



Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão

Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review

Recebido em 31/08/2012

Aceito em 04/02/2013

Juliane Cabral Silva¹, Sarah Raquel Gomes de Lima Saraiva², Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior¹ & Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^{1,*}

¹ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, 50.740-521, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

O interesse em investigar plantas com atividade analgésica reside no fato de que as mesmas têm uma vasta aplicação em vários processos patológicos. Devido à baixa eficácia e expressivos efeitos adversos apresentados pela maioria dos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico para este fim, surge o grande interesse dos pesquisadores na descoberta de novos protótipos de fármacos provenientes de plantas da flora brasileira. Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade analgésica. Várias das técnicas descritas, utilizadas para um *screening* da atividade antinociceptiva são gerais e independem do composto a ser ensaiado. O objetivo desta revisão é apresentar os fundamentos dos principais métodos de avaliação da atividade antinociceptiva de uma substância ou extrato vegetal. A pesquisa foi realizada nas bases de dados PubMed, Scopus, Web of Science e Science Direct, usando diferentes combinações das seguintes palavras chave: experimental models, pain, medicinal plants, natural products e antinociceptive activity. Para detalhes dos modelos experimentais mais utilizados, as referências originais foram consultadas. Apesar de, na maioria das vezes, não se chegar ao mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta em estudo, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir com o curso da dor.

Palavras-chave: plantas medicinais, dor, nocicepção, modelos experimentais, revisão

ABSTRACT

The interest in investigating plants with analgesic activity resides in the fact that they have a wide application in various pathological processes. Because of low efficacy and significant side effects produced by the majority of drugs available on the pharmaceutical market for this purpose, there is the great interest of researchers in discovering new prototype drugs from plants of the Brazilian flora. Several *in vivo* models are used in the search for compounds with analgesic activity. Several of the techniques described, used for a screening of antinociceptive activity are general and independent of the compound being tested. The aim of this review is to present the fundamentals of the main methods for assessing the antinociceptive activity of a substance or plant extracts. This literature search was performed through specialized search databases PubMed, Scopus, Web of Science and Science Direct using different combinations of the following keywords: experimental models, pain, medicinal plants, natural products and antinociceptive activity. Although in most cases not reach the definitive mechanism of action of the substance or plant extract under study, these experimental models is of great importance and represents the starting point for the pharmacological characterization of new compounds capable of interfering with the course of pain.

Keywords: medicinal plants, pain, nociception, experimental models, review

* Contato: Prof. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brasil. Fone/Fax: +55 (87) 2101-6862; e-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br

INTRODUÇÃO

A dor crônica é um sério problema de saúde pública, não somente em termos do sofrimento humano, mas também por causa de seu grande impacto socioeconômico. A prevalência da dor crônica pode variar de 12 a 55% da população. Essas variações são atribuídas a diferentes definições de dor crônica, o tipo de população estudada e a metodologia usada na pesquisa (Vieira *et al.*, 2012).

Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico e/ou antiinflamatório ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Embora sejam altamente eficazes, os analgésicos de ação central geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes. Adicionalmente, os analgésicos de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (Rang *et al.*, 2012). Assim, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica.

Há um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, sendo detentor de grande diversidade biológica, com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal (Dutra, 2009). Esse cenário favorece a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos no país. Um grande avanço nesse sentido é a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Essa política traz em suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que incentiva as pesquisas e dá diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (Brasil, 2006).

Considerando a ascensão da fitoterapia no Brasil nas últimas décadas e a necessidade da busca de moléculas com atividade analgésica que garantam uma terapia eficaz e segura para o tratamento da dor, o objetivo deste trabalho foi demonstrar, através de uma revisão bibliográfica, os mecanismos envolvidos com o processo da dor, bem como os ensaios experimentais comumente empregados para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais.

Mecanismos Fisiopatológicos da Dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), o termo dor conceitua-se como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionado à lesão tecidual real ou potencial, ou descritas em termos desse tipo de dano. Assim, a dor caracteriza-se como uma experiência complexa que envolve além de transdução de estímulos nocivos ambientais, o processamento emocional pelo cérebro (Julius & Basbaum, 2001). É uma consequência fisiopatológica de

diversas morbidades e de suas repercussões, mas que na maioria das vezes configura-se como uma função protetora, representando, em muitos casos, o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças (Oliveira *et al.*, 2009).

Diferente de nociceção, a dor é mais que uma sensação, é uma experiência, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. Enquanto isso, o termo nociceção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo. Sendo assim, uma vez que os animais não são capazes de expressar verbalmente os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, e sim nociceção. Logo, termos como dor e analgesia são empregados para estudos em humanos, enquanto que nociceção e antinociceção são mais utilizados para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório (Kandel *et al.*, 2003).

A dor pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão e com os mediadores envolvidos, recebendo as seguintes denominações: neurogênica, quando ocorre lesão do tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; psicogênica, que ocorre por fatores psicológicos; ou nociceptiva, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores. Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. A dor aguda corresponde à ativação local de nociceptores induzida por um dano tecidual, sendo que a dor desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Já a dor crônica provocada por uma lesão tecidual ou doença, geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento (Millan, 2002).

Os nociceptores são terminações nervosas livres, não especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando, desse modo, lesão nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (Millan, 2002). Assim, o potencial antinociceptivo de um produto natural, por exemplo, pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso promovido.

Na percepção da dor, os neurônios aferentes primários que participam da transmissão da sensação dolorosa envolvem fibras intensamente mielinizadas, de maior diâmetro (10 μm) e que apresentam maior velocidade de condução (30-100 m/s), caracterizadas como fibras A β . Entretanto, a maioria dos nociceptores está incluída nas fibras de pequeno (0,4-1,2 μm) e médio diâmetro (2-6 μm), que constituem respectivamente as fibras C, não mielinizadas, e as fibras A δ , pouco mielinizadas (Julius & Basbaum, 2001).

O principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores é o glutamato, embora as fibras sejam também sensibilizadas por outras substâncias químicas endógenas liberadas no ambiente tecidual em condições anormais. Dentre elas destacam-se a acetilcolina,

bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, neuropeptídeo Y, purinas, íons K⁺, prostaglandinas, tromboxano, citocinas (interleucinas e TNF- α) e prótons (H⁺). Neste sentido, grande parte da ativação das fibras nociceptivas se dá por receptores específicos acoplados à cascata de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos (Luiz, 2007).

Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo da dor, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais que diferenciem uma possível atividade antinociceptiva de um produto natural por mecanismos centrais, envolvendo mediadores imediatos; ou por mecanismos periféricos, envolvendo mediadores produzidos mais tardiamente, principalmente aqueles que são liberados durante o processo inflamatório.

METODOLOGIA

A pesquisa bibliográfica foi realizada em agosto de 2012 através de consultas a artigos científicos publicados em periódicos especializados na área de produtos naturais. Esta pesquisa na literatura foi realizada nas bases de dados PubMed, Scopus, Web of Science e Science Direct, usando diferentes combinações das seguintes palavras chave: experimental models, pain, medicinal plants, natural products e antinociceptive activity. Para a elaboração deste artigo, as referências encontradas na pesquisa foram estudadas em detalhe.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção nós apresentamos algumas considerações sobre os principais métodos utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais, seus fundamentos, vantagens e desvantagens de cada método. Para detalhes dos modelos experimentais mais utilizados, as referências originais devem ser consultadas. Abaixo, são apresentados os principais modelos experimentais estudados: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, teste de Randall-Selitto, teste de Von Frey, dor orofacial induzida pela formalina, teste da placa quente e teste de retirada da cauda.

Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais é um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,9% (Whittle, 1964).

Este teste é sensível à avaliação de drogas analgésicas, no entanto, pode ser visto como um modelo geral, não seletivo, para estudos de drogas antinociceptivas (Couto *et al.*, 2011), uma vez que a irritação local, produzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como as citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (Pinheiro *et al.*, 2011). Alguns investigadores têm associado este método com a liberação de prostanoídes, em geral, níveis elevados de PGE₂ e PGF_{2 α} , bem como produtos da lipoxigenase em fluidos peritoneais (Verma *et al.*, 2005).

Teste da formalina

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos (Hunskar & Hole, 1987; Randolph, 1997). Este modelo de dor está associada à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (Dubuisson & Dennis, 1977; Martins *et al.*, 2006).

A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (Randolph, 1997).

As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), e por um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora. O período entre as fases é denominado intervalo de quiescência (Dubuisson & Dennis, 1977, Martins *et al.*, 2006).

A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros. O intervalo de quiescência entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais e espinhais (Hunskar & Hole, 1987).

Teste de Randall-Selitto

O modelo experimental desenvolvido por Randall & Selitto (1957) é um método para avaliação da hipernocicepção bastante utilizado, que se fundamenta na indução de hiperalgisia através de pressão crescente na pata do animal. Este teste é baseado no princípio de que a inflamação diminui o limiar de reação à dor e que essa redução pode ser modificada por analgésicos narcóticos e não-narcóticos.

Neste ensaio experimental, um agente flogístico é injetado no tecido subplantar de uma das patas traseiras, e é medido o tempo de latência da retirada da pata a partir da pressão exercida. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A força necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas. O LNRP é avaliado antes e após a administração dos estímulos hiperalgésicos ou inflamatórios, que variam de acordo com o experimento (Randall & Selitto, 1957).

Teste de von Frey

O uso de filamentos de *von Frey* é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico,

sendo bastante utilizado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. Além disso, essa técnica foi transformada em um método eletrônico, usado primeiramente em humanos (Jensen *et al.*, 1986), e posteriormente em ratos e camundongos (Cunha *et al.*, 2004).

Os experimentos são realizados com um anestesímetro eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno. Os animais são colocados em caixas de acrílico durante 15-30 minutos para adaptação. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. As alterações nos limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (*flinches*) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de *flinch* após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos, que variam de acordo com o experimento (Jensen *et al.*, 1986).

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção. Particularmente, o teste de von Frey, é usado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (Le Bars *et al.*, 2001).

Dor orofacial induzida por formalina

A região orofacial é uma área densamente ocupada pelo nervo trigêmeo e, muitas vezes, é sítio frequente de dores referida e crônica. Alterações clínicas no território trigeminal, como aumento de sensibilidade cutânea e hiperalgesia, observadas em cefaleias primárias e dores orofaciais em geral, são muito sugestivas de anormalidades no sistema nociceptivo trigeminal. (Perla, 2007).

Entre os modelos nociceptivos experimentais de dores orofaciais e cefálicas, o teste da formalina é um dos mais relevantes em termos de aplicabilidade experimental e clínica, quando se estuda dores agudas (Perla, 2007). Ele avalia a nocicepção trigeminal por meio da aplicação de estímulo químico (administração subcutânea de uma solução de formalina) na região orofacial. Este modelo constitui uma adaptação do teste da formalina administrada na superfície plantar de animais (Dubuisson & Dennis, 1977; Raboisson & Dallel, 2004). Contudo, vale ressaltar que para uma avaliação mais detalhada dos receptores envolvidos no mecanismo de ação do produto

natural a ser testado, este ensaio experimental pode ser realizado com a aplicação de outros agentes químicos, como por exemplo, glutamato e capsaicina (Silva, 2011).

As principais respostas comportamentais que caracterizam a dor e que são observadas nesse modelo experimental são: medida do tempo ou do número de reflexos de autolimpeza (*grooming*) dirigidos ao local da injeção de formalina; vocalização espontânea; tremores vigorosos do corpo (*shaking*) associados ao ato de lambe as patas dianteiras e proteger vigorosamente a face; e trismo (Perla, 2007).

Assim como no teste da aplicação de formalina subplantar, os parâmetros indicativos de dor para este modelo também podem ser observados imediatamente após a aplicação do agente químico e, posteriormente, após o período de quiescência. Segundo Dubuisson & Dennis (1977), a dor, no modelo nociceptivo trigeminal, é inicialmente resultante da reação inflamatória gerada pela ligação da formalina às proteínas teciduais, por meio da formação de pontes primárias de carbono (propriedade fixadora do tecido). Tal reação inflamatória na área de injeção persiste por período relativamente longo. A resposta inicial (primeira fase) possivelmente decorre da estimulação direta dos nociceptores, enquanto que a segunda fase do teste deve-se à inflamação e sensibilização central.

Teste da placa quente

O teste da placa quente (*hot plate*) avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambe as patas (Tita *et al.*, 2011). As aferições são realizadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias a serem analisadas.

O modelo experimental foi inicialmente descrito por Woolfe & Macdonald (1944) como modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central. Embora o uso de analgésico central e periférico responda pela inibição do número de contrações provocadas por estímulos químicos que levam à dor, apenas os analgésicos centrais aumentam o tempo de resposta no teste da placa quente. Este modelo utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo. Dessa forma, os nociceptores (fibras C e A δ , principalmente) são estimulados após a ativação dos receptores vaniloides, especificamente os receptores do tipo VR-1, que possuem limiar de ativação em 43 °C, e os receptores do tipo VRL-1, que possuem limiar de ativação em 52 °C. Estes últimos são importantes na avaliação da resposta a estímulos térmicos nocivos, pois são responsáveis pela resposta em decorrência do aumento da temperatura (Julius & Basbaum, 2001; Benedito, 2009).

Teste de retirada da cauda

O teste de retirada da cauda (*tail-flick*) é sensível para identificar a atividade de compostos presentes em extratos vegetais ou isolados a partir desses, além de sintéticos, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opióides (Oliveira *et al.*, 2008).

Este ensaio experimental consiste na aplicação de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo térmico, provocando seu movimento de

retirada (Oliveira *et al.*, 2009). Um aumento no tempo de reação é geralmente considerado como um parâmetro importante para avaliar a atividade antinociceptiva central, caracterizando-se por uma nocicepção aguda não-inflamatória. Sendo assim, substâncias que atuam em nível central, como a morfina, são capazes de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda, aumentando o tempo de latência (Fischer *et al.*, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de modelos experimentais como os que foram demonstrados neste trabalho é de fundamental importância para a descoberta de novos fármacos, particularmente de analgésicos, visto que estes só podem ser comercializados após a realização de ensaios farmacológicos pré-clínicos que atestem sua eficácia e segurança. Esses testes representam o início para a caracterização de novas drogas, capazes de interagir com os mediadores da dor e/ou inflamação, fornecendo assim um ponto de partida para a elucidação das vias de efeito antinociceptivo envolvidas, atendendo às necessidades da terapia farmacológica para este tipo de agravo à saúde.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado concedidas.

REFERÊNCIAS

Benedito RB. *Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-Álcool perílico em camundongos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2006. 60 p.

Couto VM, Vilela FC, Dias DF, Santos MH, Soncini R, Nascimento CG, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 134(2): 348 – 353, 2011.

Cunha TM, Verri WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37(3): 401 – 407, 2004.

Dubuisson D & Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4(2): 161 – 174, 1977.

Dutra MG. *Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás*. 2009. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica. Anápolis.

Fischer LG, Santos D, Serafin C, Malheiros A, Delle-Monache F, Delle-Monache G, Cechinel-Filho V, Sousa MM. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biol Pharm Bull* 31(2): 235 – 239, 2008.

Hunnskaar S. & Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30(1): 103 – 114, 1987.

Jensen K, Andersen HO, Olesen J, Lindblom U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain* 25(3): 313 – 323, 1986.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852): 203 – 210, 2001.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Princípios de Neurociência*. São Paulo: Manole, 2003.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53(4): 597 – 652, 2001.

Luiz AP. *Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do extrato etanólico obtido das raízes da Humirianthera ampla Miers*. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis.

Martins MA, de Castro Bastos L, Tonussi CR. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain*. 7(2): 100 – 107, 2006.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6): 355 – 474, 2002.

Oliveira FS, Sousa DP, Almeida RN. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biol Pharm Bull* 31(4): 588 – 591, 2008.

Oliveira RRB, Góis RMO, Siqueira JS, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Oliveira VR, Siqueira JS, Quintans-Junior LJ. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. *Braz J Pharmacogn* 19(3): 672 – 676, 2009.

Perla AS. *Estudo do comportamento nociceptivo, por meio dos reflexos de auto-limpeza e retirada de cauda, em modelo de ativação periférica e sistêmica de vias trigeminais*. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre.

Pinheiro B, Silva A, Souza G, Figueiredo J, Cunha F, Lahlou S, da Silva JK, Maia JG, Sousa PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol* 188: 479–486, 2011.

Raboisson P & Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* 28(2): 219 – 226, 2004.

Randall LO & Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111(4): 409 – 419, 1957.

Randolph BC & Peters MA. Analgesic effectiveness of

ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth Prog.* 44(1): 11 – 16, 1997.

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

Silva AM. *Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial de Sida cordifolia (Malvaceae) em roedores.* 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Sergipe, (UFS). São Cristóvão.

Tita B, Abdel-Haq H, Vitalone A, Mazzanti G, Saso L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmaco* 56(5-7): 341-343, 2011.

Verma PR, Joharapurkar AA, Chatpalliwar VA, Asnani A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *J Ethnopharmacol* 102: 298–301, 2005.

Vieira EBM, Garcia JBS, Silva AAM, Araújo RLTM, Jansen RCS. Prevalence, Characteristics, and Factors Associated With Chronic Pain With and Without Neuropathic Characteristics in São Luís, Brazil. *J Pain Sym Man* 44 (2): 239-251, 2012.

Whittle BA. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *J Neuropharmacol* 3: 369 – 378, 1964.

Woolfe G & Macdonald AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80(3): 300 - 307, 1944.