais negativos, próximos ao potencial de Nerst do potássio (Lu, 2004). Uma vez que utilizamos pulsos hiperpolarizantes para avaliar a resistência de entrada seria uma hipótese atraente supor que o eugenol tenha “modulado” positivamente esses canais de modo que o aumento da sua condutância não tenha se refletido no potencial de repouso, mas que se manifestasse apenas quando o onda quadrada de corrente hiperpolarizava a célula.

Favorece essa hipótese o fato de que certas substâncias que ativam retificadores de entrada modulados por ATP ou pela proteína G (GIRK) produzem efeito antinocepcivo (Ocaña *et al.* 2004).

Uma vez que não há expressão nativa de GIRK no gânglio cervical superior (Velasco & Ikeda, 1998) podemos eliminar esses canais da nossa especulação nos restando os canais modulados por ATP.

É digno de nota que a literatura registra efeito inibitório do eugenol sobre canais de potássio acionados por voltagem (Li, *et al*, 2007), mas havendo inibição esperaríamos observar redução e não aumento na condutância ao potássio resultando em aumento da resistência de membrana.

Essas especulações, entretanto, extrapolam aquilo que é possível concluir com segurança a partir dos nossos dados. O que eles por outro lado parecem sustentar com segurança, e que torna nosso trabalho relevante, é a descoberta da dependência de tempo para instalação do efeito do eugenol. Outros trabalhos (Cruz, 2002, Cho *et al*. 2008) foram produzidos avaliando o efeito de longas exposições, mas nós, pela primeira vez, registramos o aumento da potência do eugenol, utilizando exposições breves e longas no mesmo modelo. Uma vez que também utilizamos um modelo que preserva a integridade do meio intracelular também fomos capazes de demonstrar como esse aumento de potência está vinculado a um mecanismo e ação diferente e possivelmente ligado a algum efeito metabólico do eugenol. Esses dados também sugerem cautela na interpretação dos resultados obtidos no eugenol uma vez que no uso terapêutico, são os efeitos vinculados as longas exposições que são relevantes.

## CONCLUSÕES

- a.** O eugenol inibe o potencial de ação dos neurônios do gânglio cervical superior de modo dependente de concentração e com característica de dependência de tempo;
- b.** O efeito do eugenol possui um componente de atuação mais rápida (segundos) e um componente de atuação mais lenta (minutos)
  - i) O componente de atuação mais rápida (com tempo para estabelecimento em segundo) inibe o potencial de ação e a excitabilidade sem alterar o potencial de repouso e a resistência de entrada dos neurônios do GCS, o que sugere um efeito anestésico local.
  - ii) O componente de atuação mais lenta (com tempo para estabelecimento em minutos) inibe o potencial de ação e a excitabilidade sem alterar o potencial de repouso, mas reduzindo a resistência de entrada. É sugerido que esse componente tardio seja devido a um efeito indireto do eugenol, via ativação de um segundo mensageiro.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. **Annals of the New York Academy of Science**. p.434-41, dez, 2004.

AGGARWAL, B.B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O.N. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. **Expert Opinion in Investigational Drugs**, n.13, v.10 p1327-1338, out, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4<sup>a</sup> ed. Nova Iorque e Londres. Garland Science, 2002.

AMORIM, L.F.G.; TOLEDO, O.A.; ESTRELA, C.R.A.; DECURCIO, D. de A.; ESTRELA, A. Antimicrobial Analysis of Different Root Canal Filling Pastes Used in Pediatric Dentistry by Two Experimental Methods. **Brazilian Dental Journal**, n.17, v.4 p.317-322, 2006.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiating of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, n.63, v.4, p.743-748, abril, 1999.

RHEM, P.; KLEMENT, G.; NILSSON, J. Mechanisms of Anesthesia: Towards Integrating Network, Cellular, and Molecular Level Modeling. **Neuropsychopharmacology**, n.28, p40-47, 2003.

AXON INSTRUMENTS INC. **The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Techniques**. Foster City, CA. 1993.

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; JUAREZ, L.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. TRPV1 desensitisation and endogenous vanilloid involvement in the enhanced analgesia induced by capsaicin in inflamed tissues. **Brain Research Bulletin**, n.67, p.476-481, 2005.

BERG, JEREMY M.; TYMOCZKO, JOHN L.; STRYER, LUBERT. **Biochemistry**, 5<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: W.H. Freeman and Co, 2002.

BRODIN, P. Differential inhibition of A, B and C fibres in the rat vagus nerve by lidocaine, eugenol and formaldehyde. **Archives of Oral Biology**, n.30, v.6, p.477-480, 1985.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, p.108-109, 1996.

CARVALHO DE SOUSA, J. L. **Efeito do eugenol sobre a corrente de Na<sup>+</sup> de neurônios dos gânglios da raiz dorsal de rato**, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

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

CHO, J.S.; KIM, T.H.; LIM, J-M.; SONG, J-H. Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, no prelo.

CRUZ, G. M. P. **Efeito do Eugenol e do Metil-eugenol sobre o Potencial de Ação Composto em Nervo Ciático de Rato**, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

DORAI, T.; AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy **Cancer Letters** n.215, p.129–140, 2004.

FORST, T.; POHLMANN, T.; KUNT, T.; GOITOM, K.; SCHULZ, G.; LÖBIG, M.; ENGELBACH, M.; BEYER, J.; PFÜTZNER, A. The influence of local capsaicin treatment on small nerve fibre function and neurovascular control in symptomatic diabetic neuropathy. **Acta Diabetologica**, n.39, v.1 p.1-6. abril, 2006.

GANG, D. R. Evolution of Flavors and Scents. **Annual Review of Plant Biology**, n.56, p.301–325, 2005.

GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n.29, p.265–270, 2006.

HASHIMOTO S, UCHIYAMA K, MAEDA M, ISHITSUKA K, FURUMOTO K, NAKAMURA Y. In vivo and in vitro effects of zinc oxide-eugenol (ZOE) on biosynthesis of cyclo-oxygenase products in rat dental pulp. **Journal of Dental Research**, n.67, v.11, contracapa, nov, 1988.

HELLIWELL, R.J.A.; MCLATCHIE, L.M.; CLARKE, M.; WINTER, J.; BEVAN, S.; MCINTYRE, P. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. **Neuroscience Letters** n.250, p.177–180, 1998.

ICHIKAWA H, SUGIMOTO T. VRL-1 immunoreactivity in the rat cranial autonomic ganglia. **Neuroreport**, n.12, v.8, 1597-1599, jun, 2001.

JENG, J.H., HAHN, L.J., LU, F.L., WANG, Y.J. & KUO, M.Y.P. Eugenol Triggers Different Pathobiological Effects on Human Oral Mucosal Fibroblasts. **Journal of Dental Research**, n.73, p.1050-1055, 1994.

KISSIN, I. Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long- lasting, with a low level of potential neurotoxicity. **Anesthesia & Analgesia**, n.107, v.1 p.271-281, jul, 2008.

KO, F.N., LIAO, C.H., KUO, Y.N. & LIN, Y.L.). Antioxidant properties of demethyldiisoeugenol. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1285, p.145-152, 1995.

LEAL-CARDOSO, J.H. **Estudo das alterações induzidas imunologicamente e por autacoides sobre enurônios sensitivos isolados e em neurônios em gânglios intactos do sistema nervoso autônomo**. 1993. Tese de Professor Titular Depto. de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE,

LEE, M.H.; YEON, K.-Y.; PARK, C.-K.; LI, H.-Y.; FANG, Z.; KIM, M.S.; CHOI, S.-Y.; LEE, S.J.; LEE, S.; PARK, K.; LEE, J.-H.; KIM, J.S.; OH, S.B. Eugenol Inhibits Calcium Currents in Dental Afferent Neurons. **Journal of Dental Research**, n.84 v.9 p.848-851, 2005.

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<sup>+</sup> currents in trigeminal ganglion neurons. **Journal of Dental Research**, n.86, v.9, p.898-902, set 2007.

LU, Z. Mechanism of Rectification in Inward-Rectifier K<sup>+</sup> Channels<sup>1</sup>. **Annual Review of Physiol**, n.66, p.103-129, 2004.

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

MATSUNAGA, A.; KAWAMOTO, M.; SHIRAIISHI, S.; YASUDA, T.; KAJIYAMA, S.; KURITA, S.; YUGE, O. Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology** n.554, p.12–17. 2007.

MEYER, R. Comment on Guenette, S.A., Beaudry, F., Marier, J.F., and Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 265–270. **Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n.30, p.91, 2007.

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

NANGLE, M.R.; GIBSON, T.M.; COTTER, M.A.; CAMERON, V.E. Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Planta Medica**, n.72, v.6, p.494-500, maio, 2006.

NOEL, J. P.; AUSTIN, M. B.; BOMATI, E. K. Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, n.8, p.249-253, 2005.

OCAÑA, M.; CENDÁN, C.M.; COBOS, E.J.; ENTRENA, J.M.; BAEYENS, J.M.; Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, n.500 p.203- 219, 2004.

OHKUBO T.; SHIBATA, M. The Selective Capsaicin Antagonist capsazepine Abolishes the Antinociceptive Action of Eugenol and Gualacol. **Journal of Dental Research** n.76 v.4, p.848-851, abril, 1997.

OHKUBO, T.; KITAMURA, K.; Eugenol Activates  $Ca^{2+}$ -permeable Currents in Rat Dorsal Root Ganglion Cells. **Journal of Dental Research** n.76, v.11, p1737-1744, nov, 1997.

PARK, C.-K.; LI, H.Y.; YEON, K.-Y.; JUNG, S.J.; CHOI, S.-Y.; LEE, S.J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B. Eugenol Inhibits Sodium Currents in Dental Afferent Neurons. **Journal of Dental Research** n.85, v.10,p.900-904, 2006.

PEDERSEN, S.F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. TRP channels: An overview. **Cell Calcium** n.38, p.233–252, 2005.

PIZZO, G.; GIAMMANCO, G.M.; CUMBO, E.; NICOLOSI, G.; GALLINA, G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, n.34, p.35–40, 2006.

RAJAKUMAR, D.V.; & RAO, M.N.; Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. **Biochemical Pharmacology**, n.46, p.2067-2072, 1993.

RUIZ-VELASCO, V.; IKEDA, S.R.; Heterologous expression and coupling of G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in adult rat sympathetic neurons. **Journal of Physiology**, n.513, v.3, p.761-773, 1998.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compound in clinical trials. **Drug Discovey Today**, n.13, v.3/4, p.161-171, fen. 2008.

STOHS, S.J.; LAWSON, T.A.; ANDERSON, L; BUEDING, E.; Effects of oltipraz, BHA, ADT and cabbage on glutathione metabolism, DNA damage and lipid peroxidation in old mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, n.37, p.137-145, 1986.

TAIRA, J.; IKEMOTO, T.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A.; MAKINO, K.; Essencial oil phenyl propanoids. Useful as OH scavengers? **Free Radical Research Communications** n.16, p.197-204, 1992.

U. HUSS, T. RINGBOM, P. PERERA, L. BOHLIN, & M. VASÄNGE. Screening of Ubiquitous Plant Constituents for COX-2 Inhibition with a Scintillation Proximity Based Assay. **Journal of natural products**, n.65, v.11, p.1517-1521, nov, 2001.

WANG, S.Y.; MITCHELL, J.; WANG, G.K. Preferential block of inactivation-deficient Na<sup>+</sup> currents by capsaicin reveals a non-TRPV1 receptor within the Na<sup>+</sup> channel. **Pain**, n.127, p.73–83, 2007.

WEISSHAAR, B.; JENKINS G. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation **Current Opinion in Plant Biology**, n.1, p.251-257, 1998.

YANG, B.H.; PIAO, Z.G.; KIM, Y.-B.; LEE, C.-H.; LEE, J.K.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B.  
Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. **Journal of Dental Research**, n.82, v.10,  
p.781-785, 2003.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; KASE, Y.; TAKEDA, S.; WATANABE, S.;  
ABURADA, M.; MIYAMOTO, K. Antinoceptive effect of methyleugenol on formalin-induced  
hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, n.553 p. 99-103, dez, 2006.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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