

JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE
(-)-CARVONA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
*IN VIVO E IN VITRO***

JOÃO PESSOA – PB

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE
(-)-CARVONA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
*IN VIVO E IN VITRO***

JOÃO PESSOA – PB

2008

JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE (–)-CARVONA
EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, área de concentração: **Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA – PB

2008

G635e Gonçalves, Juan Carlos Ramos.

Estudo do efeito antinociceptivo de (–)-carvona em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* / Juan Carlos Ramos Gonçalves. – João Pessoa, 2008.

102p.

Orientador: Demetrius Antônio Machado de Araújo

Co-orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida

Dissertação (mestrado) – UFPB/CCS/LTF

1. Produtos Naturais. 2. (–)-carvona. 3. Óleos Essenciais. 4. Monoterpenos.

UFPB / BC

CDU: 547.9(043)

JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE (–)-CARVONA
EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, área de concentração: **Farmacologia**.

Aprovado em 14 de Janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo
Universidade Federal da Paraíba
Presidente

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

Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora interna

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba
Suplente

**Aos meus queridos pais e irmãos,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por conceber beleza e harmonia a tudo o que é vivo ou inanimado, e por me permitir vivenciá-las.

Aos **meus familiares**, pelo constante apoio e incentivo ao longo da minha trajetória.

A **Juliana Barbalho Brasileiro**, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis, sempre me fortalecendo para os obstáculos vindouros.

Ao Prof. Dr. **Demetrius Antônio Machado de Araújo**, pela amizade e valorosa orientação deste trabalho, sempre conferindo suporte à minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, pela orientação e confiança a mim prestadas, permitindo o enriquecimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. **Damião Pergentino de Sousa**, pela colaboração e fornecimento da (–)-carvona, o que catalisou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José Maria Barbosa Filho**, pelo empenho constante em consolidar o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nível de excelência nacional.

Aos professores do curso de pós-graduação e pesquisadores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial **Isac A. Medeiros**, **Bagnólia A. Silva** e **Luís Fernando M. Santos**, pelos ensinamentos acadêmicos prestados com estímulo e apreciável dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Eletrofisiologia, **Micheline F. Donato**, **Aron M. H. Alves** e **Anna Erika V. de Araújo**, pela colaboração e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação **Micheline F. Donato, Thaís P. Ribeiro, Josenilson F. Lima e Ionaldo José L. D. Basílio**, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração realizados ao longo do curso.

A todos os colegas do grupo de Biologia Molecular (DBM/UFPB), em especial **Andréia Cristina, Fabrícia Montenegro, Gláucia Faheina e Aletéia Lacerda**, pelo companheirismo e colaboração a mim prestadas.

A todos os integrantes do Laboratório de Psicofarmacologia (LTF/UFPB), em especial **Rubens B. Benedito, Fernando S. Oliveira, Fladmir S. Claudino, Maria Clécia e Maria Raquel**, pela excelente recepção e auxílio durante os experimentos *in vivo*, e pelo compartilhamento de informações valiosas durante este estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial **Tânia M. Araújo** pelo apoio e serviços prestados junto à secretaria, e **José Crispim Duarte, Luís Cordeiro e Adriano Silva**, pelo suporte técnico realizado no Biotério Prof. Dr. Thomas George.

A **todos** que contribuíram direta ou indiretamente durante o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

Juan Carlos Ramos Gonçalves

João Pessoa, 14 de Janeiro de 2008.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

RESUMO

GONÇALVES, J. C. R. **Estudo do Efeito Antinociceptivo de (–)-Carvona em Modelos Experimentais *in vivo* e *in vitro***. 2008. 102p. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Dentre os produtos de origem natural com propriedades analgésicas comprovadas experimentalmente, destacam-se os monoterpenos, tidos como os principais constituintes químicos dos óleos essenciais de plantas aromáticas. A (–)-carvona (*p*-menta-6,8-dieno-2-ona) é um exemplo de monoterpene com possíveis propriedades antinociceptivas, encontrada como o principal constituinte ativo dos óleos de algumas espécies do gênero *Mentha* como a *Mentha spicata* (hortelã-peluda) e comumente extraída a partir de suas folhas. Uma vez que as propriedades farmacológicas de (–)-carvona não estão estabelecidas, o presente trabalho se propõe a investigar o seu perfil antinociceptivo, sobre os sistemas nervosos central e periférico (SNC e SNP), utilizando-se modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Por meio de diferentes modelos comportamentais para a dor, como os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e da formalina, foi observada uma atividade antinociceptiva dose-dependente de (–)-carvona em camundongos. Tal efeito não demonstrou associar-se à via opióide de analgesia central, uma vez que este monoterpene não produziu efeito significativo no teste da placa quente, e por não ter sido bloqueado pela naloxona, um antagonista opióide padrão. Foi descartada uma possível interferência de atividade sedativa ou miorrelaxante nos resultados obtidos nos testes *in vivo*, devido a (–)-carvona, nas doses estudadas, não ter induzido qualquer alteração significativa na coordenação motora dos camundongos sobre o aparelho de Rota-rod. Com a finalidade de se investigar uma possível atividade periférica de (–)-carvona, foi realizada a técnica de *single sucrose gap* em nervo isquiático de ratos *Wistar*. Verificou-se que este monoterpene atua sobre o SNP reduzindo a amplitude do potencial de ação composto (PAC), de modo dependente do tempo de incubação e da sua concentração, apresentando uma IC₅₀ de 10,6 mM. Observou-se ainda que este monoterpene promoveu alterações nos parâmetros de despolarização do PAC avaliados (*TP_{PAC}* e *VD_{PAC}*), de forma semelhante à lidocaína, um anestésico local padrão bloqueador de canais tipo Na_v. Além disso, este monoterpene não induziu variações significativas sobre a fase de repolarização do PAC, contrariamente à 4-minopiridina, um bloqueador de canais do tipo K_v. Esses resultados permitiram sugerir um possível efeito bloqueador de (–)-carvona sobre os canais do tipo Na_v em seu mecanismo antinociceptivo, de modo reversível e de maneira independente do seu estado de ativação, uma vez que seus efeitos sobre o nervo foram parcialmente revertidos e por não ter promovido efeito do tipo uso-dependente. Portanto, os resultados apresentados neste estudo evidenciaram um efeito promissor de (–)-carvona como substância antinociceptiva, que pode estar associado com a redução da excitabilidade do nervo periférico.

Palavras-chave: Produtos naturais. (–)-Carvona. Óleos essenciais. Monoterpenos.

ABSTRACT

GONÇALVES, J. C. R. **Study of the Antinociceptive Effect of (–)-Carvone in *in vivo* and *in vitro* Experimental Models.** 2008. 102p. Dissertation (Post-graduation in Natural Products and Synthetic Bioactives, Pharmacology) Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa.

Amongst the natural-origin compounds with analgesics properties experimentally confirmed, we can distinguish the monoterpenes, which have related as the main chemical constituent of essential oils from aromatic-plants. (–)-Carvone (*p*-mentha-6,8-dien-2-one) is an example of monoterpene with possible antinociceptive properties, founded as the main active constituent of some *Mentha* species oils, like *Mentha spicata* (spearmint) and usually extracted from its leaves. As the pharmacological properties of (–)-carvone are not quite established, the present work aimed to investigate its antinociceptive profile, on the central and peripheral nervous systems (CNS and PNS), using *in vivo* and *in vitro* experimental models. Through different behavioral models of pain, as the acetic acid-induced writhing and the formalin tests, it was observed a dose-dependently antinociceptive activity of (–)-carvone in mice. Such effect did not demonstrate an association to the central opioid via of analgesia, whereas this monoterpene did not produce significant effects in hot-plate test, and for not having been blocked by naloxone, a standard opioid antagonist. It was discarded a possible sedative or myorelaxant interference on the obtained *in vivo* results, due (–)-carvone in the studied doses, did not induce any significant alteration in the mice motor coordination on the Rota-rod apparatus. With the purpose to investigate a possible peripheral activity of (–)-carvone, the single sucrose gap technique was carried out on the sciatic nerve of *Wistar* rats. It was verified that this monoterpene acts on the PNS reducing the compound action potential (CAP) amplitude, in a time incubation and concentration-dependent manners, showing an IC_{50} of 10.6 mM. It was also observed, that this monoterpene promoted alterations in the evaluated CAP depolarization parameters (TP_{PAC} and VD_{PAC}), similarly to lidocaine, a standard local anesthetic blocker of Na_v channels. Moreover, this monoterpene did not induce significant changes on the CAP repolarization phase, dissimilarly from 4-aminopyridine, a K_v channels blocker. These results allowed to suggest a possible Na_v blocker-like effect of (–)-carvone on its antinociceptive mechanism, in a reversible mode and independent of its activation state, once its effects on the nerve was partially reverted and for not having promoted the use-dependent type effect. Therefore, the presented results in this study have evidenced a promising antinociceptive-like effect of (–)-carvone, that may be associated with decreased peripheral nerve excitability.

Keywords: Natural products. (–)-Carvone. Essential oils. Monoterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da subunidade α do canal para Na^+ dependente de voltagem (Na_v)	28
Figura 2	Representação esquemática do canal para K^+ dependente de voltagem (K_v)	29
Figura 3	Diagrama da ligação entre um anestésico local e o seu sítio receptor no canal Na_v	32
Figura 4	Teoria da modulação de receptor	33
Figura 5	Exemplos de monoterpenos biologicamente ativos	35
Figura 6	Estrutura química dos enantiômeros de carvona	36
Figura 7	Análogos estruturais de (–)-carvona	38
Figura 8	Tipos de animais utilizados durante o estudo	42
Figura 9	Aparelho de Rota-rod	44
Figura 10	Aparelho de placa quente	44
Figura 11	Caixa de observação espelhada	45
Figura 12	Aparato da técnica de <i>single sucrose gap</i>	46
Figura 13	Câmara experimental para captação dos PAC's	46
Figura 14	Representação esquemática da montagem experimental da técnica de <i>single sucrose gap</i>	54
Figura 15	Registro típico do PAC obtido por meio da técnica de <i>single sucrose gap</i> e seus parâmetros	55
Figura 16	Exemplos de registros de 20 PAC's para a observação do efeito uso-dependente em uma frequência de 100 Hz	56
Figura 17	Registros do PAC sobrepostos obtidos pela técnica de <i>single sucrose gap</i>	64
Figura 18	Registros do PAC obtidos após incubação por 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e (–)-carvona ((–)-CV, 10 mM), separadamente, em nervo isquiático de rato.....	68
Figura 19	Registros do PAC obtidos após 30 min de incubação com (–)-carvona (7 mM) aumentando-se a frequência de estimulação	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classificação das fibras nervosas **23**

Quadro 2 Tipos de receptores opióides e seus efeitos farmacológicos **24**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos de (–)-carvona (50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste da placa quente após 30, 60 e 120 min de tratamento i.p. em camundongos	61
Tabela 2	Efeitos de (–)-carvona (50–200 mg/kg) e diazepam (4 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rota-rod	63
Tabela 3	Efeito de (–)-carvona (1–20 mM) sobre a amplitude do PAC após incubação (0–30 min) em nervo isquiático de rato	65
Tabela 4	Efeito de (–)-carvona (1–15 mM) sobre a despolarização (TP_{PAC} e VD_{PAC}) e a repolarização (τ_{rep}) do PAC	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste das contorções abdominais induzidas em camundongos pelo ácido acético	59
Gráfico 2	Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg), morfina (6 mg/kg) e AAS (100 mg/kg) na primeira fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.	60
Gráfico 3	Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg), morfina (5 mg/kg) e AAS (100 mg/kg) na segunda fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.	61
Gráfico 4	Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste da placa quente	62
Gráfico 5	Influência da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV 100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.), no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	62
Gráfico 6	Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e diazepam (4 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rota-rod	63
Gráfico 7	Efeito dependente do tempo de incubação de (–)-carvona ((–)-CV, 5–20 mM) sobre o isolado de rato	65
Gráfico 8	Efeito dependente da concentração de (–)-carvona ((–)-CV, 1–20 mM) sobre a porcentagem de bloqueio da amplitude do PAC	66
Gráfico 9	Comparação entre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 10 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), incubadas separadamente, sobre a velocidade de despolarização do PAC (VD_{PAC})	69
Gráfico 10	Comparação entre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 10 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), incubadas separadamente, sobre a constante de repolarização do PAC (τ_{rep}) ...	69

Gráfico 11 Influência do aumento da frequência de estimulação (10–100 Hz) sobre os efeitos de (–)-carvona (7 mM) em nervo isolado de rato **71**

Gráfico 12 Reversibilidade do efeito de (–)-carvona ((–)-CV 15 mM) em nervo periférico de rato **71**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(-)-CV	(-)-Carvona
τ_{rep}	Constante de tempo de repolarização em ms
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μs	Microsegundo
4-AP	4-Aminopiridina
A/D	Analógico/Digital
AAS	Ácido acetil salicílico
AL	Anestésico local
A_{PAC}	Amplitude do potencial de ação composto em mV
Ca^{2+}	Íon cálcio
Ca_v	Canais para cálcio dependentes de voltagem
cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenase
DL_{50}	Dose letal mediana
e.p.m	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GABA_A	Receptor para o ácido gama-amino-butírico tipo A
h	Hora
HEPES	Ácido-N-[2-Hidroxietil]-Piperazina-N'-[2-Etanossulfônico]
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IC_{50}	Concentração inibitória mediana
K^+	Íon potássio
kD	Kilodalton
kg	Kilograma
K_v	Canais para potássio dependentes de voltagem
LID	Lidocaína
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
mV	Milivolt
Na⁺	Íon sódio
Na_v	Canais para sódio dependentes de voltagem
NMDA	N-metil-D-aspartato
OE	Óleo essencial
PAC	Potencial de ação composto
PG	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
r.p.m.	Rotações por minuto
s	Segundo
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TP_{PAC}	Tempo para atingir o pico do potencial de ação composto em ms
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VD_{PAC}	Velocidade de despolarização do potencial de ação composto em V/s

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Introdução ao estudo da dor	21
1.2 Classificação e fisiologia da dor	21
1.3 As bases moleculares da nocicepção	23
1.4 Os canais iônicos e a sinalização neuronal	25
1.4.1 Canais para Na ⁺ e K ⁺ dependentes de voltagem	27
1.5 Controle farmacológico da dor.....	29
1.6 Os anestésicos locais	30
1.6.1 Mecanismos do bloqueio fásico pelos anestésicos locais	31
1.7 Produtos naturais e sintéticos bioativos	33
1.7.1 Os óleos essenciais e seus componentes	34
1.8 Propriedades químicas e biológicas de (–)-carvona	36
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAL	42
3.1 Animais	42
3.1.1 Condições experimentais	42
3.2 Aparentagem	43
3.2.1 Aparelho de Rota-rod	43
3.2.2 Aparelho de placa quente	44
3.2.3 Caixa de observação espelhada	45
3.2.4 Aparato eletrofisiológico para registro extracelular dos PAC's	45

3.3 Substâncias utilizadas	47
4 MÉTODOS	49
4.1 Preparação de (–)-carvona	49
4.2 Ensaios <i>in vivo</i> – comportamentais	49
4.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	49
4.2.2 Teste da formalina	50
4.2.3. Teste da placa quente	51
4.2.4 Investigação da via opióide durante o efeito de (–)-carvona	51
4.2.5. Avaliação do efeito de (–)-carvona sobre a coordenação motora de camundongos	52
4.3 Ensaios <i>in vitro</i> – eletrofisiológicos	52
4.3.1 Técnica de <i>single sucrose gap</i>	53
4.3.2 Características do efeito de (–)-carvona sobre o SNP de rato	55
4.4 Análises estatísticas	57
5 RESULTADOS	59
5.1 Ensaios <i>in vivo</i> – comportamentais	59
5.1.1 Efeito de (–)-carvona no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	59
5.1.2 Efeito de (–)-carvona no teste da formalina	60
5.1.3 Efeito de (–)-carvona no teste da placa quente	61
5.1.4 Investigação da via opióide no efeito antinociceptivo de (–)-carvona..	62
5.1.5 Efeito de (–)-carvona sobre a coordenação motora de camundongos	63
5.2 Ensaios <i>in vitro</i> – eletrofisiológicos	64
5.2.1 Efeito de (–)-carvona sobre a excitabilidade do nervo isolado de rato	64
5.2.2 Efeito de (–)-carvona sobre as características do PAC	66

5.2.3 Comparação do efeito de (–)-carvona aos exercidos pelos bloqueadores padrões de canais Na_v e K_v	67
5.2.4 Investigação do possível efeito uso-dependente de (–)-carvona	70
5.2.5 Reversibilidade do efeito de (–)-carvona em nervo periférico de rato	71
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	102

Introdução

1 INTRODUÇÃO

No Brasil estima-se que, aproximadamente, 50 milhões de brasileiros não tenham acesso ao medicamento e o fazem, muitas vezes, do tratamento com plantas sua única opção terapêutica (ALMEIDA et al., 1999). Como alternativa, os compostos naturais ativos podem ser usados como modelo para a síntese de substâncias análogas potentes e seletivas, e que algumas vezes, podem ser obtidas mais facilmente e a custos menores (FILHO; YUNES, 1998).

Dentre as classes de drogas mais pesquisadas atualmente pela indústria farmacêutica destacam-se os agentes analgésicos. Estas substâncias são utilizadas durante o tratamento da dor, sem, no entanto, causar a perda da consciência (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Um dos grandes desafios da terapêutica moderna está na busca por novos fármacos para o combate da dor que tenham uma eficácia semelhante ou maior, quando comparado aos que já estão no mercado, bem como que apresentem uma menor incidência de efeitos colaterais (DENAC; MEVISSEN; SHOLTYSIK, 2000; KAHAN et al., 2006; OSSIPOV; PORRECA, 2005).

Atualmente o tratamento da dor tem sido motivo de preocupação e de numerosos estudos, pois apesar da variedade de substâncias e do avanço no desenvolvimento das terapias de controle, ainda há uma necessidade urgente de analgésicos potentes, principalmente para os casos de dor crônica induzida pelo câncer, onde a melhor alternativa, apesar dos seus efeitos colaterais, ainda é a morfina. Neste sentido inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo têm voltado sua atenção para a validação do uso de plantas medicinais e o isolamento de seus metabólitos secundários, que podem vir a ser fonte de substâncias analgésicas mais potentes e com seus efeitos colaterais reduzidos, produzidas em menor tempo, de baixos custos e conseqüentemente mais economicamente acessíveis à população (CALIXTO et al., 2000; LIRA, 2001).

Em virtude da grande necessidade de obtenção de novos agentes analgésicos mais potentes e seletivos, e da perspectiva de que as substâncias derivadas de produtos naturais, e/ou os seus derivados sintéticos, possam suprir tal necessidade, faz-se indispensável investigar-se detalhadamente as propriedades farmacológicas destas substâncias, para que se possa melhor compreender o desenvolvimento das suas atividades biológicas, e dessa forma, auxiliar na prevenção dos possíveis efeitos indesejáveis.

1.1 Introdução ao estudo da dor

A dor é um sintoma tão antigo quanto à própria humanidade. Nas civilizações antigas, como a assíria-babilônica, egípcia e hebraica, o conceito de dor adquiriu uma conotação religiosa. Acreditava-se que a dor viria a ser uma intoxicação produzida pelos espíritos malignos, ou um castigo divino resultado de pecados cometidos (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA, 2006).

Todos os indivíduos, exceto portadores de insensibilidade congênita, sabem o que é dor. Entretanto, torna-se difícil para alguém descrever a própria dor e, ainda, impossível de se conhecer exatamente a experiência dolorosa do outro. Isto porque esta é uma experiência individual, com aspectos peculiares, associada às características únicas de cada organismo (RENTON, 2008).

Pressupõe-se a existência de dois componentes envolvidos no processo doloroso: um é a sensação de dor ou “nocicepção”, induzida por estímulos nocivos que podem ser exógenos, tais como biológicos, físicos e químicos, ou ainda, endógenos, caracterizados principalmente por processos inflamatórios. O outro componente seria a reação emocional à dor, que corresponderia a uma interpretação afetiva a essa sensação. Esta é de caráter individual, sendo representada principalmente por experiências prévias, tais como a lembrança de alguma forma de sofrimento (MORAES; CAMARGO, 1999).

Portanto, a dor é relatada como uma sensação subjetiva, de difícil descrição, podendo ou não estar associada à lesão tecidual, que possui origem em terminações da pele, aponeuroses, articulações e vísceras. Por outro lado a nocicepção é definida como o mecanismo através do qual os estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC), entretanto, não apresentando o componente subjetivo ou afetivo. Finalmente, a percepção terminal da dor será consequência da integração de ambos os componentes (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006; BRAUN-FILHO; BRAUN, 2004).

1.2 Classificação e fisiologia da dor

A dor pode ser classificada sob diferentes aspectos, um deles leva em consideração a sua distribuição temporal, diferenciando-se em aguda e crônica. Em

um outro aspecto, consideram-se os mecanismos fisiológicos, classificando-se como dor nociceptiva, neuropática, referida e visceral (SAKATA; GOZZANI, 1994; RENTON, 2008).

De acordo com o aspecto temporal, a dor aguda é aquela que se segue a um estímulo álgico (que provoca nocicepção), possui natureza sensorial e desempenha um papel de alerta para o próprio organismo. Já a dor crônica é normalmente resultante de um processo patológico, persistindo por um período mais duradouro (OLIVEIRA, 2006; RENTON, 2008).

Com relação aos mecanismos fisiológicos, a dor nociceptiva é originada pela ativação dos nociceptores, bem localizada e circunscrita à área lesada, caracterizando-se por sensações claras e precisas (BRAUN-FILHO; BRAUN, 2004). A dor neuropática caracteriza-se por um processo crônico associado apenas à via sensorial, e é decorrente de distúrbios do SNC ou por danos de nervos periféricos (DWORKIN, 2002). Contrariamente à dor nociceptiva, a dor referida não possui uma localização precisa, e ainda, pode ser decorrente de uma área do corpo não coincidente com a localização da víscera que a produziu (ARENDT-NEILSEN; SVENSSON, 2001). A dor visceral é a forma de dor que surge mais frequentemente como consequência de enfermidades, sendo o sintoma comum na maioria das síndromes dolorosas agudas e crônicas de interesse clínico. Esta caracteriza-se por ser vaga, mal localizada e se estende bem além do órgão lesado, podendo ser referida em regiões distantes da víscera que a originou (RENTON, 2008; MARQUEZ, 2004).

O reconhecimento da dor como reação sensitiva envolve três mecanismos básicos: transdução, transmissão e modulação. Durante a transdução, ocorre a “transformação” de um estímulo mecânico, térmico ou químico, em uma ativação dos receptores da dor (nociceptores), que então o transmite na forma de um impulso nervoso por um potencial de ação (RENTON, 2008).

Os nociceptores são terminações nervosas livres das fibras mielínicas tipo A δ e das fibras amielínicas tipo C (Quadro 1), amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações e diferem dos demais por serem, normalmente, ativados por estímulos de intensidade nociva, capazes de causar certo grau de dano tecidual (MARQUEZ, 2004; OLIVEIRA, 2006).

O processo de transmissão do estímulo nociceptivo, da periferia à medula espinhal, é realizado pelas fibras do tipo A δ mielinizadas de pequeno diâmetro e do

tipo C (Quadro 1), sendo a dor rápida resultante da transmissão das fibras A_{δ} , enquanto que a dor lenta é transmitida pelas fibras amielínicas do tipo C (MARQUEZ, 2004; OLIVEIRA, 2006). Ao atingir a medula espinhal, a informação nociceptiva é então transmitida para o tálamo e para o córtex cerebral por cinco vias ascendentes: os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinoencefálico, cervicotalâmico e espinohipotalâmico (BASAUM; JESSELL, 2000; PINTO, 2000).

Tipo de Fibra	Diâmetro (μm)	Mielinização	Velocidade de Condução (m/s)	Função
A_{α}	12 – 20	Intensa	70 – 120	Motora, propriocepção
A_{β}	6 – 12	Intensa	30 – 70	Tato, pressão
A_{γ}	3 – 6	Intensa	15 – 30	Tônus muscular
A_{δ}	2 – 5	Intensa	3 – 15	Dor, toque, temperatura
B	< 3	Leve	3 – 15	Função autonômica
C	0,3 – 1,3	Ausente	0,7 – 2,3	Dor, toque, temperatura

Quadro 1 – Classificação das fibras nervosas. Adaptado de Miller e Katzung (2003).

Os neurônios do trato espinotalâmico apresentam campos receptivos inibitórios, sendo portanto, responsáveis pela modulação da sensação dolorosa. Esta inibição é explicada pela “teoria do portão para o controle da dor” (MELZACK; WALL, 1965), a qual sugere que a transmissão da dor pode ser prevenida por estímulos inócuos mediados pelas grandes fibras aferentes mielinizadas, enquanto a transmissão da dor pode ser aumentada por estímulos que são transportados através de fibras aferentes finas (DE LEO, 2006).

1.3 As bases moleculares da nocicepção

Os receptores relacionados com a dor são descritos como “opiídeos” e são classificados em 4 tipos, nomeados com as letras gregas μ (mü), κ (kappa), δ (delta), σ (sigma), amplamente distribuídos no SNC, desempenhando diferentes efeitos farmacológicos (Quadro 2). Durante a ativação desses receptores, pelos agonistas opiídeos, ocorre o fechamento de canais para cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem (Ca_v), reduzindo a liberação de neurotransmissores. Além disso, a ativação

de receptores μ ou δ promove a abertura de canais para potássio (K^+) cálcio-dependentes (K_{Ca}), produzindo hiperpolarização da membrana celular e o fechamento dos canais Ca_v , o que reduz a liberação de substância P pelos terminais centrais do neurônio aferente primário. Estes agonistas atuam ainda ativando as vias inibitórias descendentes (DICKENSON, 1997; MARTIN; EISENACH, 2001).

Dentre as classes mais estudadas, estão os receptores μ , κ e δ , ambos acoplados à proteína G, e, portanto capazes de afetar a regulação iônica, o processamento do Ca^{2+} intracelular e a fosforilação de proteínas. Foi sugerida a existência de diversos subtipos de receptores opióides; atualmente, os mais caracterizados por critérios farmacológicos incluem μ_1 , μ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3 , δ_1 e δ_2 (WAY; FIELDS; SHUMACHER, 2003). O quadro 2 descreve os efeitos farmacológicos dos principais tipos e subtipos de receptores opióides.

Tipo de Receptor	Efeitos Farmacológicos
Mü (μ)	Analgesia espinhal (μ_1), analgesia supra-espinhal (μ_2), depressão respiratória (μ_2), constipação intestinal (μ_2), retenção urinária (μ_2), prurido (μ_2), sedação, euforia, dependência física.
Kappa (κ)	Analgesia espinhal (κ_3), analgesia supra-espinhal (κ_2), depressão respiratória, constipação intestinal, sedação.
Delta (δ)	Analgesia espinhal, analgesia supra-espinhal (δ_2), depressão respiratória, prurido, dependência física.
Sigma (σ)	Retenção urinária, disforia, midríase.

Quadro 2 – Tipos de receptores opióides e seus efeitos farmacológicos. Adaptado de Lira (2001).

Durante a nocicepção, além dos receptores opióides estão envolvidos ainda outros tipos de receptores, como os GABA_A (PAN et al., 2008); M₁ e M₂-muscarínicos (NAGUIB; YAKSH, 1997); NMDA-glutamatérgicos (CHIZH et al., 2001; CODERRE; VAN EMPEL, 1994); D₁ e D₂-dopaminérgicos (PEANA et al., 2004). Sabe-se, ainda, que a liberação de mediadores químicos, tais como a bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas podem levar tanto à

estimulação direta quanto à sensibilização dos receptores da dor (SAKATA; GOZZANI, 1994; RENTON, 2008).

O estudo da dor em nível molecular é um estudo complexo, pois vários receptores estão envolvidos neste processo e pouco ainda se sabe sobre suas bases moleculares e mecanismos de regulação. A dor neuropática, por exemplo, pode também estar associada a uma mudança na expressão gênica dos canais para sódio (Na^+) voltagem-dependentes (Na_v) após uma lesão no nervo, provocando uma hiperexcitabilidade nervosa (BLACK et al., 2004; DEVOR, 2006; WAXMAN et al., 2000). Dentre estes, os canais $\text{Na}_{v1.7}$, $\text{Na}_{v1.8}$ e $\text{Na}_{v1.9}$, são amplamente expressos em nervos periféricos e possuem relação direta com a dor (DIB-HAJJ et al., 2007; POYRAZ et al., 2003).

Um outro tipo de canal iônico envolvido na nocicepção são os canais para K^+ , cuja ativação está envolvida na modulação positiva do efeito analgésico de agonistas opióides e muscarínicos (YAMAZUMI; OKUDA; KOGA, 2001). Dentre estes podem ser citados os canais para K^+ voltagem-dependentes (K_v) como o $\text{K}_{v4.2}$ e o $\text{K}_{v4.3}$ (HUANG et al., 2005), e ainda, os canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (IWAMOTO; MARION, 1993) e ao cálcio (K_{Ca}) (LI et al., 2007).

1.4 Os canais iônicos e a sinalização neuronal

Os canais iônicos são poros hidrofílicos formados por proteínas integrais das membranas celulares das mais variadas espécies animais e vegetais. Eles possuem três importantes propriedades: conduzir íons, reconhecer e selecionar íons específicos, abrir e fechar em resposta a sinais elétricos, mecânicos ou químicos específicos. Os canais dos nervos e músculos conduzem os íons através da membrana celular a velocidades extremamente altas, cerca de 10^6 por segundo, o que causa alterações rápidas do potencial de membrana (HILLE, 2001).

Em todos os canais iônicos, as proteínas possuem diferentes estados conformacionais, dentre os quais, alguns apresentam maior estabilidade, o que corresponde a um estado funcional diferente. A transição do canal entre esses diferentes estados, é, geralmente, classificado em: aberto, fechado e inativado. Para que um estímulo cause a transição do estado conformacional de um canal, deve-se fornecer energia. No caso dos canais dependentes de voltagem, a energia é suprida

pela movimentação de uma região carregada da proteína do canal, denominada sensor de voltagem, através do campo elétrico da membrana. O movimento das cargas do sensor de voltagem através do campo elétrico confere ao canal uma variação da energia livre, alterando seus estados “fechado” e “aberto”. A transição entre estes dois estados requer em média, alguns milissegundos, todavia, quando iniciada, ela procede instantaneamente (cerca de 10 μ s) originando variações abruptas da corrente através do canal. Porém, apesar dessa rápida condução iônica, os canais iônicos são surpreendentemente seletivos, haja visto que cada tipo permite a passagem de apenas uma ou algumas espécies de íons (HILLE, 2001).

A ativação de diferentes classes de canais iônicos promove uma alteração rápida na polaridade da membrana das células excitáveis, através das correntes iônicas geradas, formando o potencial de ação que se propaga ao longo da célula, sendo considerado como a base da capacidade carreadora de sinais das células nervosas (ARMSTRONG; HILLE, 1998). Um potencial de ação é deflagrado quando ocorre um influxo de íons carregados positivamente na célula alterando a polaridade da membrana, carregada negativamente em sua porção interna durante o repouso para uma polaridade positiva, em um evento chamado de “despolarização”. A polaridade da membrana é restaurada pelo processo de “repolarização”, geralmente devido ao impedimento do influxo de íons positivos e ao efluxo de íons potássio (K^+) por difusão, pela abertura dos canais para K^+ dependentes de voltagem (ARMSTRONG; HILLE, 1998; HILLE, 2001).

O potencial de membrana das células nervosas em repouso é principalmente determinado por canais seletivos aos íons K^+ , que são 100 vezes mais permeáveis ao K^+ do que ao Na^+ . Já durante o potencial de ação, são ativados canais de 10 a 20 vezes mais permeáveis ao Na^+ do que ao K^+ . Logo, a chave para a grande versatilidade da sinalização neuronal está na ativação de diferentes classes de canais iônicos (HILLE, 2001; YU; CATTERALL, 2004).

A soma algébrica de vários potenciais de ação, resultantes da estimulação de vários axônios presentes em uma fibra nervosa, é chamada de potencial de ação composto (PAC), o qual foi descrito, inicialmente, a partir do primeiro pico (A) gerado em um nervo e as suas subdivisões ($A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ e $A\delta$) como a soma da atividade elétrica das fibras mielínicas de rápida condutância (PERL, 2007). Um pico de condutância muito lenta também observado (C), foi proposto como a representação da atividade das fibras amielínicas. Diferentemente do potencial de ação gerado em

um único axônio, o PAC é uma resposta graduada, cuja magnitude aumenta com a intensidade do estímulo. Isso ocorre devido ao fato de que diferentes axônios presentes na fibra nervosa possuem diferentes limiares de excitabilidade e diferentes diâmetros, sendo mais rápidas e excitáveis as fibras que possuem menor limiar e maior diâmetro (Quadro 1), de acordo com a seguinte ordem: $A\alpha > A\beta > A\gamma > A\delta > B > C$ (PERL, 2007).

1.4.1 Canais para Na^+ e K^+ dependentes de voltagem

Os canais para Na^+ voltagem-dependentes (Na_v) são as bases da excitabilidade elétrica do nervo e das células musculares (CRUZ et al., 2000). O canal para Na^+ foi purificado pela primeira vez do órgão elétrico do peixe *Electrophorus electricus*, sendo composto por uma única cadeia peptídica de 260 kD (AGNEW et al., 1980). Ao todo, existem dez genes para as subunidades α dos canais Na_v no genoma humano, e nove deles pertencem a uma única família com identidade superior a 70% da sua sequência de aminoácidos (GOLDIN et al., 2000).

Drogas que bloqueiam os canais Na_v são utilizadas para o tratamento da dor, arritmias cardíacas, analgesia e epilepsia. Estes canais são expressos em diferentes tipos de células excitáveis e conduzem os íons Na^+ dez vezes mais rápido que o K^+ ou o Ca^{2+} . A sua seletividade é determinada pelas cadeias laterais de quatro resíduos de aminoácidos (aspartato-glutamato-lisina-alanina), entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio, os quais são conservados em todos os dez canais (SUN et al., 1997). Após um curto período (1 a 2 ms) após aberto, os canais Na_v são inativados através do *gating* de inativação citoplasmático formado pelo motivo hidrofóbico IFMT (isoleucina-fenilalanina-metionina-treonina), localizado na porção interna do canal e entre os domínios III e IV (ROHL et al., 1999). A inativação exerce um controle crucial na condutância dos canais Na_v , permitindo que o canal abra em rápidas seqüências para gerar os trens de sinais elétricos breves (YU; CATTERALL, 2004).

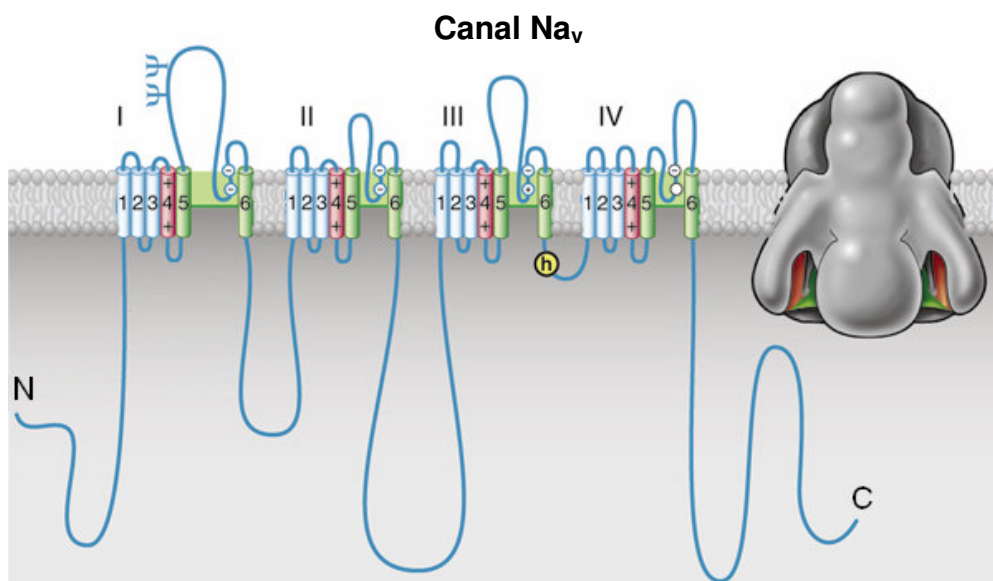


Figura 1 – Representação esquemática da subunidade α do canal para Na⁺ dependente de voltagem (Na_v). À esquerda, estão representados os seus quatro domínios (I-IV), formados por seis segmentos transmembrana (S1–S6). Entre os segmentos S5 e S6 ocorre a região formadora do poro (verde). Em vermelho, os segmentos S4 carregados positivamente e em amarelo, o *gating* de inativação (motivo IFMT). Os círculos entre os *loops* representam os aminoácidos que formam o filtro de seletividade ao íon. N e C representam as porções amino e carboxi-terminais, respectivamente. À direita, está representada a estrutura tridimensional da subunidade α (20 Å). Adaptado de Yu e Catterall (2004).

Uma das funções mais marcantes dos canais para K⁺ está na manutenção no potencial de repouso da membrana de todas as células, sejam elas excitáveis ou não. No entanto, à medida que os estudos acerca desses canais se intensificam, novas funções são atribuídas a eles (HILLE, 2001). Os canais para K⁺ ativados por voltagem são denominados K_v, e são formados por quatro subunidades do tipo α , geralmente associadas às subunidades auxiliares do tipo β . As subunidades do tipo α possuem seis domínios transmembrana (S1–S6) e os domínios carbóxi e amino-terminais localizados na região citoplasmática. A região do poro é formada pelos segmentos S5 e S6, enquanto que o segmento S4, composto por aminoácidos carregados positivamente, é considerado o sensor de voltagem desses canais (Figura 2). O deslocamento de S4 frente a uma mudança no potencial de membrana, ocasiona na mudança conformacional do canal para o estado aberto (BURG; REMILLARD; YUAN, 2006; MILLER, 2000).

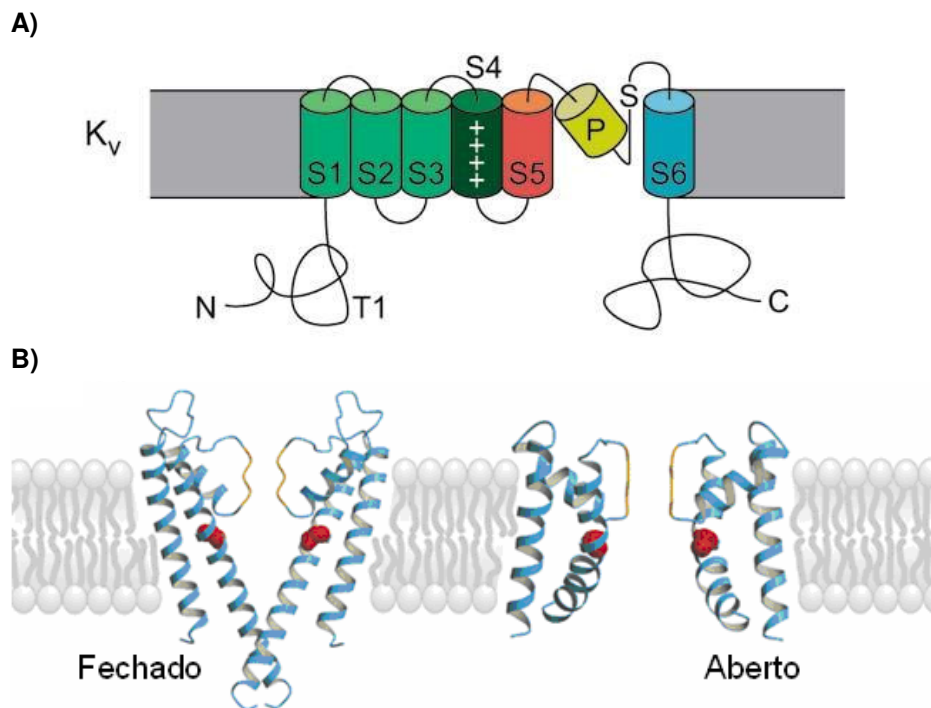


Figura 2 – Representação esquemática do canal para K⁺ dependente de voltagem (K_v). A figura A) mostra os segmentos transmembrana (S1–S6) de apenas uma das subunidades da estrutura tetramérica do canal K_v, onde S4 representa o sensor de voltagem, S a seqüência de assinatura e T1 o domínio conservado do canal. N e C representam as porções amino e carboxi-terminais, respectivamente. Adaptado de Miller (2000). A figura B) mostra as conformações “fechada” e “aberta” dos canais para potássio de bactérias, onde o filtro de seletividade e o resíduo conservado da glicina, estão representados em laranja e vermelho, respectivamente. Adaptado de Yu e Catterall (2004).

1.5 Controle farmacológico da dor

O tratamento da dor pode ser efetuado por diferentes classes de substâncias, dentre as quais destacam-se os antiinflamatórios, os opióides, antidepressivos, anticonvulsivantes, neurolépticos e ansiolíticos.

Os analgésicos da classe dos antiinflamatórios diminuem a produção de prostaglandinas e leucotrienos que sensibilizam os receptores da dor para a ação de substâncias liberadas durante a lesão. Os vários agentes desta classe diferem entre si quanto à potência antiinflamatória, cinética e efeitos colaterais. Embora não causem dependência psíquica, podem provocar alterações gástricas, hepáticas e renais, reações alérgicas e alterações hematológicas (HARRIS; BREYER, 2006; MUNIR; ENANY; ZHANG, 2007; SAKATA; GOZZANI, 1994).

Os analgésicos opióides, cujo principal representante é a morfina, agem através da ligação aos receptores no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), inibindo a transmissão da dor. São úteis no tratamento das dores oncológicas e traumáticas, no entanto seus inúmeros efeitos colaterais e o risco de dependência os tornam fatores limitantes à sua utilização (BALLANTYNE, 2007; DICKENSON, 1997; MARTIN; EISENACH, 2001).

A ação analgésica dos antidepressivos é atribuída, principalmente, ao bloqueio da recaptação de serotonina e noradrenalina pelas vias supressoras da dor. Estas drogas elevam também os níveis sinápticos de dopamina e alteram a atividade de alguns neurotransmissores, como a substância P e o GABA (ácido- γ -aminobutírico). Já os anticonvulsivantes, promovem estabilização das membranas neuronais das vias aferentes da dor, com diminuição da transmissão sináptica e supressão da atividade espontânea que ocorre em certas síndromes dolorosas (JANN; SLADE, 2007; JOHANNESSEN LANDMARK, 2008; PAN et al., 2008).

Os neurolépticos ativam mecanismos de modulação da dor e diminuem a excitabilidade neuronal proporcionando sedação e analgesia, enquanto que os ansiolíticos atuam reduzindo a ansiedade, a insônia e também promovendo relaxamento muscular (SAKATA; GOZZANI, 1994).

1.6 Os anestésicos locais

Uma outra classe de substâncias utilizadas na inibição da nocicepção são os fármacos anestésicos locais (AL's). Esses compostos são capazes de causar, em uma determinada região do corpo, uma diminuição da sensibilidade, motricidade e função autonômica, através do bloqueio da geração e propagação do potencial de ação, impedindo a condução do estímulo algico. A sua remoção é seguida de um retorno completo e espontâneo da condução nervosa (DE JONG, 2001; HILLE, 2001).

O local básico de ação dos AL's são os canais do tipo Na_v , que são os próprios receptores desses fármacos. A afinidade da ligação depende do estado conformacional do canal, que pode ser aberto, fechado ou inativado. A ligação com o canal é favorecida por potenciais de ação repetidos, sendo esse fenômeno chamado de efeito uso-dependente ou bloqueio fásico (dependente da frequência de

estímulação). A lidocaína, por exemplo, aumenta o seu efeito por causa desse fenômeno (DE JONG, 2001; HILLE, 2001; MOORE; BURNEY, 1979).

Seletivamente, os AL's podem ligar-se aos canais tipo Na_v e, dessa forma, estabilizando-os na conformação fechada, mesmo na presença de um estímulo. Nesse estado, os canais são impermeáveis ao sódio e, portanto, não há despolarização da membrana (HILLE, 1977, 2001).

1.6.1 Mecanismos do bloqueio fásico pelos anestésicos locais

Tasaki (1953) mostrou que o bloqueio da transmissão do impulso no nervo isquiático de sapos, tratados com o anestésico uretano, depende da taxa de estimulação. Respostas à estimulação em frequências elevadas foram bloqueadas mais prontamente que respostas obtidas em baixas frequências. Esta potenciação do bloqueio durante rápidos estímulos foi confirmada utilizando-se uma grande variedade de anestésicos locais (HILLE, 1977; KHODOROV et al., 1976; STRICHARTZ, 1973). Courtney (1975) nomeou este efeito provocado pelos AL como “bloqueio uso-dependente”, atualmente também conhecido como “dependente de frequência” ou “fásico”. Em geral, os potenciais de ação são conduzidos normalmente em frequências fisiológicas, sendo fortemente suprimidos quando estimulados em altas frequências (HONDEGHEM; KATZUNG, 1977).

A técnica de *voltage-clamp* tem sido utilizada no nervo para o delineamento do bloqueio uso-dependente (STARMER, 1984) e várias hipóteses baseadas na interação de AL's com seus respectivos sítio (s) receptores foram propostas (COURTNEY, 1975; HILLE, 1977; HONDEGHEM; KATZUNG, 1977; KHODOROV et al., 1976; STRICHARTZ, 1973). Estas hipóteses formam a base para o entendimento dos mecanismos, acerca do efeito uso-dependente, envolvidos no bloqueio dos canais iônicos pelos AL's.

Em um modelo relativamente simples, Strichartz (1973) propõe um aprisionamento da molécula bloqueadora dentro do poro do canal (Figura 3), após concluir que o bloqueio e o desbloqueio dos AL's requerem canais abertos, e mesmo quando a droga está ligada ao canal, os processos de ativação e inativação continuam a funcionar, indicando se a droga consegue ou não se desligar do receptor.

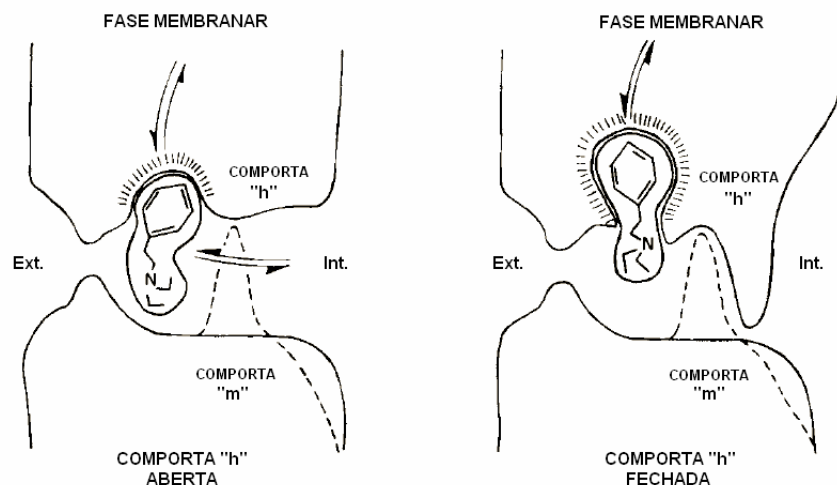


Figura 3 – Diagrama da ligação entre um anestésico local e o seu sítio receptor no canal Na_v . A molécula consegue alcançar o seu sítio de ligação se ambas as comportas (*gates*) de ativação e inativação estiverem abertas, ou através da membrana mesmo se uma ou ambas as comportas estiverem fechadas (HILLE, 1977).

A hipótese da “modulação do receptor”, proposta por Hille (1977) e independentemente proposta por Hondeghem e Katzung (1977), é baseada na variação da afinidade no sítio de ação do canal iônico e na mudança da cinética de inativação do canal ligado à droga. Baseado na observação de mudanças na curva de inativação derivada de preparações com nervos expostos ao anestésico local, Hille (1978) propôs a existência de modificações de um ou ambos os coeficientes de inativação (α_h^* e β_h^*) em canais complexados à droga. Um detalhado balanço entre os estados aberto e fechado em equilíbrio requer que alterações nos coeficientes estejam acopladas com uma mudança na afinidade de ligação dos sítios receptores dos canais iônicos.

Experimentos realizados com uma variedade de fármacos AL's levaram à hipótese de que existem duas vias de reação com o receptor do canal iônico para explicar o bloqueio fásico: uma via hidrofóbica e uma outra hidrofílica (HILLE, 1977). A via hidrofílica é usada pelas drogas quaternárias e aminas protonadas, em suas formas carregadas, que não conseguem atravessar a membrana plasmática e necessitam do canal aberto para atuarem. Na via hidrofóbica, utilizada por drogas neutras, ocorre a ativação e desativação do canal mesmo quando fechados, devido a capacidade dessas moléculas em atravessar a membrana e/ou através da parede do canal ao seu receptor (Figura 4).

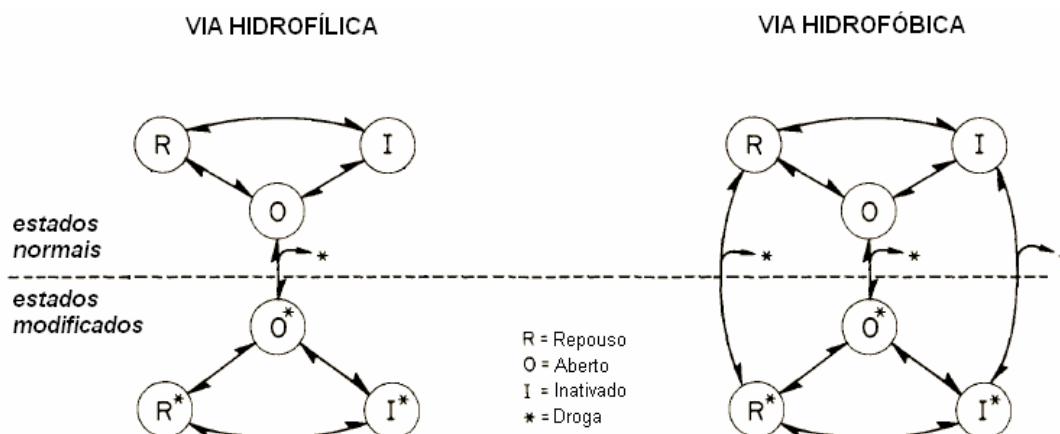


Figura 4 – Teoria da modulação de receptor. A modulação ocorre por meio de vias distintas, a hidrofílica e a hidrofóbica, representada como um esquema cinético com interconversões entre os estados normais (R, O, I) e modificados pela droga (R*, O*, I*) do canal iônico. Pela via hidrofílica a droga (eletricamente carregada) atravessa o canal apenas se sua comporta estiver no estado aberto (O), enquanto que drogas não carregadas o fazem independente do estado de ativação do canal. Adaptado de Hille (1977, 2001).

1.7 Produtos naturais e sintéticos bioativos

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus metabólitos secundários tais como flavonóides, alcalóides, terpenos, taninos e lignanas têm sido objetos de incessantes estudos, e muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de aproveitamento como futuros fármacos.

Vários são os exemplos históricos do emprego de plantas medicinais na obtenção e estudo de novas substâncias com ação no SNC, tais como a morfina e a codeína, obtidas a partir da *Papaver somniferum* que promovem analgesia e alterações no humor, por atuar principalmente nos receptores μ -opiídes (HUANG; KUTCHAN, 2000); a cafeína, extraída da *Paullinia cupana*, que pertence quimicamente à classe das xantinas, semelhantes a teofilina e a teobromina, promove efeitos estimulantes do SNC (CAMPOS et al., 2005).

As propriedades dos produtos naturais favorecem a interação com os alvos biológicos. Eles tendem a possuir uma composição molecular diferente, contendo pouco nitrogênio, halogênio e enxofre, mas são ricos em oxigênio (ORTHOLAND; GANESAN, 2004). Além disso, os compostos de origem natural apresentam mais sistemas de anéis e maior grau de insaturação, resultando numa estrutura mais

rígida que confere à molécula maior força de ligação, devido a uma menor perda entrópica (PHILLIPSON, 2001).

A etnofarmacologia associada à descoberta de novas drogas, usando produtos naturais, permanece um assunto de grande importância no cenário mundial (PATWARDHAN; VAIDYA; CHORGHAE, 2004). Muitas drogas modernas têm suas origens na etnofarmacologia. Entretanto, apesar do avanço tecnológico atual, o processo de descoberta de novas drogas que possam ser úteis na terapêutica é considerado o principal déficit que, adversamente, afeta a indústria farmacêutica (PATWARDHAN, 2005).

Algumas espécies vegetais do Nordeste brasileiro, com ampla distribuição na Paraíba, têm mostrado resultados muito promissores com atividade no SNC, como a *Dioclea grandiflora* com potencial efeito antinociceptivo (ALMEIDA et al., 2000) e anticonvulsivante (MATTEI; LEITE; TUFIK, 1995), *Cissampelos sympodialis* indicado para o tratamento de problemas respiratórios e com um perfil antidepressivo em testes preliminares (ALMEIDA et al., 1998; MAIOR et al., 2003).

Há, portanto, uma demanda cada vez maior por estudos visando a obtenção de outros compostos terapeuticamente viáveis. Neste contexto incluem-se as drogas que atuam sobre o SNC e o SNP. Esses medicamentos têm valor inestimável, já que podem produzir efeitos que alteram a fisiologia e psique, aliviando a dor ou a febre, suprimindo distúrbios do movimento, evitando convulsões e induzindo o sono. Podem ainda tratar da ansiedade, depressão ou esquizofrenia sem alterar a consciência (OLIVEIRA, 2006).

1.7.1 Os óleos essenciais e seus componentes

Os óleos essenciais (OE's) constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas aromáticas, e assim são denominados devido à composição lipofílica que possuem, quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras (SIANI et al., 2000).

Muitos desses óleos já possuem estudos sobre suas várias atividades biológicas, os quais demonstraram suas atividades no sistema nervoso, tais como propriedade analgésica (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001),

anticonvulsivante (ALMEIDA; MOTTA; LEITE, 2003) e ansiolítica (ALMEIDA et al., 2004; UMEZU et al., 2002).

Com relação à natureza química dos OE's, esses, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta, principalmente, substâncias constituídas por dez e por quinze átomos de carbono, conhecidas como monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente (SIANI et al., 2000).

Os efeitos dos OE's são provavelmente devido aos monoterpenos, considerados como os seus principais constituintes. Essa informação é baseada no fato de que vários monoterpenos presentes nesses óleos apresentaram diferentes atividades no SNC e SNP, como exemplo o linalol e o citrônol que possuem atividade anticonvulsivante (DE SOUSA et al., 2006; ELISABETSKY et al., 1995), e o mentol e a rotundifolona com propriedades analgésicas (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996; GALEOTTI et al., 2002) (Figura 5).

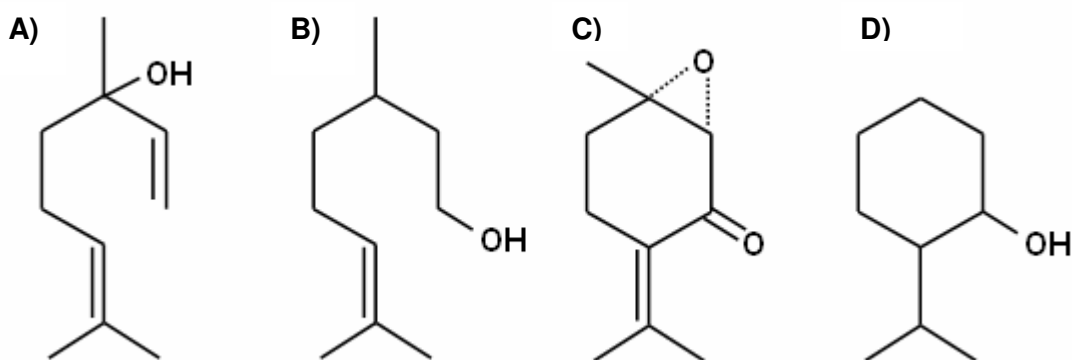


Figura 5 – Exemplos de monoterpenos biologicamente ativos.

A) Linalol; B) Citrônol; C) Rotundifolona; D) Mentol.

Recentemente, um estudo com monoterpenos alcoólicos e cetônicos demonstrou que os efeitos produzidos por estes compostos foram dependentes de suas estruturas e grupos funcionais associados ($-OH$ ou $=O$) e o tipo de receptor estudado (HALL et al., 2004).

1.8 Propriedades químicas e biológicas de (–)-carvona

A carvona (*p*-menta-6,8-dieno-2-ona) é um monoterpreno cetônico representante da classe dos terpenos, que é encontrado como o principal constituinte ativo dos OE's de algumas espécies vegetais do gênero *Mentha* e comumente extraída a partir de suas folhas (YOUNIS; BESHIR, 2004). Dentre os seus enantiômeros (Figura 6), a (–)-carvona é majoritária do óleo da hortelã-peluda (*Mentha spicata*), enquanto que a (+)-carvona é o principal componente dos óleos da alcaravia (*Carum carvi*) e do endro (*Anethum graveolens*) (DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007).

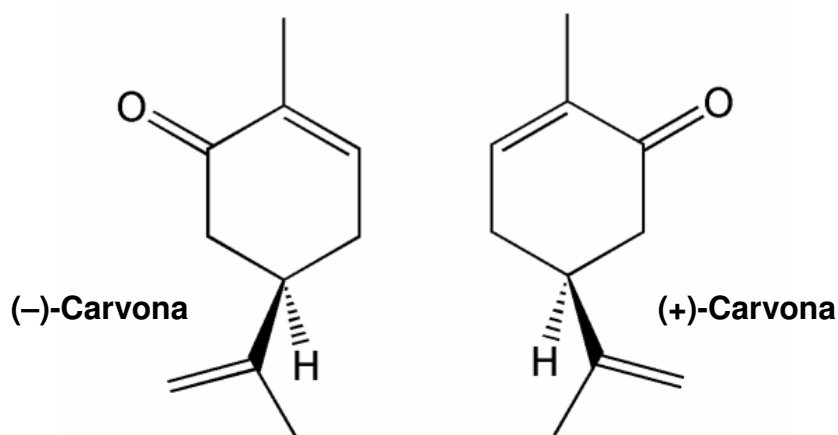


Figura 6 – Estrutura química dos enantiômeros de carvona.

Embora ainda existam poucos estudos científicos demonstrando os efeitos da carvona sobre o sistema nervoso, recentemente alguns trabalhos têm demonstrado uma busca crescente de informações acerca da farmacologia deste composto. A exemplo, um estudo realizado por Mora et al. (2005), sugeriu que tanto a carvona quanto a tujona, ambos compostos presentes no extrato hidroalcoólico de *Aloysia polystachya* (griseb.) *moldenke* (Verbenaceae), poderiam ser os responsáveis pela atividade sedativa, ansiolítica e antidepressante induzidas em ratos por este extrato. Buchbauer et al. (2005), demonstraram os efeitos sedativos dos isômeros de carvona sobre a atividade locomotora de camundongos, após a inalação destes compostos.

Estudos relativos à toxicidade da carvona evidenciaram que o enantiômero (–)-carvona possui uma toxicidade ligeiramente maior que a (+)-carvona, os quais possuem DL₅₀ de 426,6 (389,0–478,6) mg/kg e de 484,2 (358,9–653,2) mg/kg respectivamente. No mesmo estudo foi demonstrado que a (+)-carvona apresentou atividade anticonvulsivante, enquanto que a (–)-carvona demonstrou uma provável atividade antinociceptiva (DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007).

Trabalhos referentes aos mecanismos da olfação confirmaram que os enantiômeros de carvona afetam a atividade da enzima adenilato ciclase (SKLARS et al., 1986). Adicionalmente, Breer (1991) indicou que quando a concanavalina A, uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis*, era aplicada sob o epitélio olfatório de sapos, bloqueava-se a transdução de cAMP induzida por (+)-carvona, mas não para (–)-carvona. Fato este, que mais tarde revelou-se ocorrer devido a existência de populações neuronais diferentemente ativadas (KIRNER et al., 2003), sugerindo-se, portanto, diferentes receptores para os enantiômeros de carvona.

Outro importante estudo demonstrou que a (+)-carvona produziu oscilações de freqüências semelhantes tanto no epitélio olfatório (SNP) quanto no bulbo olfatório (SNC). Estímulos estes que foram continuados mesmo após a secção do nervo olfatório, indicando que as oscilações no epitélio olfatório provocadas por (+)-carvona possuem uma fonte nervosa periférica (DORRIES; KAUER, 2000). Ainda, estudos em humanos realizados por Heuberger et al. (2001) demonstraram que a inalação de (–)- e (+)-carvona, por voluntários sadios, foi capaz de provocar alterações na pressão sanguínea sistólica e diastólica, provavelmente decorrentes de uma atividade sobre o sistema nervoso autônomo.

Recentemente, um trabalho realizado avaliando-se a atividade de monoterpenos alcoólicos e cetônicos, sobre receptores para o GABA e para a glicina expressos em *Xenopus oocytes*, demonstrou que os isômeros de carvona e mentona, ambos cetônicos, produziram efeitos ínfimos sobre receptores GABA_A e glicina, quando comparados com monoterpenos alcoólicos como o mentol (HALL et al., 2004).

Estudos realizados no LTF, acerca da atividade antinociceptiva de monoterpenos, indicaram que tanto a rotundifolona, quanto a hidroxidihidrocarvona e a epóxi-carvona, apresentaram um potencial analgésico em camundongos (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996; DE SOUSA et al., 2007a, 2007b; DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007; DE SOUSA; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006;

OLIVEIRA, 2006). Em comum, estes três monoterpenos possuem grande semelhança estrutural com a (-)-carvona, sendo a hidroxidihidrocarvona e a epóxi-carvona seus derivados sintéticos.

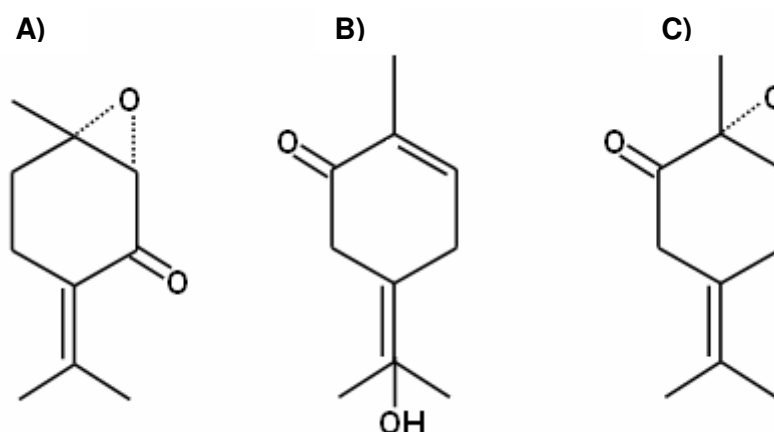


Figura 7 – Análogos estruturais de (-)-carvona.
A) Rotundifolona; B) Hidroxidihidrocarvona; C) Epóxi-carvona.

Os dados da literatura, portanto, indicaram uma potencial atividade neurofarmacológica, e possivelmente do tipo antinociceptiva, de (-)-carvona. Entretanto, apesar dos esforços crescentes, os efeitos deste monoterpeno sobre o SNC e SNP ainda não foram estabelecidos, bem como os mecanismos farmacológicos envolvidos. Portanto, o presente trabalho se propõe a caracterizá-los, e para tanto se utilizará de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* adequados.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito antinociceptivo de (–)-carvona sobre o SNC e SNP, utilizando-se modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* adequados.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito antinocicetivo central de (–)-carvona por meio de modelos *in vivo* comportamentais específicos;
- Avaliar o envolvimento do SNP, investigando-se os efeitos de (–)-carvona sobre a excitabilidade do nervo isolado de ratos *in vitro*;
- Investigar a ocorrência de um efeito dose-dependente e concentração-dependente de (–)-carvona nos modelos experimentais em estudo;
- Realizar estudos que auxiliem a indicar o mecanismo de ação antinociceptivo, central e/ou periférico de (–)-carvona, utilizando-se antagonistas específicos;
- Verificar a reversibilidade do efeito de (–)-carvona sobre o nervo periférico, bem como a ocorrência do efeito do tipo uso-dependente.

Material

3 MATERIAL

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas, albinos da linhagem *Swiss*, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 a 35 g; e ratos (*Rattus norvegicus*) machos e albinos da linhagem *Wistar*, com 3 a 4 meses de idade, pesando aproximadamente 350 g (Figura 8). Ambos os tipos de animais foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba.



Figura 8 – Tipos de animais utilizados durante o estudo. À esquerda, camundongos albinos da linhagem *Swiss* e à direita, ratos machos *Wistar* albinos.

3.1.1 Condições experimentais

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos ou 7 ratos em cada gaiola, mantidos sob condições monitoradas de temperatura de 21 ± 1 °C, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo *pellets* (Purina/Brasil) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 06h00 às 18h00.

Os testes comportamentais foram realizados sempre no período compreendido das 11h00 às 17h00.

Todos os experimentos executados por este estudo, foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do LTF (CEPA-LTF), sob o protocolo número: 0208/06.

3.2 Aparelhagem

- Aparelho de Rota-rod (UGO BASILE, modelo 7750 / Itália);
- Aparelho de placa quente (UGO BASILE, modelo LE 7406 / Itália);
- Caixa de contenção para camundongo;
- Caixas de observação espelhadas;
- Câmara eletrofisiológica;
- Estimulador eletrofisiológico (CF Palmer, modelo 8048 / Reino Unido);
- Microscópio estereoscópico (Zeiss / Alemanha);
- Placa conversora A/D (Lynx / Brasil).

3.2.1 Aparelho de Rota-rod

O aparelho de “Rota-rod” foi inicialmente descrito por Dunham e Miya (1957) e constituía-se de uma barra giratória com 2,5 cm de diâmetro, dividida por cinco discos em quatro segmentos de 20 cm, e localizada a 40 cm de altura em relação a pequenas pranchas que desativavam automaticamente um contador digital de tempo com a queda dos animais da barra. O modelo utilizado foi fabricado pela Ugo Basile, modelo 7750, Itália (Figura 9), o qual possuía dispositivos para ajuste de velocidade da barra giratória (em r.p.m.) e para contabilizar, de forma automática, o tempo de permanência dos animais sobre a mesma.

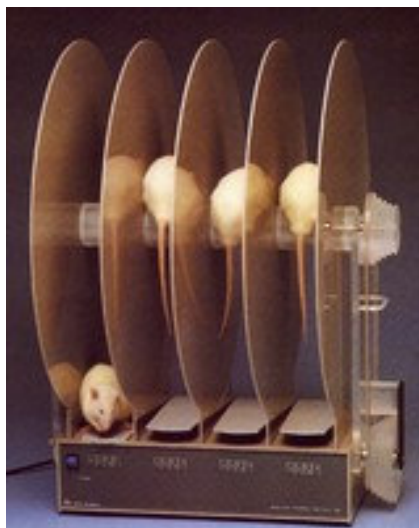


Figura 9 – Aparelho de Rota-rod. Ugo Basile, modelo 7750, Itália.

3.2.2 Aparelho de placa quente

A placa quente (Figura 10) permite a avaliação da atividade de drogas analgésicas (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006) por meio de um aparelho cuja temperatura de sua placa, localizada na superfície superior, pode ser controlada entre 45 °C e 62 °C, em incrementos de 0,1 °C. Neste aparelho, um cronômetro acoplado (0,01 s/incremento) era ativado por um pedal externo, que permitia a medida precisa do tempo de reação do animal ao estímulo térmico. Acoplado à placa, havia um cilindro de acrílico transparente, que permitiu o isolamento e a observação do animal sobre o aparelho.



Figura 10 – Aparelho de placa quente. Ugo Basile, modelo LE 7406, Itália.

3.2.3 Caixa de observação espelhada

Este aparato era formado de um encaixe de metal de formato triangular (25 x 25 x 25 cm), com dois espelhos e um vidro transparente, dispostos em ângulos de 60°, formando uma espécie de caixa com duas paredes espelhadas e uma transparente (Figura 11). Esta caixa forneceu ao observador, um maior campo de visão durante a execução de testes comportamentais, como o teste da formalina (ABBOT et al., 1999).

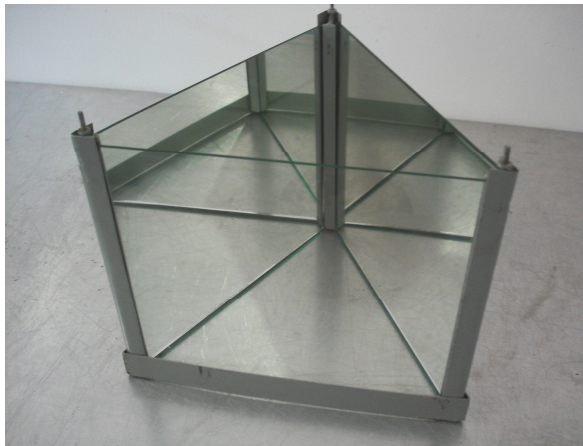


Figura 11 – Caixa de observação espelhada.

3.2.4 Aparato eletrofisiológico para registro extracelular dos PAC's

O aparato utilizado na técnica eletrofisiológica de *single sucrose gap* (STÄMPFLI, 1954) era constituído por um estimulador (CF Palmer, modelo 8048, Reino Unido), uma câmara de registros eletrofisiológicos, uma caixa de aquisição do sinal acoplada a um amplificador, e uma placa conversora de sinais analógico/digital (A/D) (Lynx/Brasil) conectada a um computador PC-compatível (Figura 12).

O estimulador era composto por cinco botões que permitiam ajustar o tipo de estímulo (único ou repetitivo), a duração do pulso (0,05–5,0 ms), a frequência de estimulação (1–100 Hz) e a voltagem aplicada (0,1–25 V). Um outro botão permitia ao experimentador disparar os estímulos manualmente.

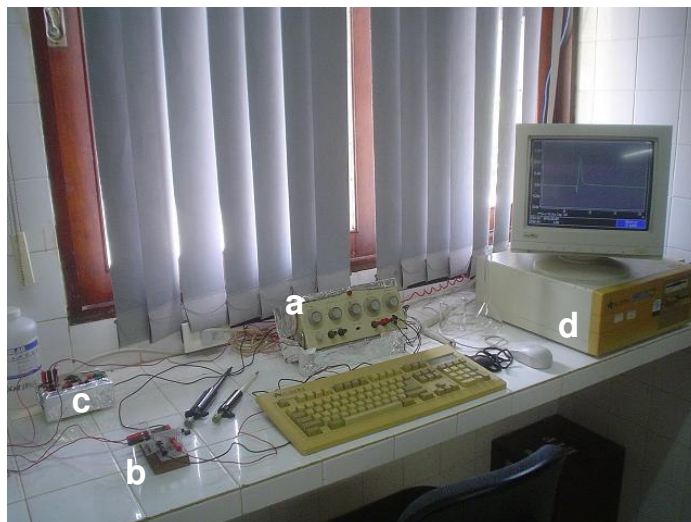


Figura 12 – Aparato da técnica de *single sucrose gap*. a) estimulador (CF Palmer, modelo 8048, Reino Unido); b) câmara experimental para captação dos PAC's; c) pré-amplificador de ganho fixo/variável; d) placa conversora A/D (Lynx/Brasil) + PC-compatível.

A câmara experimental para captação dos PAC's, era feita de acrílico e composta por cinco compartimentos que se comunicavam entre si, unicamente por meio de uma linha sulcada disposta perpendicularmente aos mesmos, que era utilizada para acomodar o tronco nervoso do animal. Por meio de eletrodos de níquel-cromo conectavam-se ao estimulador, os compartimentos I e II, e ao pré-amplificador (de ganho fixo/variável), os compartimentos III e V. Por sua vez, o pré-amplificador era conectado à placa conversora A/D (Lynx/Brasil), e acoplava-se ao computador, permitindo o armazenamento dos registros dos PAC's. O compartimento IV, perfurado nas extremidades, era utilizado para a perfusão da solução de sacarose (292 mM), que caracteriza esta técnica. Um bloco de madeira sobre a câmara de acrílico fornecia suporte e isolamento elétrico aos elementos descritos (Figura 13).



Figura 13 – Câmara experimental para captação dos PAC's. Os cinco compartimentos (I – V) que formam a câmara, de acrílico (centro) sob o suporte de madeira, estão indicados na figura.

3.3 Substâncias utilizadas

- 4-Aminopiridina (Sigma / EUA);
- Ácido acético glacial (Reagem / Brasil);
- Ácido acetil salicílico - AAS (Sigma / EUA);
- Ácido-N-[2-Hidroxietil]-Piperazina-N'-[2-Etanossulfônico] (HEPES) (Sigma / USA);
- (–)-Carvona 98% (Aldrich / EUA);
- Cloreto de Cálcio (Vetec / Brasil);
- Cloreto de Magnésio (Vetec / Brasil);
- Cloreto de Potássio (Vetec / Brasil);
- Cloreto de sódio (Merck / USA);
- Cloridrato de morfina (Merck / EUA);
- Diazepam (Sigma / EUA);
- Formalina (formaldeído 37%) (Vetec / Brasil);
- Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical / EUA);
- Lidocaína (PROBEM / Brasil);
- Tween 80 (polioxetileno sorbitano monoleato) (Sigma / EUA).

Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Preparação de (–)-carvona

A (–)-carvona 98% foi adquirida do laboratório Aldrich (EUA), sendo cordialmente cedida pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa.

Imediatamente antes da realização dos testes comportamentais, utilizou-se, como veículo, uma solução composta por salina 0,9 % acrescida de 3 % Tween 80. Esta solução foi utilizada para diluir a (–)-carvona, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, utilizadas nestes testes *in vivo*.

Para realização dos ensaios *in vitro*, a (–)-carvona foi dissolvida em 0,5 % de Tween 80 e solução fisiológica de Locke modificada, que era composta por (em mM): NaCl, 150; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; Glicose, 10 e HEPES, 10; pH = 7,4 (titulado com NaOH). As concentrações utilizadas de (–)-carvona foram de 1, 5, 7, 10, 15 e 20 mM.

4.2 Ensaios *in vivo* – comportamentais

4.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este teste é utilizado para avaliar, essencialmente, a atividade de substâncias analgésicas centrais e periféricas (AMARAL et al., 2007), e baseia-se na indução de uma resposta nociceptiva, por irritação peritoneal, após a administração intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético 0,8 %, cujo efeito é caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959).

Para a realização deste método, cinco grupos com oito camundongos receberam por via i.p. (0,01 mL/g) o pré-tratamento com três doses de (–)-carvona (50, 100 e 200 mg/kg), além de um grupo controle, que recebeu apenas o veículo e um outro grupo tratado com cloridrato de morfina (6 mg/kg).

Transcorridos 30 min dos tratamentos iniciais, os animais foram tratados com solução de ácido acético 0,8 % por via i.p. (0,01mL/g), e colocados em caixas de polietileno individuais. Após 10 min da injeção do ácido acético, o número total de contorções abdominais apresentados por cada animal foi registrado durante mais 10 min. Uma redução significativa do número de contorções, quando comparado ao observado pelo grupo controle, foi considerado como uma resposta antinociceptiva (BASTOS et al., 2006; NARAYANAN et al., 2000).

4.2.2 Teste da formalina

O teste da formalina foi conduzido como descrito Vaz et al., (1996) que representa uma modificação do modelo original de Hunskaar, Fasmar e Hole, (1985) e Santos et al., (1995). Nessa metodologia uma solução de formalina (2,5 %, 20 µL) era injetada na região subplantar do camundongo, o que induzia a estimulação dos nociceptores, promovendo um comportamento de lambida na pata estimulada e sendo o mesmo considerado como indicativo de resposta nociceptiva (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Foram observadas duas fases, durante as quais era quantificado o tempo de lambida da pata estimulada pela formalina. A primeira fase ocorria nos primeiros 5 min após a injeção da formalina, caracterizada pela resposta do tipo neurogênica. Em seguida, ocorria um período de interfase de aproximadamente 10 min, induzido por mecanismos inibitórios da dor. Durante a segunda fase do teste, entre 15 e 30 min, era caracterizada principalmente, uma resposta do tipo inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Para este experimento, seis grupos de oito camundongos foram divididos e receberam, por via i.p., pré-tratamento com três doses de (-)-carvona (50, 100 e 200 mg/kg), além de um grupo controle que recebeu apenas o veículo, e os outros dois grupos foram tratados com morfina (6 mg/kg) e com 100 mg/kg de ácido acetil salicílico (AAS). Após 30 min, a solução de formalina era injetada na região subplantar da pata posterior direita de cada camundongo. Em seguida estes eram colocados nas caixas de observação espelhadas (Figura 11), registrando-se, logo em seguida, o tempo de lambida da pata que havia recebido a formalina durante 5 min (1ª fase). Após um período de 10 min, novamente era contabilizado o mesmo parâmetro por 15 min adicionais, correspondendo à 2ª fase do teste.

4.2.3 Teste da placa quente

Este teste, que é utilizado na pesquisa de substâncias analgésicas de ação central e descrito inicialmente por Woolfe e MacDonald (1944), consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, a partir do momento em que o animal é colocado sobre a placa quente (55 ± 1 °C) até apresentar o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas traseiras, o que indica nocicepção (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Os animais foram submetidos a uma triagem inicial (resposta até 15 s), com a finalidade de se avaliar a sensibilidade dos mesmos ao estímulo térmico. Posteriormente, os camundongos foram divididos em cinco grupos ($n=8$), e posteriormente tratados por via i.p. de acordo com o esquema descrito abaixo:

- 1º grupo: veículo (controle);
- 2º grupo: (–)-carvona (50 mg/kg);
- 3º grupo: (–)-carvona (100 mg/kg);
- 4º grupo: (–)-carvona (200 mg/kg);
- 5º grupo: morfina (6 mg/kg).

Foi realizada a leitura basal (sensibilidade inicial), no mínimo 1 hora antes do teste. As avaliações eram então procedidas após 30, 60 e 120 min da administração das substâncias, conforme descrito acima, registrando-se o tempo de permanência dos camundongos sob o aparelho de placa quente (Figura 10). Os animais foram mantidos sobre a placa quente por um tempo máximo de 30 s, com a finalidade de evitar dano tecidual (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

4.2.4 Investigação da via opióide durante o efeito de (–)-carvona

Ao investigar-se um possível envolvimento do sistema opióide durante a atividade antinociceptiva de (–)-carvona, foi utilizado o método do ácido acético, conforme descrito anteriormente (seção 4.2.1). Neste teste, dividiram-se, inicialmente, os camundongos em seis grupos ($n=8$), tratando-os (i.p.) da seguinte

forma: um grupo recebeu o veículo (controle); outro, (–)-carvona (100 mg/kg); e à um outro grupo, administrou-se morfina (6 mg/kg). Os três grupos restantes foram pré-tratados com naloxona (5 mg/kg) por via subcutânea (s.c.), e após 15 min, receberam os mesmos tratamentos dos grupos iniciais. Os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos para a metodologia do ácido acético (seção 4.2.1).

4.2.5 Avaliação do efeito de (–)-carvona sobre a coordenação motora de camundongos

O teste do Rota-rod é uma metodologia utilizada na triagem de drogas que induzam um efeito relaxante muscular não-específico ou de incoordenação motora, medindo-se o tempo de permanência do animal em teste sobre uma barra giratória (CAPASSO et al., 1996; MATTEI; FRANCA, 2006; SANTOS; RAO, 2000).

Para execução deste teste, os camundongos foram pré-selecionados sem a administração de nenhuma droga, e sendo considerados aptos ao teste somente aqueles que permaneceram sobre a barra giratória (velocidade de 7 r.p.m.) por um período mínimo de 180 s (MENDES; MATTEI; CARLINI, 2002).

Após a seleção, os animais foram divididos em cinco grupos ($n=8$) e em seguida, tratados com o veículo (controle), (–)-carvona (50, 100 e 200 mg/kg) e diazepam (4 mg/kg), separadamente. Transcorridos 30 min dos respectivos tratamentos, os animais foram colocados sobre o aparelho de Rota-rod (Figura 9), registrando-se o tempo de permanência total, e limitando-se as observações ao período máximo de 180 s por animal ou três reconduções à barra (MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998). As leituras eram repetidas aos 60 e 120 min, e considerou-se que, quanto mais intenso era o efeito das substâncias utilizadas, menor seria o tempo em que o animal conseguiria se equilibrar sobre a barra (MATTEI; FRANCA, 2006).

4.3 Ensaios *in vitro* – eletrofisiológicos

4.3.1 Técnica de *single sucrose gap*

Para esta metodologia, descrita inicialmente por Stämpfli (1954), utilizou-se o nervo isquiádico de ratos Wistar (sacrificados por tração cervical), retirando-se o tronco nervoso, que era imediatamente imerso em solução fisiológica de Locke modificada (DE SOUSA et al., 2006). Após o isolamento do tronco, retirou-se a bainha de tecido conjuntivo que o envolvia com auxílio de um microscópio estereoscópico. Em seguida, o tronco nervoso era cuidadosamente acomodado sob a linha sulcada (perpendicular) na câmara de registros eletrofisiológicos (Figura 13) e totalmente envolto por vaselina sólida, nas suas interseções com os compartimentos I a V (preenchidos com solução de Locke modificada), de modo que o percurso da corrente elétrica ocorresse apenas através do nervo. No compartimento IV havia um fluxo constante de sacarose isotônica (290 mM, ~1,0 mL/min), usado para gerar um aumento na resistência elétrica do nervo, impedindo dessa forma, a sua captação pelo eletrodo conectado ao compartimento V (Figura 14), obtendo-se assim um registro do PAC amplificado e do tipo monofásico (Figura 15) (DE SOUSA et al., 2006).

Para provocar o estímulo do nervo, eram disparados manualmente estímulos elétricos supramáximos (7–8 V), com pulsos retangulares de 0,1 ms de duração, permitindo-se selecionar as fibras mielínicas A α (Quadro 1) de condução rápida (CRUZ et al., 2000). Após a seleção dessas fibras, os registros controle eram obtidos quando apenas a solução fisiológica era submetida ao nervo, e em seguida, a incubação de (–)-carvona (1-20 mM) no compartimento III (Figura 14) era realizada substituindo-se a solução fisiológica por três lavagens consecutivas. Os registros do PAC foram obtidos nos intervalos de 10, 20 e 30 min após a incubação do nervo com a (–)-carvona, e analisados utilizando-se *softwares* adequados de aquisição e análise dos dados.

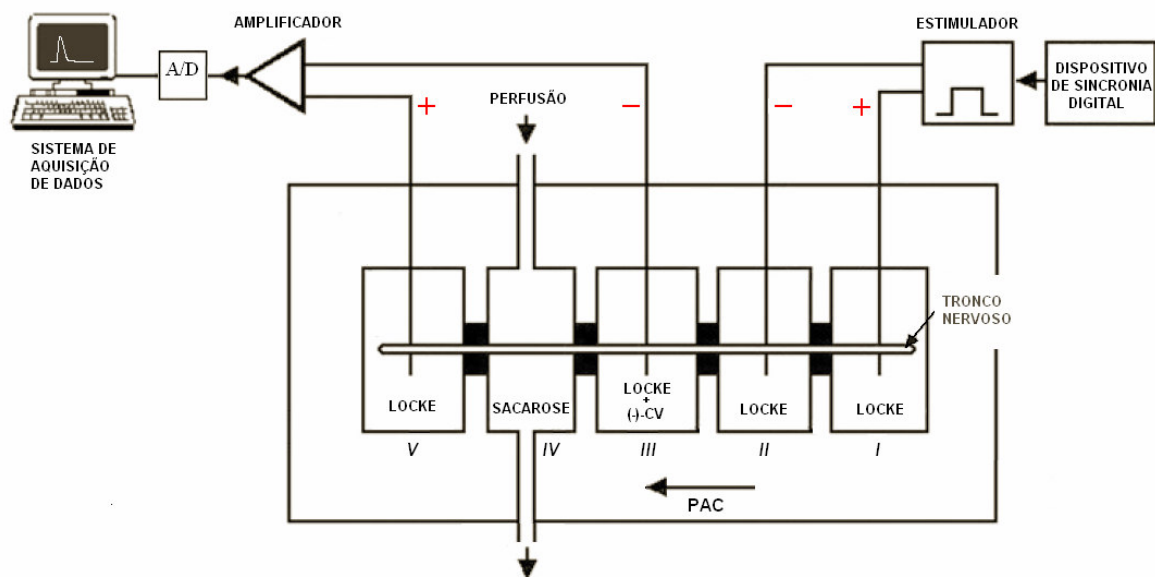


Figura 14 – Representação esquemática da montagem experimental da técnica de *single sucrose gap*. Acima à direita está representado o estimulado. O retângulo maior representa a câmara experimental formada por cinco compartimentos (I-V), e o tronco nervoso disposto entre eles no centro da câmara. Acima à esquerda está representado o amplificador (triângulo) conectado à placa conversora A/D e ao sistema de aquisição de dados. Adaptado de Guven et al. (2006).

Para análise do efeito tônico (pulso único) de (–)-carvona, utilizaram-se quatro parâmetros distintos, que permitiram avaliar as mudanças provocadas por este composto sobre os eventos de despolarização e repolarização do PAC (Figura 15). Tais parâmetros foram:

- a) a amplitude do PAC (A_{PAC}), expressa em milivolts (mV) e medida pela diferença de voltagem entre a linha de base e o pico do potencial;
- b) o tempo para atingir o pico do PAC (TP_{PAC}), expresso em milissegundos (ms) e obtido pela diferença de tempo existente entre o valor de início e valor de pico do PAC;
- c) a velocidade de despolarização do PAC (VD_{PAC}), adquirido como o resultado da relação entre o valor máximo da amplitude e o tempo necessário para atingir esse valor (A_{PAC} / TP_{PAC}), expresso em volts por segundo (V/s);
- d) e a constante de tempo da repolarização (τ_{rep}), definida pela equação: $V = V_0 \cdot \exp(-t/\tau)$, usando-se regressão não linear aplicada à fase de repolarização do PAC, onde V era a medida da amplitude; V_0 era o valor da amplitude que cruza o eixo das ordenadas; t era o tempo de repolarização (em ms); e τ a constante de tempo de repolarização obtida (em ms) (DE SOUSA et al., 2006).

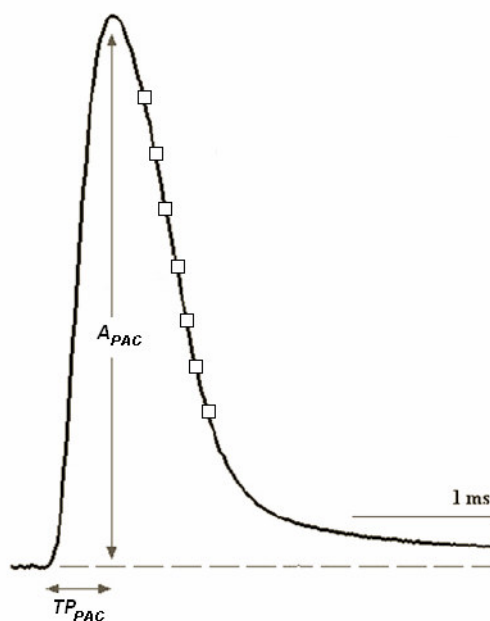


Figura 15 – Registro típico do PAC obtido por meio da técnica de *single sucrose gap* e seus parâmetros. A linha de base está representada pela linha tracejada e as setas duplas indicam como a amplitude (A_{PAC}) e o tempo para atingir o pico (TP_{PAC}) do PAC foram medidos. Os quadrados vazados na fase de repolarização (descendente) representam os pontos utilizados para o ajuste da constante de repolarização (τ_{rep}). Adaptado de Guven et al. (2006).

4.3.2 Características do efeito de (–)-carvona sobre o SNP de rato

Adicionalmente, foram realizados experimentos utilizando-se a lidocaína e a 4-aminopiridina (4-AP), ambos agentes bloqueadores de canais para Na^+ e K^+ dependentes de voltagem Na_v e K_v , respectivamente (CUMMINS; SHEETS; WAXMAN, 2007; JUDGE; BEVER-JR, 2006), com a finalidade de se avaliar o comportamento destes canais frente a (–)-carvona, durante as fases do PAC. Para tanto, incubaram-se soluções de lidocaína (1 mM) e 4-AP (1 mM), separadamente, e os seus efeitos sobre os parâmetros de despolarização (VD_{PAC}) e de repolarização (τ_{rep}), foram posteriormente analisados e comparados com os obtidos por (–)-carvona, conforme descrito previamente (seção 4.3.1).

A investigação de um possível efeito dependente de frequência de estimulação (uso-dependência) de (–)-carvona sobre o PAC, denominado de efeito fásico, foi procedida pelo mesmo protocolo utilizado para o efeito tônico (pulso único), variando-se entretanto, a frequência de estímulos em 10, 50 e 100 Hz,

inicialmente adquiridos em condições controle (com apenas o Locke) e após 30 min de incubação com (–)-carvona (7 mM). Tais estímulos foram gerados automaticamente pelo estimulador, obtendo-se um total de 20 PAC's para cada varredura. O bloqueio fásico foi calculado como a porcentagem de redução da amplitude do vigésimo potencial de ação de um trem, disparados em uma dada frequência sob o efeito de (–)-carvona, comparada com a mesma varredura sob condições controle (Figura 16), por meio da equação: $\%Bloqueio = [(A_{PACc} - A_{PACd}) / A_{PACc}] * 100$ (adaptado de GUVEN et al., 2006; MERT et al., 2002), considerando-se A_{PACd} a amplitude do PAC após 30 min de incubação com a (–)-carvona e A_{PACc} a amplitude medida sob condições controle.

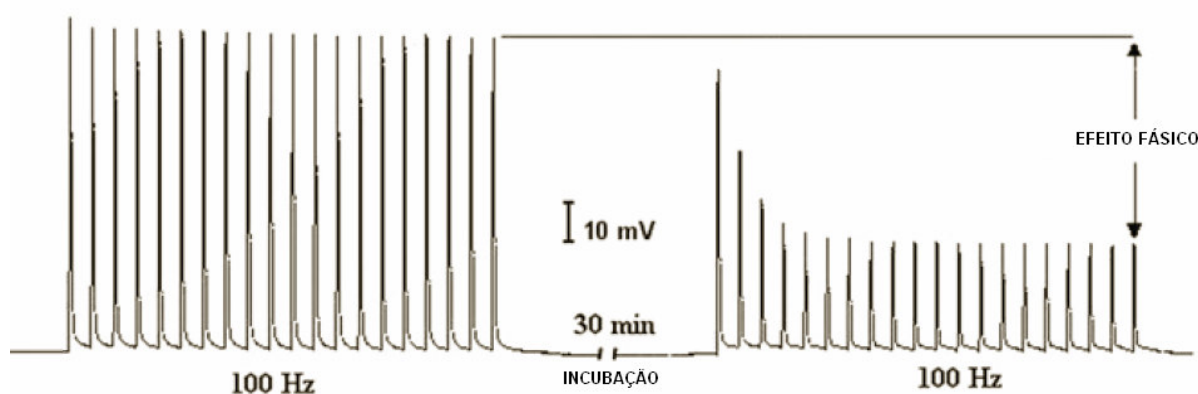


Figura 16 – Exemplos de registros de 20 PAC's para a observação do efeito uso-dependente em uma frequência de 100 Hz. À esquerda os registros controle e à direita, os potenciais obtidos após incubação com uma droga de efeito uso-dependente. Adaptado de Guven et al. (2006).

Com a finalidade de se investigar a reversibilidade do efeito de (–)-carvona sobre o nervo periférico, realizou-se, durante a técnica de *single sucrose gap*, a lavagem do compartimento III (Figura 14) por 5 min (~0,5 mL/min), após o período de incubação de 30 min com (–)-carvona (15 mM), substituindo-se esta droga pela solução fisiológica de Locke modificada. O registro do PAC foi então obtido após mais 30 min, analisando-se novamente o valor de sua amplitude (A_{PAC}).

4.4 Análises estatísticas

Os dados experimentais obtidos pelos testes *in vivo* ($n=8$), foram estatisticamente analisados utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA), com classificação única (*one-way*), seguido do teste de Dunnett.

Por sua vez, os resultados obtidos *in vitro* ($n=4$), foram analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student.

Utilizou-se o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., EUA) para análise dos dados, considerando como significativos os que apresentaram um valor de $p<0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vivo* – comportamentais

5.1.1 Efeito de (–)-carvona no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Neste teste os resultados mostraram que, das doses utilizadas com a (–)-carvona, apenas 100 e 200 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, enquanto que 50 mg/kg não foi efetiva. O grupo controle, que recebeu apenas o veículo, apresentou uma média de $14,4 \pm 2,7$ contorções, a qual foi reduzida para $2,6 \pm 1,1$ e $0,3 \pm 0,1$, quando os animais foram pré-tratados com a (–)-carvona nas doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente (Gráfico 1). Uma redução análoga do número de contorções foi obtida pelo grupo que recebeu a morfina (6 mg/kg), apresentando uma média de $3,3 \pm 1,4$ contorções (Gráfico 1).

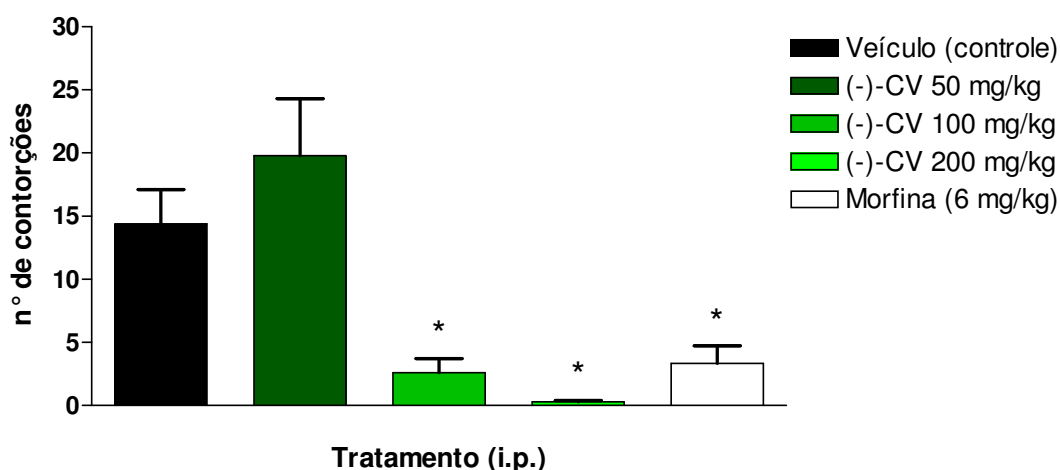


Gráfico 1 – Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste das contorções abdominais induzidas em camundongos pelo ácido acético. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

5.1.2 Efeito de (–)-carvona no teste da formalina

Durante a primeira fase deste teste, ocorrida nos 5 primeiros min, observou-se que a (–)-carvona foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida na pata do animal submetida à formalina, nas doses de 100 e 200 mg/kg da ordem de $63,5 \pm 6,4$ s e $40,7 \pm 8,5$ s, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($119,7 \pm 9,9$ s). Resultados semelhantes foram obtidos pelo grupo tratado com morfina ($55,8 \pm 9,0$ s), enquanto que o grupo tratado com AAS, assim como o que recebeu 50 mg/kg de (–)-carvona, não conseguiram reduzir o tempo de lambida durante esta fase do teste (Gráfico 2).

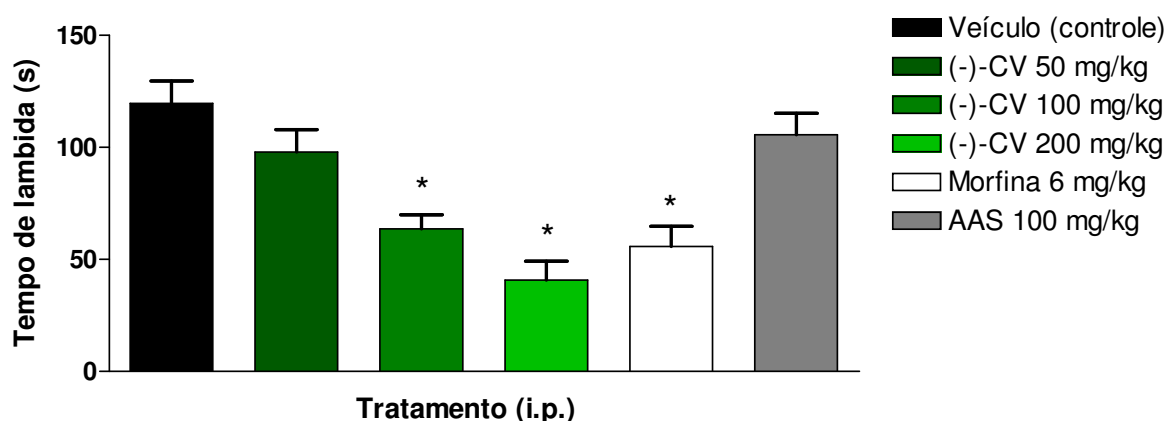


Gráfico 2 – Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg), morfina (6 mg/kg) e AAS (100 mg/kg) na primeira fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

De acordo com os resultados apresentados no gráfico 3, referentes à segunda fase do teste da formalina (15–30 min), foi observado que os camundongos tratados com (–)-carvona, apenas nas doses de 100 e 200 mg/kg, novamente apresentaram uma redução do tempo de lambida de $83,9 \pm 39,4$ s e $16,8 \pm 16,6$ s, respectivamente, quando comparados com o grupo tratado apenas com o veículo ($296,4 \pm 31,8$ s). Os grupos de camundongos que receberam morfina e AAS, também apresentaram um tempo de lambida reduzidos para $52,4 \pm 15,3$ e $140,3 \pm 34,3$ s, respectivamente, durante esta fase do teste.

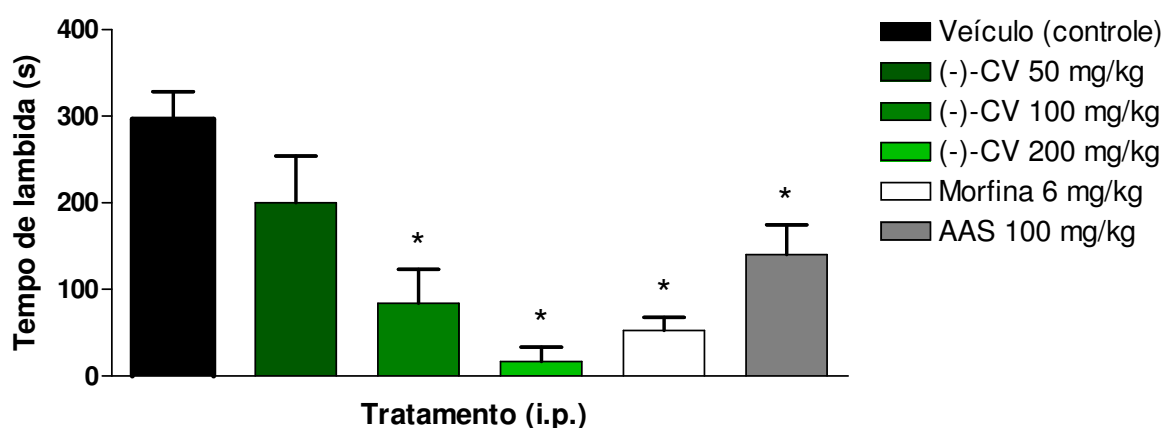


Gráfico 3 – Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg), morfina (5 mg/kg) e AAS (100 mg/kg) na segunda fase do teste da formalina em camundongos tratados via i.p.. Os valores foram expressos como a média ± e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

5.1.3 Efeito de (–)-carvona no teste da placa quente

Os resultados obtidos com (–)-carvona durante o teste da placa quente mostraram que este composto não conseguiu aumentar, de forma significativa, o tempo de permanência dos camundongos no aparelho em relação ao grupo controle, após os tempos de 30, 60 e 120 min pós-tratamento (i.p.) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com 6 mg/kg de morfina (i.p.), observou-se que os mesmos permaneceram por mais tempo sobre placa, sob as mesmas condições experimentais (Tabela 1). O gráfico 4 demonstra de forma mais clara os efeitos citados.

Tabela 1 – Efeitos de (–)-carvona (50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste da placa quente após 30, 60 e 120 min de tratamento i.p. em camundongos. Os valores foram expressos como a média ± e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

Tempo após tratamentos (min)	Tempo de permanência sobre a placa após tratamento i.p. (s)				
	Veículo (Controle)	(–)-carvona (50 mg/kg)	(–)-carvona (100 mg/kg)	(–)-carvona (200 mg/kg)	Morfina (6 mg/kg)
30	2,4 ± 0,4	4,9 ± 0,9	3,4 ± 0,7	5,6 ± 1,3	17,5 ± 3,1*
60	2,7 ± 0,3	6,4 ± 1,3	3,8 ± 0,8	3,2 ± 0,8	16,2 ± 3,2*
120	4,0 ± 1,6	6,1 ± 0,7	3,1 ± 0,6	3,6 ± 0,5	15,2 ± 3,4*

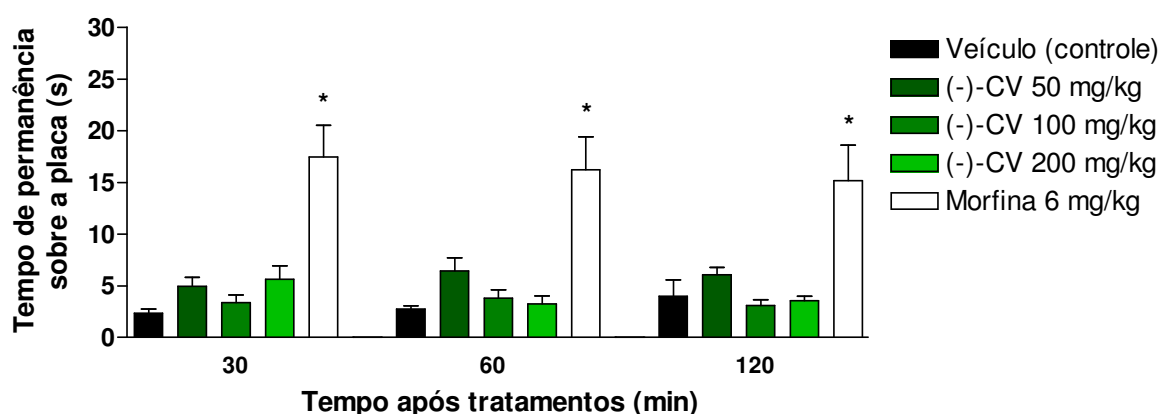


Gráfico 4 – Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) no teste da placa quente. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

5.1.4 Investigação da via opióide no efeito antinociceptivo de (–)-carvona

Para tanto foi utilizado o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético como descrito na seção 4.2.4, e observou-se que os grupos de camundongos tratados (i.p.) com (–)-carvona (100 mg/kg) e morfina (6 mg/kg), apresentaram o número de contorções reduzidos para $2,4 \pm 1,6$ e $4,0 \pm 1,2$, respectivamente, em relação ao grupo controle, o qual recebeu apenas o veículo ($21,0 \pm 1,5$ contorções) (Gráfico 5). Entretanto, os outros três grupos tratados (i.p.) com veículo (controle), (–)-carvona (100 mg/kg) e morfina (6 mg/kg), pré-tratados com naloxona (5 mg/kg, s.c.), apresentaram um média de $23,4 \pm 2,8$; $5,2 \pm 1,2$ e $23,3 \pm 2,5$ contorções abdominais, respectivamente (Gráfico 5).

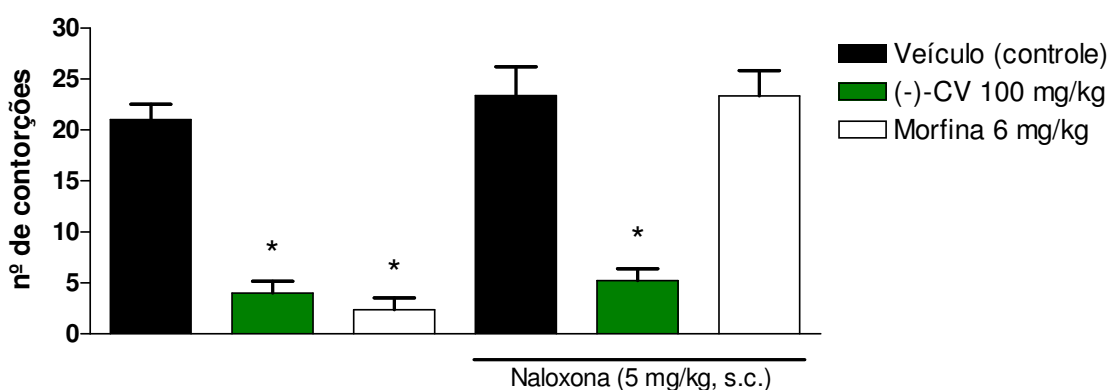


Gráfico 5 – Influência da naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV 100 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.), no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

5.1.5 Efeito de (–)-carvona sobre a coordenação motora de camundongos

Neste teste, constatou-se que nenhuma das doses estudadas de (–)-carvona (50, 100 e 200 mg/kg), após 30, 60 e 120 min de administração i.p. em camundongos, foram capazes de reduzir o tempo de permanência desses animais sobre a barra giratória do aparelho de Rota-rod, à partir do grupo controle que recebeu apenas o veículo. Quando os animais foram pré-tratados com diazepam (4 mg/kg), foi observada uma redução significativa do tempo de permanência desses animais sobre o aparelho após os tempos de 30 e 60 min pós-tratamento. Os valores foram expostos na tabela 2 e utilizados na construção do gráfico 6.

Tabela 2 – Efeitos de (–)-carvona (50–200 mg/kg) e diazepam (4 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rota-rod. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

Tratamento	Dose (mg/kg, i.p.)	Tempo de permanência (s) / 180 s		
		Período de observação		
		30 min	60 min	120 min
Veículo (controle)	–	177,0 $\pm$ 3,0	180,0 $\pm$ 0,0	180,0 $\pm$ 0,0
(–)-Carvona	50	179,6 $\pm$ 0,4	179,5 $\pm$ 0,5	166,9 $\pm$ 12,2
	100	161,3 $\pm$ 16,7	154,4 $\pm$ 16,5	179,4 $\pm$ 0,6
	200	162,1 $\pm$ 17,9	168,4 $\pm$ 11,6	180,0 $\pm$ 0,0
Diazepam	4	32,0 $\pm$ 7,3*	75,3 $\pm$ 21,4*	166,9 $\pm$ 7,8

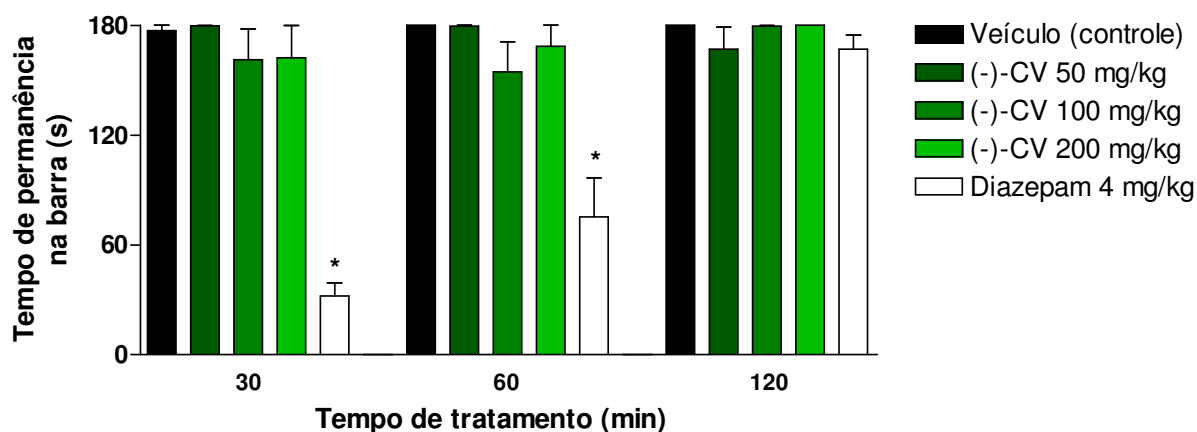


Gráfico 6 – Efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 50–200 mg/kg) e diazepam (4 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rota-rod. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=8$) * $p<0,01$ vs grupo controle (ANOVA – Teste de Dunnett).

5.2 Ensaios *in vitro* – eletrofisiológicos

5.2.1 Efeito de (–)-carvona sobre a excitabilidade do nervo isolado de rato

Utilizando-se a técnica de *single sucrose gap* foi verificado que a (–)-carvona exercia uma atividade sobre o SNP de ratos, ao promover uma redução na excitabilidade do nervo isquiático desses animais, diminuindo a amplitude do PAC e reduzindo a sua velocidade de despolarização, observada pelo aumento da inclinação da curva durante a fase ascendente (Figura 17).

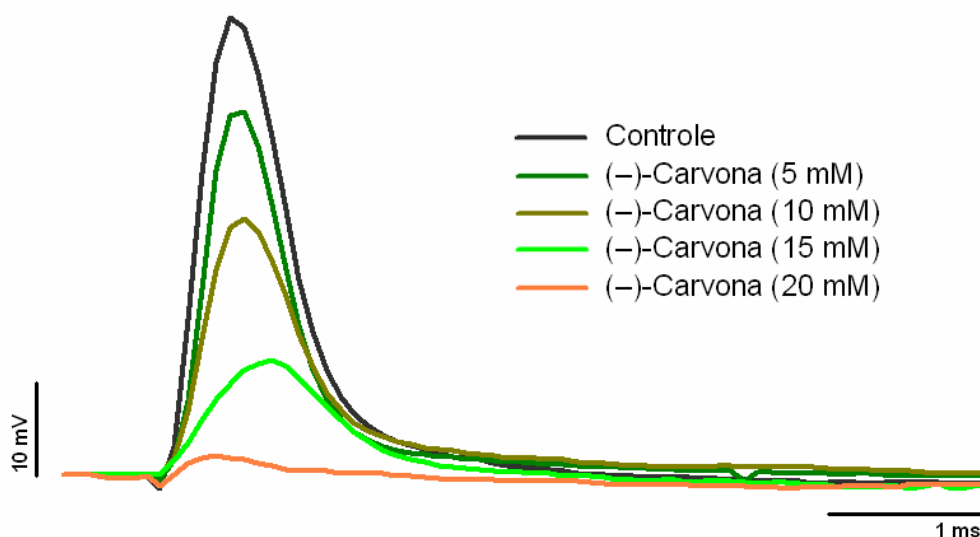


Figura 17 – Registros do PAC sobrepostos obtidos pela técnica de *single sucrose gap*. Esta figura mostra as alterações induzidas por (–)-carvona (5–20 mM) após 30 min de incubação sobre o nervo isquiático de ratos. O registro controle foi obtido quando apenas a solução fisiológica (Locke) era submetida ao nervo. Parâmetros de estimulação: 7–8 V/0,1 ms.

A tabela 3 mostra os valores obtidos nesta preparação para as concentrações de 1 a 20 mM de (–)-carvona após os tempos de 10, 20 e 30 min de sua incubação conforme descrita anteriormente (seção 4.3.1). Observou-se que a concentração de 1 mM não foi capaz de produzir efeito significativo sobre A_{PAC} , o que foi alcançado com 5 mM, reduzindo este parâmetro de $33,9 \pm 7,1$ mV para $26,8 \pm 6,6$ mV, após 30 min de incubação ($n=4$). A partir de 10 mM, verificou-se que a (–)-carvona conseguia reduzir A_{PAC} com apenas 10 min de incubação, e produzindo um bloqueio quase completo à 20 mM de concentração (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito de (–)-carvona (1–20 mM) sobre a amplitude do PAC após incubação (0–30 min) em nervo isquiático de rato. Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$), * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs controle (0 min) (Teste “t” de Student pareado).

[(–)-carvona] (mM)	Amplitude do PAC (mV) após incubação			
	Controle (0 min)	10 min	20 min	30 min
1	33,3 $\pm$ 5,9	34,4 $\pm$ 4,9	34,7 $\pm$ 5,0	33,9 $\pm$ 5,6
5	33,9 $\pm$ 7,1	29,1 $\pm$ 7,0	27,9 $\pm$ 6,9	26,8 $\pm$ 6,6*
10	50,8 $\pm$ 3,4	35,9 $\pm$ 5,7*	29,6 $\pm$ 7,5*	27,2 $\pm$ 7,1*
15	53,5 $\pm$ 1,1	24,5 $\pm$ 6,2*	17,4 $\pm$ 5,0**	13,0 $\pm$ 4,1**
20	51,6 $\pm$ 4,4	19,4 $\pm$ 8,5**	6,9 $\pm$ 3,5**	2,3 $\pm$ 1,1**

Convém ressaltar que não foram observadas alterações significativas sobre os parâmetros do PAC, quando o nervo foi submetido apenas ao veículo (0,5% Tween 80 dissolvido em Locke) por 1 h de incubação (dados não mostrados).

De acordo com o gráfico 7, o qual expressa os valores normalizados de A_{PAC} (Tabela 3) a partir do controle (0 min), em função do tempo de incubação, demonstrou-se que os efeitos de (–)-carvona (5–20 mM) eram estabilizados em 30 min, uma vez que a amplitude do PAC não mais era reduzida de maneira significativa a partir de 20 min de incubação, em relação aos efeitos observados em 10 e 20 min respectivamente.

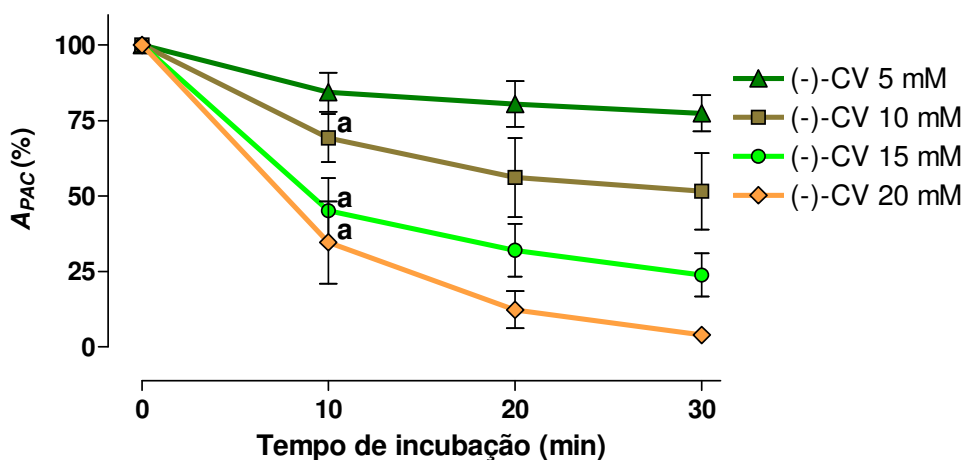


Gráfico 7 – Estabilização do efeito de (–)-carvona ((–)-CV, 5–20 mM) sobre o nervo periférico após 30 min de incubação (min). Os valores expressos foram normalizados a partir do controle (0 min). $n=4$ ^a $p<0,05$ (10 min vs 0 min); ^b $p<0,05$ (20 min vs 10 min); ^c $p<0,05$ (30 min vs 20 min), teste “t” de Student pareado.

A fim de se observar uma possível dependência da concentração dos efeitos de (–)-carvona (1–20 mM), os valores de A_{PAC} obtidos com 30 min de incubação ($A_{PAC(30min)}$) (Tabela 3), foram normalizados a partir do controle ($A_{PAC(cont.)}$) e expressos como a porcentagem de bloqueio do PAC, de acordo com a seguinte fórmula: $\%Bloqueio = 100 - (A_{PAC(30min)} / A_{PAC(cont.)} * 100)$. Posteriormente, os valores obtidos foram aplicados, por regressão não-linear, à equação de Hill: $f = Min + (Max - Min) / 1 + 10^{(logIC_{50} - [(-)-CV]^n)}$, onde Max e Min representam as porcentagens de bloqueio máxima e mínima do PAC, respectivamente, em função do log da concentração de (–)-carvona ($[(-)-CV]$). O coeficiente de Hill é representado por n .

A partir dos dados obtidos, observou-se que o efeito de (–)-carvona sobre o bloqueio da condução do nervo periférico, apresenta uma concentração inibitória mediana (IC_{50}) de aproximadamente 10,6 mM, e um valor de n igual a $2,2 \pm 0,7$ ($R^2=0,99$) (Gráfico 8).

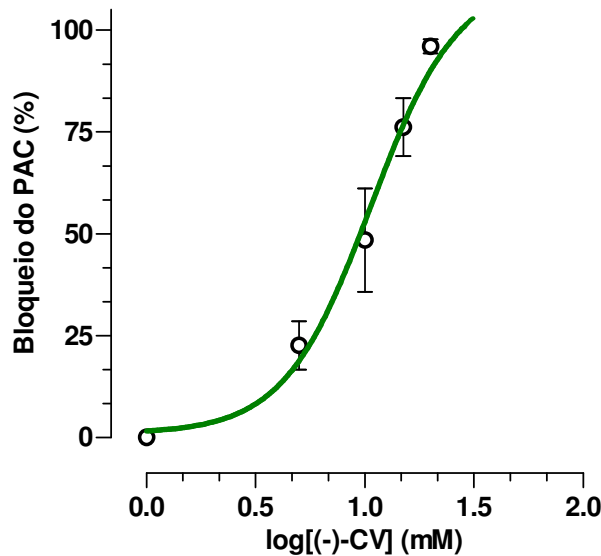


Gráfico 8 – Efeito dependente da concentração de (–)-carvona ((–)-CV, 1–20 mM) sobre a porcentagem de bloqueio da amplitude do PAC. Os valores foram normalizados e aplicados na equação de Hill: $f = Min + (Max - Min) / 1 + 10^{(logIC_{50} - [(-)-CV]^n)}$, por regressão não-linear, a partir de um total de quatro experimentos para cada concentração.

5.2.2 Efeito de (–)-carvona sobre as características do PAC

Com a finalidade de se obter uma análise mais detalhada dos efeitos da (–)-carvona sobre os eventos de despolarização e repolarização do PAC, as mudanças nos parâmetros TP_{PAC} , VD_{PAC} e τ_{rep} , conforme descritos anteriormente

(seção 4.3.1), foram avaliadas. Os valores obtidos a partir dos registros controle (com apenas a solução de Locke) e após 30 min de incubação com (–)-carvona (1–15 mM), foram devidamente expressos na tabela 4. Estes parâmetros (TP_{PAC} , VD_{PAC} e τ_{rep}) não puderam ser calculados quando 20 mM de (–)-carvona foi usada, uma vez que os registros do PAC nesta concentração eram praticamente anulados.

De acordo com os parâmetros de despolarização analisados (TP_{PAC} e VD_{PAC}), observou-se que (–)-carvona, apenas em 15 mM, provocou um aumento de TP_{PAC} , enquanto que concentrações a partir de 5 mM deste monoterpene foram suficientes para induzir a redução de VD_{PAC} (Tabela 4). Ao avaliarem-se os valores obtidos de τ_{rep} , não foram observadas alterações significativas sobre este parâmetro de repolarização, nas concentrações estudadas de (–)-carvona (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito de (–)-carvona (1–15 mM) sobre a despolarização (TP_{PAC} e VD_{PAC}) e a repolarização (τ_{rep}) do PAC. Os valores foram obtidos após 30 min de incubação com (–)-carvona sobre o nervo isquiático de rato, e expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$) * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs 0 min (controle) (Teste "t" de Student pareado).

[(–)-Carvona] / Incubação		Parâmetros do PAC analisados		
		TP_{PAC} (ms)	VD_{PAC} (V/s)	τ_{rep} (ms)
1 mM	0 min	0,61 $\pm$ 0,07	65,0 $\pm$ 17,5	0,51 $\pm$ 0,07
	30 min	0,55 $\pm$ 0,05	67,6 $\pm$ 8,1	0,55 $\pm$ 0,04
5 mM	0 min	0,68 $\pm$ 0,05	52,9 $\pm$ 16,0	0,44 $\pm$ 0,05
	30 min	0,64 $\pm$ 0,04	43,1 $\pm$ 13,4*	0,44 $\pm$ 0,03
10 mM	0 min	0,50 $\pm$ 0,05	105,2 $\pm$ 13,7	0,35 $\pm$ 0,02
	30 min	0,55 $\pm$ 0,06	50,4 $\pm$ 15,1*	0,35 $\pm$ 0,04
15 mM	0 min	0,59 $\pm$ 0,03	91,1 $\pm$ 4,4	0,43 $\pm$ 0,03
	30 min	0,71 $\pm$ 0,02*	18,1 $\pm$ 5,5**	0,47 $\pm$ 0,04

5.2.3 Comparação do efeito de (–)-carvona aos exercidos pelos bloqueadores padrões de canais Na_v e K_v

A comparação entre os efeitos da (–)-carvona aos provocados pelos bloqueadores de canais para Na^+ e K^+ dependentes de voltagem (Na_v e K_v), lidocaína e 4-aminopiridina (4-AP) respectivamente (CUMMINS; SHEETS;

WAXMAN, 2007; JUDGE; BEVER-JR, 2006) foi realizada incubando-se essas substâncias separadamente ao nervo isquiádico de rato, conforme descrito em métodos (seção 4.3.2), tomando-se como parâmetros os valores de VD_{PAC} e de τ_{rep} . A figura 18 mostra os registros do PAC obtidos por estes compostos após 10, 20 e 30 min de incubação.

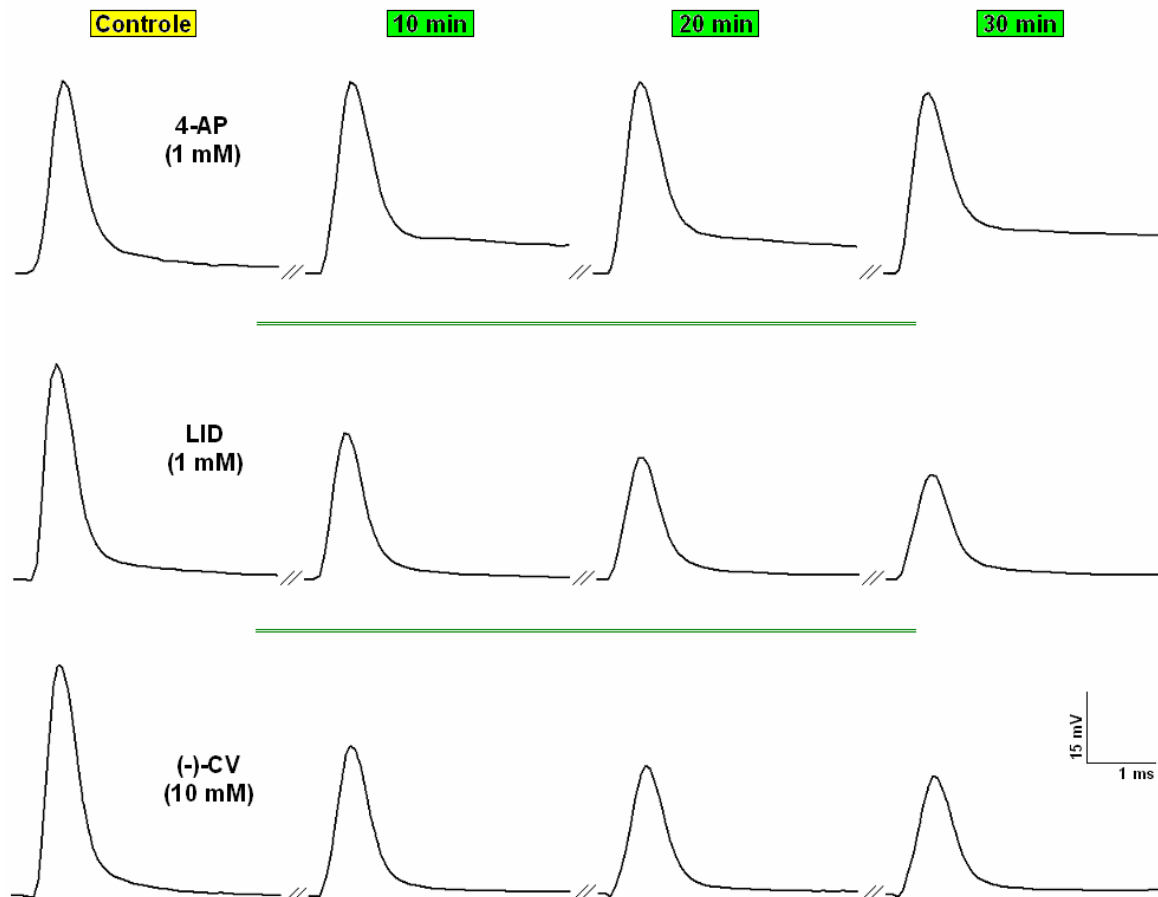


Figura 18 – Registros do PAC obtidos após incubação por 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e (-)-carvona ((-)-CV, 10 mM), separadamente, em nervo isquiádico de rato. Os registros controle foram obtidos quando apenas a solução fisiológica (Locke) era submetida ao nervo. Parâmetros de estimulação: 7–8 V/0,1 ms.

Foi observado que a lidocaína (1 mM) e a (-)-cavona (10 mM), produziram efeitos semelhantes em VD_{PAC} , reduzindo de $100,2 \pm 16,7$ para $49,2 \pm 11,3$ V/s; e de $105,2 \pm 13,7$ para $50,4 \pm 15,1$ V/s, respectivamente, após 30 min de incubação à partir do controle ($n=4$, $p<0,05$). Entretanto, a 4-AP (1 mM) não foi capaz de produzir resultados significativos sobre este parâmetro. O gráficos 9 demonstra claramente

as semelhanças e diferenças entre os efeitos de (–)-carvona (10 mM), lidocaína (1 mM) e 4-AP (1 mM) sobre VD_{PAC} .

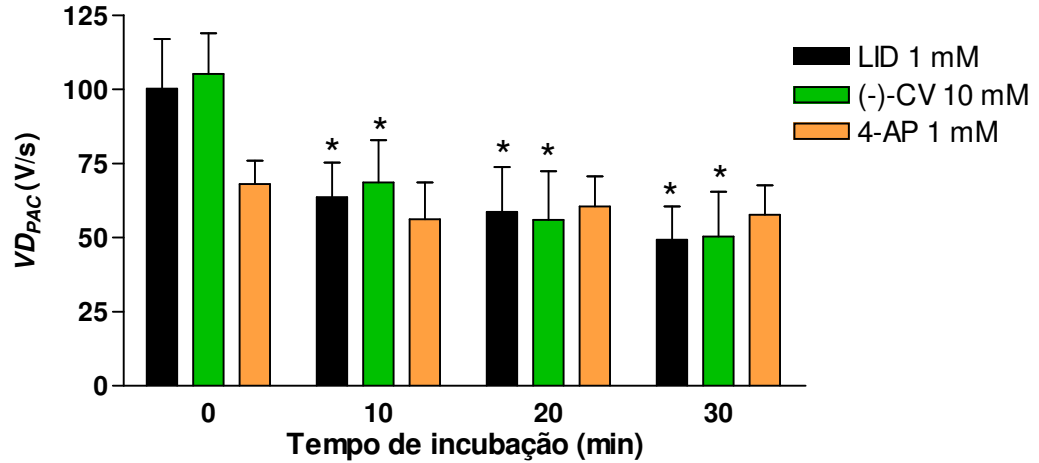


Gráfico 9 – Comparação entre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 10 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), incubadas separadamente, sobre a velocidade de despolarização do PAC (VD_{PAC}). Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$). * $p < 0,05$; vs controle/0 min (Teste “t” de Student pareado).

Ao avaliarem-se os efeitos produzidos por lidocaína (1 mM), (–)-carvona (10 mM) e 4-AP (1 mM) sobre os valores obtidos de τ_{rep} , observou-se que apenas a 4-AP foi capaz de induzir alterações significativas neste parâmetro de repolarização do PAC, aumentando de $0,55 \pm 0,09$ para $0,93 \pm 0,14$ ms ($n=4$, $p < 0,01$), após 30 min de incubação a partir do controle/0 min (Gráfico 10).

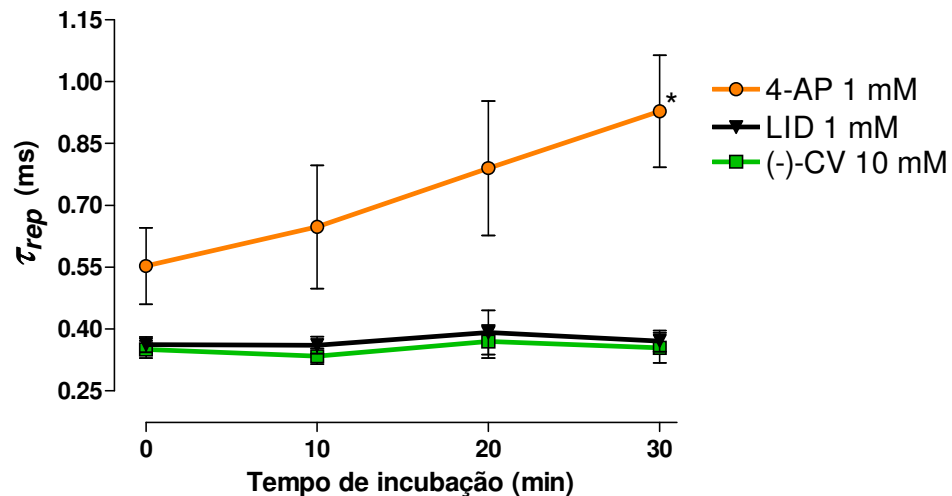


Gráfico 10 – Comparação entre os efeitos de (–)-carvona ((–)-CV, 10 mM), lidocaína (LID, 1 mM) e 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), incubadas separadamente, sobre a constante de repolarização do PAC (τ_{rep}). Os valores foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$). * $p < 0,01$ vs controle/0 min (Teste “t” de Student pareado).

5.2.4 Investigação do possível efeito uso-dependente de (–)-carvona

Os resultados obtidos durante a investigação do efeito de (–)-carvona (7 mM) após 30 minutos de incubação sobre a percentagem de bloqueio de A_{PAC} (seção 4.3.2), variando-se a frequência do estímulo em nervo isolado (efeito fásico), foram de: $24,1 \pm 5,4\%$; $23,5 \pm 6,7\%$; $25,9 \pm 6,9\%$, nas frequências de 10, 50 e 100 Hz, respectivamente. A figura 19 mostra os registros do PAC obtidos por este método usando as frequências de 50 e 100 Hz. Esses valores não atingiram significância estatística, quando comparados aos obtidos por (–)-carvona (7 mM) sob estimulação tônica (pulso único), que foi de $23,0 \pm 5,7\%$ (Gráfico 11).

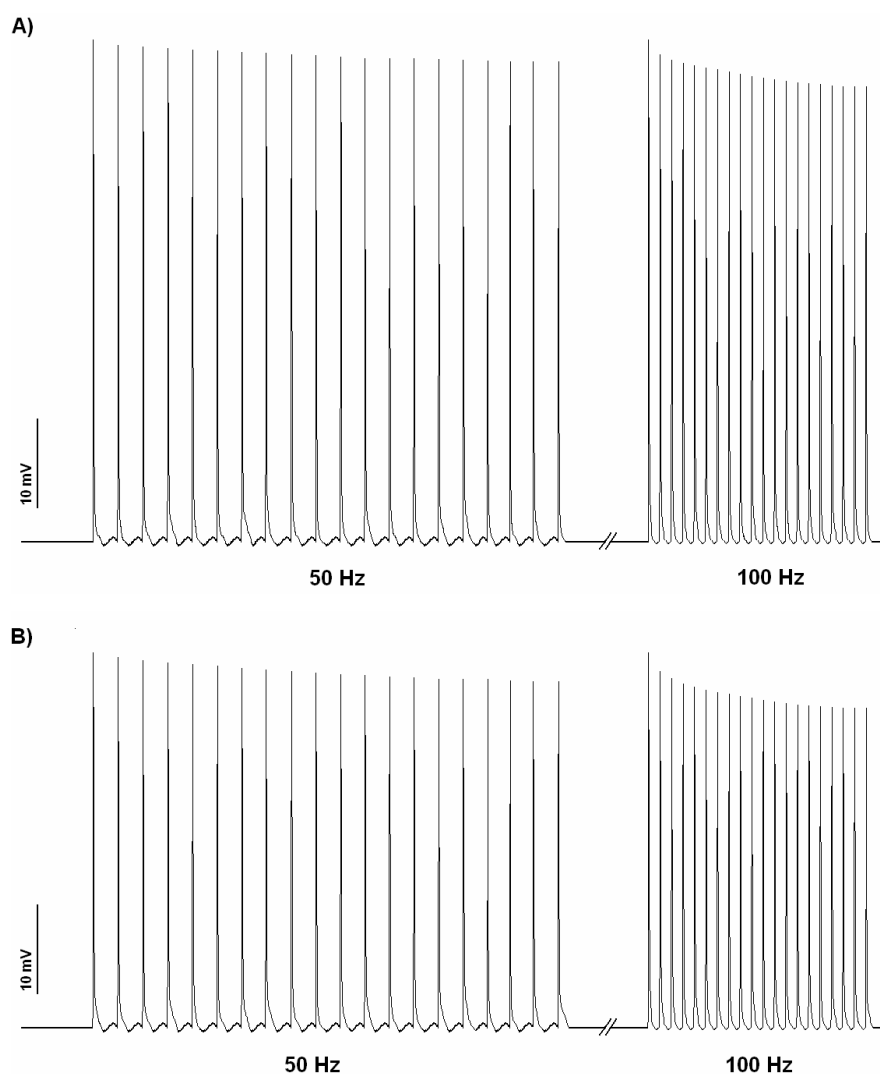


Figura 19 – Registros do PAC obtidos após 30 min de incubação com (–)-carvona (7 mM) aumentando-se a frequência de estimulação. Em A) estão os registros controle nas frequências de 50 e 100 Hz, e em B) os registros submetidos à (–)-carvona (7 mM) sob as mesmas condições de estímulo, em nervo isquiático de rato. Parâmetros de estimulação: 7–8 V/0,1 ms.

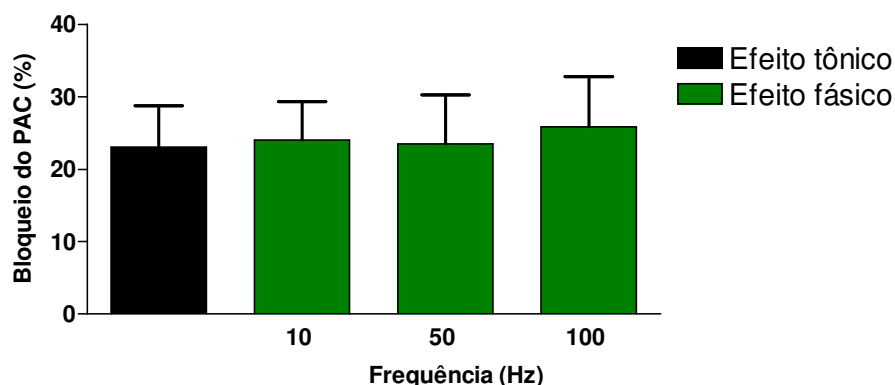


Gráfico 11 – Influência do aumento da frequência de estimulação (10–100 Hz) sobre os efeitos de (–)-carvona (7 mM) em nervo isolado de rato. Os valores foram obtidos após 30 min de incubação e expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$) a partir da equação: $\%Bloqueio = [(A_{PACc} - A_{PACd}) / A_{PACc}] * 100$, e comparados com os efeitos de (–)-carvona (7 mM) obtidos quando o nervo era estimulado por pulso único (efeito tônico) (Teste “t” de Student pareado).

5.2.5 Reversibilidade do efeito de (–)-carvona sobre o nervo periférico de rato

Durante esta investigação, submetendo-se o nervo periférico incubado por (–)-carvona (15 mM) à lavagem com solução fisiológica (Locke), foi observado que o efeito provocado por este monoterpreno sobre A_{PAC} foi parcialmente revertido para $30,6 \pm 3,5$ mV, após 30 min da lavagem. Os valores obtidos pelo controle/0 min e nos tempos de 10, 20 e 30 de incubação por 15 mM de (–)-carvona podem ser observados na tabela 3.

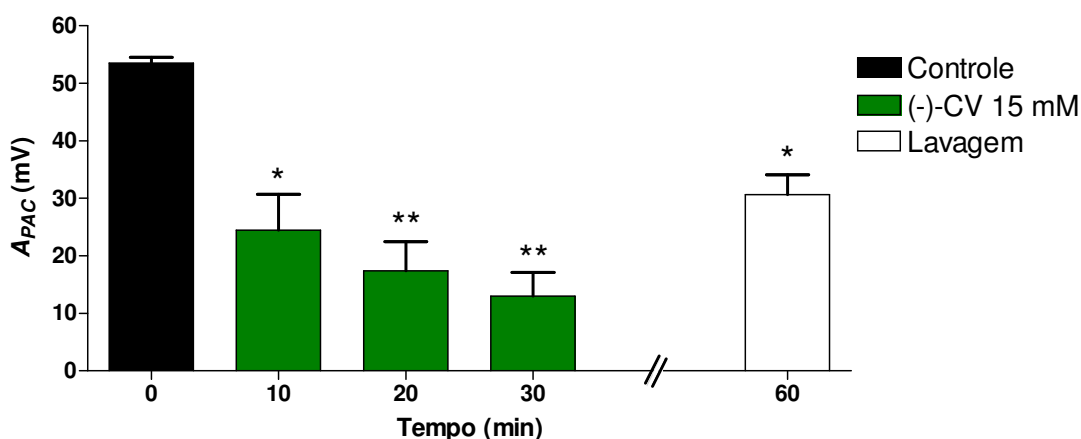


Gráfico 12 – Reversibilidade do efeito de (–)-carvona ((–)-CV 15 mM) sobre o nervo periférico de rato. Os valores foram obtidos quando (–)-CV (15 mM) era incubada (0–30 min) e após sua lavagem com solução fisiológica de Locke (60 min). Em seguida foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. ($n=4$) * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs grupo controle/0 min (Teste “t” de Student pareado).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O alívio da sensação dolorosa continua sendo um dos grandes alvos da medicina moderna, onde se tenta sobretudo, desenvolver substâncias que possuam efeito sobre o sistema nervoso central, podendo ser utilizadas no alívio das dores crônicas, ou ainda na obtenção de fármacos com eficácia semelhante ou maior do que aqueles já utilizados na terapêutica, mas com menor incidência de efeitos colaterais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

O estudo farmacológico do composto (–)-carvona mostrou-se bastante promissor no que diz respeito à busca por um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor, uma vez que esta substância foi capaz de reduzir a resposta ao estímulo nociceptivo, sob diferentes metodologias comportamentais para analgesia. Adicionalmente este estudo contribuirá para a compreensão do perfil terapêutico dos óleos essenciais obtidos de espécies vegetais, principalmente do gênero *Mentha*, os quais a (–)-carvona geralmente atua como principal constituinte ativo (DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007).

Por meio de diferentes modelos comportamentais foi possível confirmar que (–)-carvona apresentou uma atividade do tipo antinociceptiva, que foi exibida *in vivo* em camundongos. Um destes modelos utilizados foi o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, um teste simples, rápido e confiável para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias centrais e periféricas (AMARAL et al., 2007; OLIVEIRA, 2006; SHINDE et al., 1999). Durante este teste, o estímulo nociceptivo induzido promove o lançamento de substâncias endógenas e neurotransmissores que estimulam terminações nervosas da dor (KHANNA; BHATIA, 2003; TRONGSAKUL et al., 2003), envolvidos por estimulação direta das fibras aferentes nociceptivas, devido a uma redução do pH ou pela síntese de mediadores da inflamação, a exemplo de metabólitos do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase (COX), com conseqüente biossíntese de prostaglandinas (PG's) (FRANZOTTI et al., 2000) tais como E_{α} e $F_{2\alpha}$ no fluido peritoneal (DERAEDT et al., 1976, 1980), ou ainda, devido a participação de citocinas liberadas por macrófagos e mastócitos peritoneais (RIBEIRO et al., 2000).

O presente estudo demonstrou que o tratamento prévio com (–)-carvona provocou uma redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, e também, que a intensidade deste efeito se deu de modo

dose-depende, sendo capaz de bloquear quase que completamente a resposta nociceptiva quando os camundondos eram tratados com 200 mg/kg deste monoterpeno. Observou-se ainda neste teste, semelhanças entre os efeitos de (–)-carvona aos induzidos pela morfina, um analgésico opióide padrão (gráfico 1). Portanto, estes reforçam o estudo prévio que relatou uma atividade da (–)-carvona neste teste (DE SOUSA et al., 2007b), entretanto o uso de doses mais baixas e uma resposta dose-dependente desta substância durante este teste não haviam sido reportados até então.

Os resultados observados no teste do ácido acético sugerem que a (–)-carvona possui uma atividade analgésica, a qual poderia estar sendo promovida pelo bloqueio nociceptivo tanto pela via central quanto pela periférica, ou mesmo pela supressão de mediadores da inflamação. Com a finalidade de melhor caracterizar esta resposta antinociceptiva, foram realizados testes comportamentais mais específicos como o teste da formalina e o teste da placa quente (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006).

O teste da formalina tem sido uma valiosa ferramenta na avaliação drogas com propriedades analgésicas (FENG et al., 2005). Este teste consiste em um modelo de resposta nociceptiva que possui duas fases envolvidas por mecanismos distintos. A primeira fase (dor neurogênica) resulta de uma estimulação direta de fibras aferentes mielínicas a amielínicas, principalmente fibras C (HEAPY; JAMIESON; RUSSEL, 1987), que podem ser suprimidas por drogas analgésicas opióides como a morfina. A segunda fase (dor inflamatória) resulta da liberação de mediadores inflamatórios nos tecidos periféricos e de mudanças funcionais de neurônios espinhais que promovem a facilitação da transmissão sináptica (CAMPOS et al., 2002; FRANÇA et al., 2001). Esta última fase foi indicada por ser sensível à ação da maioria de drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES), como o ácido acetil salicílico (AAS), indometacina e naproxeno (DAI et al., 2002; TJOLSEN et al., 1992). Entre a primeira e a segunda fase do teste da formalina, ainda há um período de repouso chamado de “interfase” que ocorre devido a uma ativação de processos inibitórios não regulados por mecanismos que envolvem o GABA, uma vez que os agonistas gabaérgicos tipo A inibem a diminuição de manifestações de dor durante este período (HENRY et al., 1999; LIRA, 2001; OLIVEIRA, 2006).

A partir dos resultados apresentados (Gráficos 2 e 3) observou-se que a (–)-carvona produziu uma redução da resposta nociceptiva em ambas as fases do

teste da formalina, de modo semelhante à morfina e a outras drogas analgésicas de ação central descritas na literatura (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006). Como esperado, o efeito analgésico induzido pelo AAS foi evidente apenas na segunda fase deste teste (RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003), sendo portanto pouco provável um efeito apenas do tipo antiinflamatório exercido por (–)-carvona, uma vez que também foi eficaz na 1ª faz do teste da formalina.

O teste da placa quente é utilizado na pesquisa de substâncias analgésicas de ação central através da avaliação do bloqueio da resposta nociceptiva provocada por estimulação térmica em animais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Neste teste, observou-se que (–)-carvona, nas doses estudadas, falhou em demonstrar qualquer influência significativa sobre o estímulo nociceptivo térmico, enquanto que a morfina foi capaz de aumentar o tempo de permanência dos animais sobre a placa como esperado (Gráfico 4). Sabe-se que este teste é conhecido por ser sensível apenas para drogas que atuam em nível supraespinal (CAMPOS et al., 2002; FRANÇA et al., 2001; PEANA et al., 2003), sugerindo-se, portanto, uma improvável participação desta via durante a ação analgésica de (–)-carvona. Entretanto, a utilização de antagonistas seletivos para drogas antinociceptivas de efeito central seria necessária para confirmar esta hipótese.

Durante a nocicepção induzida nos testes da formalina e das contorções abdominais induzidas por ácido acético, foi relatada a ativação de receptores μ - e κ -opioides, uma vez que drogas analgésicas opioides como a morfina, mostraram-se eficientes em reduzir o estímulo álgico durante a execução destas metodologias (HUNSKAR; FASMAR; HOLE, 1985; OLIVEIRA, 2006; SOUZA et al., 2000; VAZ et al., 1996). Com a finalidade de se avaliar um provável envolvimento do sistema opióide durante o efeito analgésico de (–)-carvona, foi utilizado um antagonista opióide padrão, a naloxona (HELM et al., 2008; PEANA et al., 2003), durante o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, devido a uma simples, rápida e confiável execução na avaliação da atividade antinociceptiva por esta metodologia (OLIVEIRA, 2006; SHINDE et al., 1999).

A partir dos resultados obtidos, sugeriu-se que a (–)-carvona não parece atuar pela via opióide de antinocicepção central, uma vez que a naloxona não conseguiu reverter o efeito analgésico deste monoterpeneo, contrariamente ao ocorrido com o agonista opióide padrão, morfina (Gráfico 5). Esta sugestão é reforçada pela evidência de que a (–)-carvona não se mostrou efetiva durante o

teste da placa quente (Tabela 1). Estes resultados, aliados às evidências relatadas previamente, indicando que os efeitos provocados por (–)-carvona não parecem associar-se com a ativação de receptores para a glicina ou gabaérgicos ou (HALL et al., 2004), reforçam ainda mais a hipótese de que este composto atua de forma menos incisiva sob a via do SNC. Entretanto, a possibilidade de atuação por outras vias centrais de nocicepção como a muscarínica (NAGUIB; YAKSH, 1997), glutamatérgica (CHIZH et al., 2001; CODERRE; VAN EMPEL, 1994) e/ou dopaminérgica (PEANA, 2004), não pôde ser completamente descartada.

Estudos prévios sugeriram que um relaxamento muscular não-específico, resultante de um efeito depressor de certa droga sobre o SNC, pode reduzir a coordenação motora dos animais em experimentação e, dessa forma, invalidar os resultados obtidos para analgesia comportamental (AMARAL et al., 2007; ROSLAND et al., 1990; SANTOS; RAO, 2000; SANTOS et al., 2005; TJOLSEN et al., 1992). Portanto fez-se necessário avaliar o efeito (–)-carvona, nas doses utilizadas neste estudo, sobre a coordenação da atividade motora de camundongos por meio do teste do Rota-rod.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que (–)-carvona (50, 100 e 200 mg/kg) não produziu nenhuma mudança significativa na coordenação motora dos camundongos tratados (i.p.), sobre o aparelho de Rota-rod (Tabela 2). Como esperado, esses animais perderam sua coordenação quando foram tratados (i.p.) com diazepam (Gráfico 6), um agente depressor padrão do SNC (JAMES; SELLERI; KASSIOU, 2006; OLKKOLA; AHONEN, 2008; SILVA et al., 2007).

Portanto a possibilidade da (–)-carvona estar promovendo uma perda da coordenação motora, decorrente de relaxamento muscular nas doses testadas foi descartada, validando conseqüentemente, os resultados apresentados pelos testes comportamentais para analgesia com esta substância durante este estudo.

Foi reportado que a lidocaína, um anestésico local bloqueador de canais do tipo Na_v (CUMMINS; SHEETS; WAXMAN, 2007; HILLE, 2001), foi capaz de induzir uma resposta antinociceptiva significativa em ambas as fases do teste da formalina (ABBADIE et al., 1997; BITTENCOURT; TAKAHASHI, 1997), e também reduzir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (KARTTUNEN et al., 1988). A partir desses resultados, levantou-se a hipótese de que a (–)-carvona poderia ter sido eficaz nestes mesmos testes para analgesia por um mecanismo semelhante à lidocaína, inibindo a geração e propagação da condução do estímulo

álgico em nervos periféricos (DE JONG, 2001; HILLE, 2001). Dessa forma poder-se-ia explicar a ausência de efeito da (–)-carvona durante o teste da placa quente, em que a participação da via opióide central é mais determinante do que a periférica (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006; MOORE; BURNEY, 1979; WIESENFELD-HALLIN LINDBLOM, 1985).

Para comprovar uma possível atividade nervosa periférica de (–)-carvona realizaram-se estudos *in vitro*, cuja principal vantagem está relacionada com a possibilidade de redução do número de animais utilizados (GARLE; FENTEM; FRY, 1994) e com o auxílio na elucidação dos mecanismos de ação das substâncias em nível celular e molecular (EISENBRAND et al., 2002).

A técnica de “single sucrose gap” possibilita o estudo da atividade de compostos bioativos sobre o nervo periférico, por meio da medida de potenciais de membrana através de eletrodos externos (STAMPFLI, 1954), possibilitando uma rápida obtenção dos resultados de forma não dispendiosa (MONTENEGRO, 2003). Por meio desta técnica, confirmou-se que (–)-carvona possui atividade sobre o SNP de ratos, ao promover uma redução na excitabilidade do nervo isquiático isolado desses animais (Figura 17). Tal efeito foi evidenciado por uma diminuição da amplitude do PAC (Tabela 3), característica esta de drogas como a lidocaína, por atuarem através do bloqueio dos canais para sódio do tipo Na_v (CUMMINS; SHEETS; WAXMAN, 2007; HILLE, 2001).

Indica-se que uma redução de 50% da amplitude de potenciais de ação, seriam suficientes para provocar déficit da função neuronal (HILLE, 2001), acarretando na inibição da transmissão nociceptiva. Neste estudo foi observado que (–)-carvona reduziu a amplitude do PAC de um modo dependente de sua concentração, podendo produzir um decréscimo de 50% na excitabilidade nervosa periférica com aproximadamente 10 mM de concentração ($IC_{50} = 10,6$ mM) (Gráfico 8). Também foi demonstrado que tal efeito dependia do tempo de incubação, verificando-se que a (–)-carvona atingia o seu efeito máximo sobre o nervo em 30 min (Gráfico 7).

Ao avaliar-se de forma mais detalhada as alterações do PAC provocadas por (–)-carvona, notou-se que este composto conseguiu produzir mudanças significativas nos parâmetros da fase de despolarização TP_{PAC} e VD_{PAC} (Tabela 4). Entretanto, este último parâmetro demonstrou ser mais sensível à mudanças nesta fase do PAC, uma vez que apresentou resultados significativos em concentrações

mais baixas do que TP_{PAC} , podendo dessa forma, ser utilizado no desenvolvimento de trabalhos futuros que objetivem avaliar os efeitos de substâncias bioativas sobre a fase de despolarização do PAC.

Pelo motivo citado, o presente estudo tomou os valores de VD_{PAC} como parâmetro de escolha durante o estudo comparativo entre os efeitos de (–)-carvona aos exercidos pelos bloqueadores padrão dos canais do tipo Na_v e K_v , lidocaína e 4-aminopiridina (4-AP) respectivamente, sobre a fase de despolarização do PAC. Esta metodologia teve como objetivo sugerir um possível envolvimento dos canais Na_v ou K_v durante os efeitos de (–)-carvona.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que a lidocaína (1 mM) reduziu VD_{PAC} , enquanto que a 4-AP (1 mM) não produziu nenhuma alteração significativa sobre este parâmetro (Gráfico 9). Estes dados indicaram que o bloqueio dos canais para Na^+ operados por voltagem contribui de forma significativa sobre a redução de VD_{PAC} , o que era esperado, uma vez que esses canais são considerados como as bases da excitabilidade neuronal (CRUZ et al., 2000).

Portanto, ao evidenciarem-se as semelhanças entre os efeitos da lidocaína e da (–)-carvona, sugeriu-se que este monoterpene estaria promovendo a redução da excitabilidade nervosa, pelo bloqueio dos canais Na_v . Esta hipótese pode ser apoiada pela indicação de que o bloqueio de tais canais estaria relacionado com o aumento do TP_{PAC} (CATTERALL, 2000; GUVEN et al., 2006; HILLE, 2001; LUI et al., 2003), o que foi refletido com uma redução significativa de VD_{PAC} , assim como ocorreu com a lidocaína.

Apesar dos canais Na_v , de inativação lenta, também estarem envolvidos na fase de repolarização do PAC (CRUZ et al., 2000), os canais K_v , dentre os quais os retificadores retardados, são descritos como os principais responsáveis por esta fase em potenciais de ação de nervos periféricos (GUVEN et al., 2006). Com a finalidade de se poder sugerir uma possível interação entre a (–)-carvona e esses tipos de canais, utilizou-se como parâmetro a constante de tempo de repolarização do PAC (τ_{rep}), que possibilita medir alterações de tempo durante a repolarização do PAC (DE SOUSA et al., 2006).

Espera-se que compostos que possuam atividade bloqueadora sobre os canais tipo K_v aumentem o tempo para a repolarização do PAC, o que pode ser visualizado no registro, como uma redução na inclinação da curva desta fase (descendente), refletindo-se em um aumento de τ_{rep} . Contudo, observou-se que a

(-)-carvona, em todas as concentrações estudadas, não foi capaz de produzir alterações significativas sobre este parâmetro (Tabela 4).

Durante a comparação dos efeitos produzidos por (-)-carvona (10 mM), lidocaína (1 mM) e 4-AP (1 mM), sobre a fase de repolarização do PAC avaliando-se eventuais mudanças nos valores de τ_{rep} , observou-se que apenas a 4-AP conseguiu prolongar o tempo de repolarização do PAC a partir do controle (Gráfico 10). Esses resultados demonstraram que a (-)-carvona não parece exercer os seus efeitos sobre o nervo periférico pelos mesmos mecanismos da 4-AP, um agente bloqueador dos canais K_v (JUDGE; BEVER-JR, 2006; HILLE, 2001).

A partir dos dados obtidos até então, notou-se uma grande semelhança entre os efeitos produzidos por (-)-carvona aos descritos pelo anestésico local, lidocaína. Em vista de tal semelhança, investigou-se a possibilidade da (-)-carvona igualmente possuir um efeito do tipo uso-dependente, que é característica da lidocaína e da maioria dos AL's (DE JONG, 2001; HILLE, 2001; MOORE; BURNEY, 1979). Para tanto foi verificado se o efeito de (-)-carvona (7 mM) sobre A_{PAC} era aumentado, ao variar-se a frequência de estímulos em 10, 50 e 100 Hz, após 30 min de incubação.

Os resultados mostraram, entretanto, que o aumento da frequência de estímulos sobre o nervo isolado de rato (10–100 Hz), não foi capaz de aumentar o efeito bloqueador de (-)-carvona sobre A_{PAC} (Gráfico 11), ou seja, este composto não demonstrou propriedade do tipo uso-dependente.

Uma explicação para essa observação baseia-se na teoria da modulação do receptor proposta por Hille (1977), descrita para drogas uso-dependentes, através das vias hidrofílica e hidrofóbica. Esta teoria sugere que drogas hidrofílicas não conseguem atravessar a membrana plasmática e necessitam do canal aberto para atuarem, tendo o seu efeito aumentado quando uma maior população desses canais é ativada pelo aumento da frequência de estímulos. Entretanto, drogas com caráter hidrofóbico, atuariam de maneira independente do estado do canal, uma vez que conseguem atravessar a membrana plasmática e alcançarem o seu sítio receptor.

A (-)-carvona, por possuir pouca solubilidade em água devido a sua natureza hidrofóbica, poderia estar exercendo seu efeito bloqueador do PAC, por meio do bloqueio dos canais Na_v , através da via hidrofóbica (HILLE, 1977). Esta informação pode ser de grande valia em estudos posteriores que objetivem um

maior aprofundamento acerca dos mecanismos farmacológicos utilizados por (–)-carvona e/ou pelos seus derivados estruturais.

Várias drogas que atuam nos canais para Na^+ ligam-se a sítios específicos da subunidade α envolvidos nos processos de ativação ou inativação (OGATA; OISHI, 2002). Anestésicos, analgésicos, antiarrítmicos e antiepiléticos ligam-se à região mais interna do poro, provavelmente interagindo com resíduos fenilalanina e tirosina situados na porção interna da região formadora do canal (CATTERALL, 2000, 2002; CATTERALL et al., 2007). Esses canais são, ainda, alvos de alguns tipos de toxinas. As toxinas conhecidas como α -toxinas (como exemplo a tityustoxina), ligam-se à superfície extracelular dos canais para Na^+ dependentes de voltagem, inibindo a sua cinética de inativação rápida, causando um marcado e característico aumento na duração do PAC (CRUZ et al., 2000). Outras toxinas como a tetrodotoxina e a saxitoxina, inibem o fluxo de íons Na^+ , por obstrução da entrada do poro desses canais, bloqueando irreversivelmente a condução nervosa (CATTERALL et al., 2007; HILLE, 2001).

De acordo com os registros do PAC obtidos após a incubação com a (–)-carvona, não foi observado em nenhuma das concentrações estudadas, qualquer aumento significativo de duração do PAC (Figura 17) característico das α -toxinas, sendo assim pouco provável que a (–)-carvona atue pelo mesmo mecanismo descrito por esses bloqueadores. Entretanto, é plausível pensar que este monoterpeno possua um efeito bloqueador semelhante à tetrodotoxina, do tipo irreversível.

De acordo com os resultados apresentados pelos experimentos acerca da reversibilidade do efeito de (–)-carvona sobre o nervo periférico, observou-se que após lavagem deste monoterpeno com solução fisiológica de Locke modificada (~0,5 mL/min), observou-se uma reversão parcial da amplitude do PAC (Gráfico 12). Este experimento demonstrou a possibilidade de reversão do efeito de (–)-carvona, característica esta da maioria dos anestésicos utilizados na terapêutica (DE JONG, 2001).

Portanto, os resultados apresentados neste estudo evidenciaram um efeito promissor de (–)-carvona como substância antinociceptiva, uma vez que foi eficaz em testes *in vivo* da inibição da resposta álgica como o teste da formalina. Este que é considerado um teste que assemelha de forma mais aproximada a dor clínica em comparação com outros testes que empregam estimulação mecânica ou térmica

(CAMPOS et al., 2002; TJOLSEN et al., 1992). Entretanto, a possibilidade de envolvimento do sistema opióide de analgesia central foi descartada, uma vez que o seu efeito não foi bloqueado pela naloxona.

Este trabalho demonstrou, ainda, que a resposta antinociceptiva de (–)-carvona está relacionada com o bloqueio da excitabilidade do nervo periférico, provavelmente devido ao bloqueio dos canais Na_v , devido às suas semelhanças com a lidocaína. Entretanto, a possibilidade de envolvimento de ambos os sistemas nervosos central e periférico, por mecanismos distintos de analgesia, não pôde ser completamente descartada. Para tanto, estudos adicionais serão necessários para que se possa evidenciar os mecanismos envolvidos durante a resposta antinociceptiva promovida por (–)-carvona.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o monoterpeno (–)-carvona, nas doses e concentrações testadas:

- Apresentou atividade antinociceptiva evidenciada em diferentes metodologias para analgesia *in vivo*, como os testes da formalina e de indução de contorções abdominais pelo ácido acético;
- Não parece atuar pela via central opióide, já que foi ineficaz no teste da placa quente e não sofreu antagonismo pela naloxona;
- Reduziu a excitabilidade do nervo isquiádico isolado de rato, comprovando o envolvimento da via periférica em seu(s) mecanismo(s);
- Atua de um modo dependente do tempo de incubação e da sua concentração, apresentando uma IC_{50} de 10,6 mM;
- Reduziu os valores de A_{PAC} e TP_{PAC} e aumentou VD_{PAC} , semelhantemente à lidocaína, sugerindo-se um bloqueio dos canais tipo Na_v em seu mecanismo antinociceptivo;
- Parece interagir com o seu receptor, no nervo periférico, de maneira independente do seu estado de ativação, uma vez que não promoveu efeito do tipo uso-dependente.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBADIE, C.; TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. 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, p. 101–110, 1997.
- ABBOTT, F. V.; OCVRK, R.; NAJAFEE, R.; FRANKLIN, K. B. J. Improving the efficiency of the formalin test. **Pain**, v. 83, p. 561–569, 1999.
- AGNEW, W. S.; MOORE, A. C.; LEVINSON, S. R.; RAFTERY, M. A. Identification of large molecular weight peptidea associated with a tetrodoxin binding proteins from the electroplax of *Electrophorus electrus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 92, p. 860–866, 1980.
- ALMEIDA, R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de Drogas Analgésicas de Ação Central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 179–188.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; POLARI, R. M. P.; FILHO, J. M. B.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C. D.; FERREIRA, D. F.; ANTONIOLLI, A.; ARAÚJO, C. A. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72–76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334–338, 1996.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; FATURI, C. B.; CATALLANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 77, p. 361–364, 2004.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletim Latinoamericano e do Caribe de Plantas Mediciniais Aromáticas**, v. 2, p. 3–6, 2003.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; AGRA, M. F.; ALMEIDA, E. R.; MAJETICH, G.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic Effect of Dioclenol and Dioflorin Isolated from *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 394–395, 2000.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310–322, 2001.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; DE ASSIS, T. S.; DE MEDEIROS, I. A.; THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 247–252, 1998.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1217–1220, 2007.

ARENDT-NEILSEN, L.; SVENSSON, P. Referred muscle pain: Basic and clinical findings. **The Clinical Journal of Pain**, v. 17, p. 11–19, 2001.

ARMSTRONG, C. M.; HILLE, B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. **Neuron**, v. 20, p.371, 1998.

BALLANTYNE, J. C. Opioid misuse in oncology pain patients. **Current Pain and Headache Reports**, v. 11, p. 276–282, 2007.

BASAUM, A.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL. **Principles of Neuroscience**, 4^a Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2000. p. 472–491.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M.; COSTA, A. M. R.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 241–245, 2006.

BITTENCOURT, A. L.; TAKAHASHI, R. N. Mazindol and lidocaine are antinociceptives in the mouse formalin model: involvement of dopamine receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 330, p.109–13, 1997.

BLACK, J. A.; LIU, S.; TANAKA, M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia in inflammatory pain. **Pain**, v. 108, p. 237–247, 2004.

BRAUN-FILHO, J. L.; BRAUN, L. Dor aguda. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**, v. 1, p. 3–14, 2004.

BREER, H. Molecular reaction cascades in olfactory signal transduction. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 621–625, 1991.

BUCHBAUER, G.; JÄGER, W.; GRUBER, A.; DIETRICH, H. R-(+)- and S-(–)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 686–689, 2005.

BURG, E. D.; REMILLARD, C. V. YUAN, J. X. J.K⁺ channels in apoptosis. **The Journal of Membrane Biology**, v. 209, p. 3–20, 2006.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C. YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substance from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, p. 116–120, 2002.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I.; ALBUQUERQUE, F. A. M.; LEAL, L. K.; RAO, V. S. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 441–443, 2005.

CAPASSO, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. Pharmacological effect of the aqueous extract from *Valeriana adscendeus*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 309–312, 1996.

CATERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, p. 13–25, 2000.

CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. **Novartis Foundation Symposium**, v. 241, p. 206–218, 2002.

CATTERALL, W.; CASTÈLE, S.; YAROV-YAROVYOY, V.; YU, F. H.; KONOKI, K.; SHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 124–141, 2007.

CHIZH, B. A.; REISSMULLER, E.; SCHLUTZ, H.; SCHEEDE, M.; HAASE, G.; ENGLBERGER, W. Supraspinal vs. spinal sites of the antinociceptive action of the subtype-selective NMDA antagonist ifenprodil. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 212–220, 2001.

CODERRE, T. J.; VAN EMPLÉ, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**, v. 59, p. 345–352, 1994.

COURTNEY, K. R. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 195, p. 225–236, 1975.

CRUZ, J. S.; MATAVEL, A. C. S.; LEÃO-FILHO, H. M.; MORAES-SANTOS, T.; BEIRÃO, P. S. L. Tityustoxin effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium. **Neuroscience Letters**, v. 282, p. 25–28, 2000.

CUMMINS, T. R.; SHEETS, P. L.; WAXMAN, S. G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. **Pain**, v. 131, p. 243–257, 2007.

DAI, Y.; YE, W. C.; WANG, Z. T.; MATSUDA, H.; KUBO, M.; BUT, P. P. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 245–250, 2002.

DE JONG, R. H. Local Anesthetics, St. Louis. Mosby-Year Inc., 1994. BARASH, P. G.; CULLEN, B. F.; STOELTING, R. K. **Clinical Anaesthesia**, 4^a ed. 2001, p. 449–469.

DE LEO, J. A. Basic science of pain. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, American volume, suppl. 2, p. 58–62, 2006.

DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231–235, 2006.

DE SOUSA, D. P.; JÚNIOR, E. V. M.; OLIVEIRA, F. S.; ALMEIDA, R. N.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antinociceptive Activity of Structural Analogues of Rotundifolone: Structure-Activity Relationship. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 39–42, 2007a.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 170–175, 2007b.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, p. 264–268, 2007.

DE SOUSA, D. P.; OLIVEIRA, F. S.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of the central activity of hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 811–812, 2006.

DENAC, H.; MEVISSSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 453–479, 2000.

DERAEDT, R.; JOUGNEY, S.; BENZONI, J.; PETERFALVI, M. Inhibitions of prostaglandins biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 224, p. 30–42, 1976.

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

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **The Journal of Pain**, v. 7, p. S3-S12, 2006.

DIB-HAJJ, S. D.; CUMMINS, T. R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. From genes to pain: Nav 1.7 and human pain disorders. **Trends in neuroscience**, v. 30, p. 555–563, 2007.

DICKENSON, A. H. Plasticity: implications for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 20, p. 392–403, 1997.

DORRIES, K. M.; KAUER, J. S. Relationships between odor-elicited oscillations in the salamander olfactory epithelium and olfactory bulb. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, p. 754–765, 2000.

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

DWORKIN, R. H. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. **The Clinical Journal of Pain**, v. 18, p. 343–349, 2002.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDS, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; LEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193–236, 2002.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. P. C.; SANTOS, M. A. C.; SIQUEIRA, I. R.; AMADOR, T. A. Sedative properties of linalool. **Fitoterapia**, v. 66, p. 407–414, 1995.

FENG, R. T.; LU, Y. J.; BOWMAN, L. L.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; DING, M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 27888–27895, 2005.

FILHO, C. V.; YUNES, R. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99–105, 1998.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 157–164, 2001.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V. F.; RODRIGUES, H. M. S. L.; MOURÃO, R. H. V.; ANDRADE, M. R.; ANTONIOLLI, A. R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273–278, 2000.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. D.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145–148, 2002.

GARLE, M. J.; FENTEM, J. H.; FRY, J. R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in vitro**, v. 8, p. 1303–1312, 1994.

GOLDIN, A. L.; BARCHI, R. L.; CALDWELL, J. H.; HOFMANN, F.; HOWE, J. R.; HUNTER, J. C.; KALLEN, R. G.; MANDEL, G.; MEISLER, M. H.; BERWALD NETTER, Y.; NODA, M.; TAMKUN, M. M.; WAXMAN, S. G.; WOOD, J. N.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 28, p. 365–368, 2000.

GUVEN, M.; BOZDEMIR, H.; GUNAY, I.; SARICA, Y.; KAHRAMAN, I.; KOC, F.. The actions of lamotrigine and levetiracetam on the conduction properties of isolated rat sciatic nerve. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, p. 129–134, 2006.

HALL, A.C.; TURCOTTE, C. M.; BETTS, B. A.; YEUNG, W. Y.; AGYEMAN, A. S.; BURK, L. A. Modulation of human GABA_A and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, p. 9–16, 2004.

HARRIS, R. C.; BREYER, M. D. Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, p. 236–45, 2006.

HEAPY, C. G.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N. J. W. Afferent C-fibre and A-δ activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 164, 1987.

HELM, S.; TRESCOT, A. M.; COLSON, J.; SEHGAL, N.; SILVERMAN, S. Opioid Antagonists, Partial Agonists, and Agonists/Antagonists: The Role of Office-Based Detoxification. **Pain Physician**, v. 11, p. 225–235, 2008.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, M. G.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due active inhibition. **Pain**, v. 87, p. 57–63, 1999.

HEUBERGER, E.; HONGRATANAWORAKIT, T.; BOHM, C.; WEBER, R.; BUCHBAUER, G. Effects of chiral fragrances on human autonomic nervous system parameters and self-evaluation. **Chemical Senses**, v. 26, p. 281–92, 2001.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**, 3th edition. Sunderland, Massachusetts - USA: Sinauer, 2001, 814p.

HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, v. 22, p. 283-294, 1978.

HILLE, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. **The Journal of General Physiology**, v. 69, p. 497–515, 1977.

HONDEGHEM, L. M.; KATZUNG, B. G. Time and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. **Acta Biochimica et Biophysica**, v. 472, p.373–398, 1977.

HUANG, F. C; KUTCHAN, T. M. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 555–564, 2000.

HUANG, H. Y.; CHENG, J. K.; SHIH, Y. H.; CHEN, P. H.; WANG, C. L.; TSAUR, M. L. Expression of A-type K channel alpha subunits Kv 4.2 and Kv 4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p.1149-57, 2005.

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

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

IWAMOTO, E. T.; MARION, L. Characterization of the antinociception produced by intrathecally administered muscarinic agonists in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, p. 329–338, 1993.

JAMES, M. L.; SELLERI, S.; KASSIOU, M. Development of ligands for the peripheral benzodiazepine receptor. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1991–2001, 2006.
JANN, M. W. SLADE, J. H. Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. **Pharmacotherapy**, v. 27, p. 1571–1587, 2007.

JOHANNESSEN LANDMARK, C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. **CNS Drugs**, v. 22, p. 27–47, 2008.

JUDGE, S. I.; BEVER-JR, C. T.. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 224–259, 2006.

KAHAN, M.; SRIVASTAVA, A.; WILSON, L.; MAILIS-GAGNON, A.; MIDMER, D. Opioids for managing chronic non-malignant pain: safe and effective prescribing. **Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien**, v. 52, p. 1091–1096, 2006.

KARTTUNEN, P.; MÄNNISTÖ, P. T.; LAHOVAARA, S. HAVAS, A. Studies on the nonspecific central nervous system effects of the novel antitussive compound vadocaine hydrochloride. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, p. 605–608, 1988.

KHANNA, N.; BHATIA, J. Antinociceptive action of *Ocimum sanctum* (Tulsi) in mice: possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 293–296, 2003.

KHODOROV, B.; SHISHKOVA, L.; PEGANOV, E.; REVENKO, S. Inhibition of sodium currents in frog ranvier node treated with local anesthetics. Role of slow sodium inactivation. **Acta Biochimica et Biophysica**, v. 433, p. 409–435, 1976.

KIRNER, A.; DEUTSCH, S.; WEILER, E.; POLAK, E. H.; APFELBACH, R. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 201–206, 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412–414, 1959.

LI, W.; GAO, S. B.; LV, C. X.; WU, Y.; GUO, Z. H.; DING, J. P.; XU, T. Characterization of voltage-and Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 212, p. 348–57, 2007.

LIRA, S. R. S. **Efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher sobre o sistema nervoso central.** 2001. 70f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

LUI, G.; YAROV-YAROVY, V.; NOBBS, M.; CLARE, J. J.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Differential interactions of lamotrigine and related drugs with transmembrane segment IVS6 of voltage-gated sodium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 413–422, 2003.

MAIOR, F. N. S.; SIQUEIRA, J. S.; BARBOSA, M. D.; ALMEIDA, R. N. Desenvolvimento Pós-natal da Prole exposta ao Extrato Hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o Período Gestacional de Ratas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, p. 321–5, 2003.

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

MARTIN, T. J.; EISENACH, J. C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, p. 811–817, 2001.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 138–142.

MATTEI, R.; LEITE, J. R.; TUFIK, S. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandifolia* Martius ex Benthham. **São Paulo Medical Journal**, v. 113, p. 687–692, 1995.

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

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

MERT, T.; GUNES, Y.; GUVEN, M.; GUNAY, I.; OZCENGIZ, D. Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, p. 77–81, 2002.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome Biology**, v. 1, p. 0004.1–0004.5, 2000.

MILLER, R. D.; KATZUNG, B. G. Anestésicos locais. Em: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap. 31, p. 381–388.

MONTENEGRO, F. C. **Efeitos das cumarinas em nervo isolado de rato**. 40 f. 2003. Monografia de Ciências Biológicas – Universidade Federal da Paraíba – Campus I, João Pessoa, 2003.

MOORE, P. A.; BURNEY, R. G. Analgesic properties of lidocaine in mice. **Anesthesia and Analgesia**, v. 58, p. 85–87, 1979.

MORA, S.; DIAZ-VELIZ, G.; MILLAN, R.; LUNGENSTRASS, H.; QUIROS, S.; COTO-MORALES, T.; HELLION-IBARROLA, M. C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 82, p. 373–378, 2005.

MORAES, D. S. C.; CAMARGO, E. A. Antidepressivos e anticonvulsivos utilizados no tratamento da dor neuropática. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 77, p. 44–47, 1999.

MORAIS, L. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats na mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57–61, 1998.

MUNIR, M. A.; ENANY, N.; ZHANG, J. M. Nonopioid analgesics. **Anesthesiology Clinics**, v. 25, p. 761–774, vi, 2007.

NAGUIB, M.; YAKSH, T.L. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. **Anesthesia and Analgesia**, v. 85, p. 847–853, 1997.

NARAYANAN, N.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; VIJAYASEKARAN, V.; SUKUMAR, E. Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Premna herbacea* root. **Fitoterapia**, v. 71, p. 147–153, 2000.

OGATA, N.; OHISHI, Y. Molecular diversity of structure and function of voltage-gated Na⁺ channels. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, p. 365–377, 2002.

OLIVEIRA, F. S. **Estudo do efeito psicofarmacológico de hidroxidiidrocarvona em camundongos**. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OLKKOLA, K. T.; AHONEN, J. Midazolam and other benzodiazepines. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 182, p. 335–360, 2008.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 271–280, 2004.

OSSIPOV M. H.; PORRECA, F. Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. **NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, p. 650–661, 2005.

PAN, H. L.; WU, Z. Z.; ZHOU, H. Y.; CHEN, S. R.; ZHANG, H. M. LI, D. P. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, p. 141–161, 2008.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50–52, 2005.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. B. D.; CHORGHAD, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, p. 789–799, 2004.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D. L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (–)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal Pharmacology**, v. 460, p. 37–41, 2003.

PEANA, A. T.; MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; SPANO, M. T.; D'AQUILA, P. S.; PIPPIA, P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (–)-linalool. **European Journal Pharmacology**, v. 485, p. 165–174, 2004.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical review. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71–80, 2007.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237–243, 2001.

PINTO, M. S. C. T. A. A percepção da dor e receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 253–262, 2000.

POYRAZ, D.; BRAU, M. E.; WOTKA, F.; PUHLMANN, B.; SCHOLZ, A. M.; HEMPELMANN, G.; KOX, W. J.; C. D. SPIES. Lidocaine and Octanol Have Different Modes of Action at Tetrodotoxin-Resistant Na⁺ Channels of Peripheral Nerves, **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, p. 1317-1324, 2003.

RENTON, T. An update on pain. **British Dental Journal**, v. 22, p. 335–338, 2008.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118, 2000.

ROHL, C. A.; BOECKMAN, F. A.; BAKER, C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A.; KLEVIT, R. E. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. **Biochemistry**, v. 38, p. 855–861, 1999.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235–242, 1990.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91–95, 2003.

SAKATA, R.; GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 51, p. 3–11, 1994.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. **Planta Medica**, v. 61, p. 329–331, 1995.

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Science**, v. 77, p. 2953–2963, 2005.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240–244, 2000.

SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S.; NAIR, A. M.; MUNGANTIWAR, A. A.; DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. Wood oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 21–27, 1999.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S; SAMPAIO, A. L.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 16, p. 38–43, 2000.

SILVA, M. I.; DE AQUINO NETO, M. R.; TEIXEIRA NETO, P. F.; MOURA, B. A.; DO AMARAL, J. F.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 141–147, 2007.

SKLARS, P. B.; ANHOLTS, R. R. H.; SNYDERLF, S. H. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 15538–15543, 1986.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85–90, 2000.

STÄMPFLI, R. A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. **Experientia**, v. 10, p. 508–509, 1954.

STARMER, C. F.; GRANT, A. O.; STRAUSS, H. C. Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. **Biophysical Journal**, v. 46, p. 15–27, 1984.

STRICHARTZ, G. R. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. **The Journal of General Physiology**, v. 62, p. 37–57, 1973.

SUN, Y. M.; FAVRE, I.; SCHILD, L.; MOCZYDLOWSKI, E. On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel—Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca^{2+} and H^+ , and molecular sieving. **The Journal of General Physiology**, v. 110, p. 693–715, 1997.

TASAKI, I. **Nervous Transmission**. Charles C. Thomas, Springfield, p. 164, 1953.

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

TRONGSAKUL, S.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 221–225, 2003.

UMEZU, T.; ITO, H.; NAGANO, K.; YAMAKOSHI, M.; OOUCHI, H.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. **Life Science**, v. 72, p. 91–102, 2002.

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

WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S.; CUMMINS, T. R.; BLACK J. A. Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states. **Brain Research**, v. 886, p. 5–14, 2000.

WAY, W. L.; FIELDS, H. L.; SHUMACHER, M. A. Analgésicos & antagonistas opióides. Em: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap. 31, p. 446–462.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; LINDBLOM, U. The effect of systemic tocainide, lidocaine and bupivacaine on nociception in the rat. **Pain**, v. 23, p. 357–601, 1985.

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

YAMAZUMI, I.; OKUDA, T.; KOGA, Y. Involvement of potassium channels in spinal antinociceptions induced by fentanyl, clonidine and bethanechol in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 87, p. 268–276, 2001.

YOUNIS, Y. M. H.; BESHIR, S. M. Carvone-rich essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperi* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 539–541, 2004.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science's STKE**, v. 253, review 15, p. 1–17, 2004.

Anexos

ANEXOS

➤ TRABALHO COMPLETO EM PERIÓDICO INDEXADO

GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31(5), in press, accepted December 26, 2007; published online February 13, 2008.

➤ RESUMOS COMUNICADOS EM CONGRESSOS

Internacional

GONÇALVES, J. C. R.; BENEDITO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Evaluation of the activity of (-)-carvone on the isolated nerve of rats. **II Symposium of the International Institute of Neuroscience of Natal - IINN**. Natal / RN, 2007. Pain, Trauma and Disease, n° 54, p. 23, Natal – RN, 2007.

DONATO, M. F.; GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A. M. H.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Comparison Between Terpenes Effects on Nervous Excitability. **II Neuroscience Symposium of the International Institute for Neuroscience of Natal – IINN**. Molecules and Cells, n° 38, p. 21, Natal – RN, 2007.

Nacional

GONÇALVES, J. C. R.; DONATO, M. F.; ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. The effect of (-)-carvone on excitability of isolated nerve. **Anais da XXII Reunião Anual das Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE**. Produtos Naturais, n° 44.019, Águas de Lindóia – SP, 2007.

GONÇALVES, J. C. R.; BENEDITO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Efeito antinociceptivo da (-)-carvona em camundongos: evidências do não envolvimento do sistema opióide. **Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE**. n° 09.132, p. 600, Ribeirão Preto – SP, 2007.

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](#)