

**Avaliação pré-clínica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium retusum*:
ênfase ao efeito antinociceptivo**

**Pre-clinical evaluation of *Chenopodium retusum* hydroalcoholic extract:
emphasis on antinociceptive effect**

DOI:10.34119/bjhrv6n6-239

Recebimento dos originais: 20/10/2023

Aceitação para publicação: 24/11/2023

Charles Albani Dadam Junior

Graduando em Medicina

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: dadamfilho@gmail.com

Vitor Pavesi

Graduado em Medicina

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: vitor_pavesi@hotmail.com

Cleana Caramori de Bortoli

Graduada em Medicina pela Universidade do Vale do Itajaí

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: cleanadebortoli@gmail.com

Geisla Medeiros

Graduada em Medicina

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: geislamedeiros1@gmail.com

Ingrid Farias

Doutora em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: iridvf@gmail.com

Christiane Meyre da Silva Bittencourt

Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: c.meyre@ufsc.br

Márcia Maria de Souza

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí - SC, Brasil, CEP: 88302-202

E-mail: msouza@univali.br

RESUMO

A planta *Chenopodium retusum* é uma importante espécie do gênero *Chenopodium*, o qual contém espécies com propriedade analgésica, usada popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais e manejo da dor. Este estudo objetivou avaliar o efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium retusum* (EHCR) em testes farmacológicos de dor aguda *in vivo* e testes comportamentais (Campo aberto/TCA). Camundongos *Swiss* fêmeas (25-30g/n=8) foram submetidos a testes farmacológicos de dor aguda induzida quimicamente por: formalina (2,5%), ácido acético (0,6%), capsaicina (1,6 µg/pata), glutamato (30 nmol/pata) e termicamente (placa quente). EHCR (50, 150 e 300 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal ou oral respectivamente 30 e 60 minutos antes dos testes. Controles positivos Indometacina (10 mg/kg) e/ou Morfina (5 mg/kg) e, negativo (veículo de solubilização do EHCR) foram utilizados nos experimentos. EHCR reduziu ambas as fases (neurogênica e inflamatória) da nocicepção induzida pela formalina, e apresentou efeito antiedematogênico. Foi também observada redução da nocicepção induzida pela capsaicina, glutamato e ácido acético. No teste da placa quente houve aumento do limiar nociceptivo. Os resultados em conjunto confirmam o efeito antinociceptivo do EHCR, validando em parte o uso de *Chenopodium retusum* no manejo da dor. Estudos futuros poderão determinar os fitoconstituintes envolvidos e os mecanismos farmacodinâmicos responsáveis por essa ação.

Palavras-chave: dor, nocicepção, *chenopodium retusum*.

ABSTRACT

The plant *Chenopodium retusum* is an important species of the genus *Chenopodium*, which contains species with analgesic properties, popularly used in the treatment of gastrointestinal disorders and pain management. This study aimed to evaluate the antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Chenopodium retusum* (EHCR) in pharmacological tests of acute pain *in vivo* and behavioral tests (Open field/ACT). Female Swiss mice (25-30g/n=8) were submitted to pharmacological tests of chemically induced acute pain by: formalin (2.5%), acetic acid (0.6%), capsaicin (1.6 µg/paw), glutamate (30 nmol/paw) and thermally (hot plate). EHCR (50, 150 and 300 mg/kg) was administered intraperitoneally or orally respectively 30 and 60 minutes before the tests. Positive controls Indomethacin (10 mg/kg) and/or Morphine (5 mg/kg) and negative (EHCR solubilization vehicle) were used in the experiments. EHCR reduced both phases (neurogenic and inflammatory) of nociception induced by formalin and showed an antiedematogenic effect. A reduction in nociception induced by capsaicin, glutamate and acetic acid was also observed. In the hot plate test, there was an increase in the nociceptive threshold. The results together confirm the antinociceptive effect of EHCR, validating in part the use of *Chenopodium retusum* in pain management. Future studies may determine the phytoconstituents involved and the pharmacodynamic mechanisms responsible for this action.

Keywords: pain, nociception, *chenopodium retusum*.

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma queixa muito frequente nos atendimentos médicos, gerando um desafio diagnóstico e terapêutico para o profissional da saúde. A percepção da dor não é meramente o resultado de uma estimulação sensorial anormal que causa uma sensação desagradável, mas sim uma combinação do reconhecimento do desconforto somático associado à uma resposta emocional a esse desconforto. A percepção da dor e a extensão do sofrimento e da incapacidade podem variar dependendo da experiência anterior, da formação cultural, de fatores situacionais e de doenças psiquiátricas comórbidas (Wang, Mullally 2020). Portanto, a dor é um fenômeno complexo resultante da modulação de diversos mecanismos centrais e periféricos. (Gripp *et al.*, 2020). A dor também é sintoma de vários processos patológicos (Walton & Marsh, 2018), e pode tornar-se uma patologia em si mesma, como ocorre nos processos neuropáticos como a neuralgia do trigêmeo, neuralgia pós-herpética, fibromialgia, dentre outros (Kumar *et al.*, 2013; Alles & Smith, 2018; Martínéz *et al.*, 2018).

O tratamento da dor é bastante diversificado, mas os analgésicos disponíveis atualmente na clínica, além de possuírem efeitos adversos consideráveis, levando muitas vezes a não adesão do paciente, também apresentam restrições quanto ao uso em alguns tipos de dor. Esse fato estimula a pesquisa científica de alvos farmacológicos mais seletivos e com menos efeitos colaterais (Kamen, Feeko, 2014). Nesse contexto, as plantas medicinais podem ser uma opção para o manejo da dor.

Desde a antiguidade, o ser humano utiliza as plantas como recurso para a cura de suas enfermidades (Smejkal, 2014). Plantas medicinais foram amplamente usadas ao longo do tempo no tratamento de diversas doenças e seus compostos serviram de base para criação de componentes sintéticos para as drogas modernas (Abubakar *et al.*, 2019). Assim, as plantas representam um fator importante para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no tratamento de doenças que apresentam a dor como um dos principais agravantes (Butler, 2013). De fato, fármacos importantes no manejo da dor e de outras patologias, como o ácido acetil salicílico e a morfina, que foram isolados respectivamente de *Salix alba* e *Papaver soniferum*, ilustram essa realidade (Calixto *et al.*, 2000; Desborough, Keeling, 2017). Várias plantas medicinais com atividade analgésica foram documentadas, mas informações limitadas estão disponíveis a respeito de seus mecanismos de atividade antinociceptiva. (Bellik *et al.*, 2013). Considerando seu uso global, valor terapêutico e industrial, muitos produtos naturais são investigados para conduzir a produção de novos fármacos, portanto, famílias e gêneros de plantas com grande potencial são pesquisados para este fim. (Sem, Samanta, 2015; Sharifi-Rad

et al., 2018). O alto custo e efeitos adversos de medicações tradicionais estimulam a busca por alternativas. (Servin *et al.*, 2020).

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, apresenta um número de espécies catalogadas superior a 350 mil, representando apenas uma fração da biodiversidade da flora brasileira (Peres, Vercillo, Dias, 2011), fato esse que favorece o potencial para o desenvolvimento de fármacos provenientes de espécies vegetais. Dentro desse imenso mundo vegetal brasileiro, encontramos as plantas do gênero *Chenopodium*, que é o mais numeroso da família *Chenopodiaceae* (Lindl), com cerca de 250 espécies distribuídas preferencialmente nas regiões temperadas (Khetu *et al.*, 2022). Pertencente ao gênero *Chenopodium*, a espécie *C. retusum*, (Figura 01) popularmente chamada de “pega pinto” (Melo Júnior, Boerger, 2015), é uma erva perene da vegetação costeira arenosa do sul do Brasil, Uruguai e Argentina (Filho, De Oliveira, Mariath, 1992). Seu congênera *C. ambrosioides* tem validadas várias de suas propriedades farmacológicas, dentre as quais se destaca a propriedade antinociceptiva (Grassi *et al.*, 2013). Como fitoquimicamente ambas as espécies são bastante semelhantes, e a *C. retusum* é abundante na região do Vale do Itajaí e usada na medicina popular (Bonzani *et al.*, 2002), neste trabalho nos propusemos a investigar o efeito antinociceptivo de *C. retusum*, validando farmacologicamente seu uso popular no manejo da dor.

Figura 1 - *C. retusum* (partes aéreas)



Fonte- autores

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS

O material vegetal foi coletado no município de Itajaí-SC em 2015. Após a coleta, o extrato foi preparado de acordo com técnicas fitoquímicas desenvolvidas no laboratório de fitoquímica da UNIVALI. O material foi lavado com água destilada, seco, e os extratos foram preparados. Para extratos hidroalcoólicos uma solução de etanol a 50% foi adicionada numa razão de 1:10 material/solvente. Subsequentemente, a mistura preparada foi homogeneizada com um homogeneizador de lâminas durante 10 minutos à temperatura ambiente e submetida ao processo de extração por meio de agitação contínua por 24 horas. O processo de extração foi realizado duas vezes. Após a conclusão da extração, a mistura foi filtrada através de papel e a solução filtrada foi centrifugada a 3.500 rpm durante 20 minutos. Esta solução foi evaporada a uma temperatura abaixo de 45°C e com baixa pressão, a fim de remover o etanol. Uma parte do extrato foi utilizada para verificar os critérios de qualidade, de acordo com normas nacionais e internacionais e procedimentos estabelecidos, enquanto o restante foi armazenado para o desenvolvimento de diversos estudos. Os extratos prontos foram utilizados nos ensaios farmacológicos descritos a seguir.

2.2 ANIMAIS - PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Para os experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25 a 30g) com 3 meses de idade. Foram obtidos do Biotério Central da UNIVALI, mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, aclimatados à temperatura de 22 ± 2 °C e tratados com água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Nos ensaios farmacológicos o N por grupo foi de 8 animais. Os protocolos experimentais sobre o uso dos animais do laboratório foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais CEUA UNIVALI sob o parecer CEUA 013/17.

2.3 DROGAS E TRATAMENTOS

Antes de cada um dos testes, os animais foram divididos em 5 grupos, cada um com n=8. Os tratamentos foram realizados via intraperitoneal. O primeiro grupo, controle negativo, foi tratado com veículo (água destilada com sulfóxido de dimetil – DMSO – 0,7%) no qual o EHCR foi dissolvido. O segundo grupo foi tratado com EHCR na dose de 50 mg/kg; o terceiro grupo recebeu EHCR na dose de 150 mg/kg; e o quarto grupo foi tratado com EHCR na dose de 300 mg/kg. O quinto grupo, controle positivo, recebeu como tratamento Morfina 5 mg/kg ou Indometacina 10 mg/kg, de acordo com o teste realizado.

2.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

2.4.1 Efeito do EHCR sobre a Performance Motora - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é realizado a fim de avaliar o comportamento motor e atividade exploratória dos animais (Tolardo *et al.*, 2010). Foi utilizado aparato de madeira aberto (caixa), com uma das paredes de vidro para permitir a visualização dos animais. O assoalho do aparato é subdividido em 9 quadrantes. Os animais foram tratados com o extrato EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.) e controle negativo e foram colocados individualmente no aparato. Decorridos 30 minutos dos tratamentos, foi observado o número de cruzamentos (indicador de atividade exploratória) durante 6 minutos. (Pentkowski *et al.*, 2021)

2.4.2 Efeito do EHCR sobre a Nocicepção Induzida por Formalina

Para avaliar a nocicepção induzida por formalina os animais foram previamente tratados com EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.), e controles (positivo – Indometacina 10 mg/kg, e negativo – veículo) e 30 minutos após, receberam 20µl de formalina a 2,5% na região subplantar da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram imediatamente colocados sob funis de vidro para observação, e foi cronometrado o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante os 5 primeiros minutos (dor neurogênica) e os 15 últimos minutos dos 30 minutos totais do teste (dor inflamatória). Após a realização do teste os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e as patas foram retiradas e pesadas para análise de efeito antiedematogênico do EHCR (Komatsu *et al.*, 2019).

2.4.3 Efeito do EHCR sobre a Nocicepção Induzida por Capsaicina

Decorridos 30 minutos após o tratamento dos animais com o EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.), e controles (positivo – Morfina 5 mg/kg, e negativo – veículo), cada animal recebeu 20 µL de solução de capsaicina (1,6 mg/pata), injetada na região intraplantar da pata posterior direita; imediatamente os animais foram colocados sob funis de vidro e observados individualmente. Foi cronometrado durante 5 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina (Klein-Junior *et al* 2017).

2.4.4 Efeito do EHCR sobre a Nocicepção Induzida por Ácido Acético

O procedimento foi realizado conforme descrito por Collier *et al.*, (1968) com algumas modificações (Filho *et al.*, 2008). Os animais foram tratados via i.p. com EHCR (50, 150 e 300 mg/kg), e controles (positivo – Indometacina 10 mg/kg, e negativo – veículo). Decorridos 30 minutos dos tratamentos, os mesmos receberam injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%)

a 0,10 mL/kg. Os animais foram colocados sob funis de vidro e observados durante 30 minutos, e durante esse tempo foi registrado cumulativamente o número de contorções abdominais (caracterizadas por contrações do abdômen, alongamento do corpo, torção do tronco e/ou pelve, terminando com a extensão dos membros). A diminuição do número de contorções abdominais indica atividade antinociceptiva. Para verificar o efeito do EHCR por via oral, o mesmo foi administrado nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg 60 minutos antes do experimento, assim como o controle positivo que nesse caso foi Indometacina 10 mg/kg. (Castellain *et al.*, 2014)

2.4.5 Efeito do EHCR sobre a Nocicepção Induzida por Glutamato

Os experimentos foram conduzidos conforme descrito por Beirith, e colaboradores (2002), com pequenas modificações. Decorridos 30 minutos dos tratamentos com o EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.), e controles (positivo – Morfina 5 mg/kg, e negativo – veículo), cada animal recebeu 20 µL de solução de glutamato (30 mmol/pata), injetada na região intraplantar da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do glutamato, os animais foram colocados sob funis de vidro e individualmente observados durante 20 minutos. Durante esse tempo foi cronometrado o tempo que cada animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada (De Souza *et al.*, 2006, Filho *et al.*, 2008, Macedo *et al.*, 2021)

2.4.6 Efeito do EHCR sobre a Nocicepção Induzida pelo calor: Teste da Placa Quente

Após seleção prévia de animais com limiar nociceptivo baixo através da exposição em placa quente (aquecida $56 \pm ^\circ\text{C}$) sem qualquer tratamento, os animais foram divididos por grupos e tratados com o EHCR (50, 150 e 300 mg/kg), e controles (positivo – Morfina 5 mg/kg, e negativo – veículo). Decorridos 30 minutos dos tratamentos, os animais foram transferidos para placa quente individualmente e foi cronometrado o tempo que cada um levou para lambem, levantar ou morder as patas dianteiras ou traseiras. Esse comportamento foi considerado como indicativo de dor (De Souza *et al.*, 2006). Um cuidado foi tomado para que os animais não permanecessem mais do que 30 s sobre a placa quente aquecida com o objetivo de evitar danos teciduais. (Gonçalves *et al.* 2012; Zakaria *et al.* 2016; Inaltekin *et al.*, 2021)

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na representação gráfica dos resultados, cada barra dos gráficos representa a média dos experimentos (n=8) seguido do respectivo EPM (erro padrão da média). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram analisados através do software GraphPad

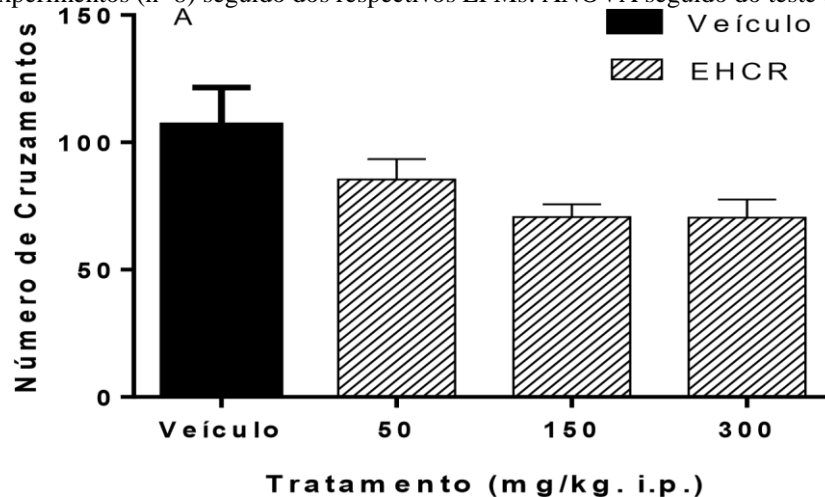
Prism®. Os asteriscos denotam significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DO EHCR SOBRE A PERFORMANCE MOTORA E EXPLORATÓRIA - TESTE DO CAMPO ABERTO

Os efeitos do EHCR sobre os parâmetros comportamentais do teste do campo aberto são observados na figura 2. Os resultados demonstram que o tratamento com o EHCR não alterou o número de cruzamentos dos animais avaliados no teste do campo aberto e comparados ao controle negativo (veículo) (Figura 2A).

Figura 2. Efeito do tratamento com EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos de camundongos, avaliados através do teste de campo aberto. A (número de cruzamentos). Cada barra representa a média dos experimentos (n=8) seguido dos respectivos EPMS. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor.

3.2 EFEITO DO EHCR SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

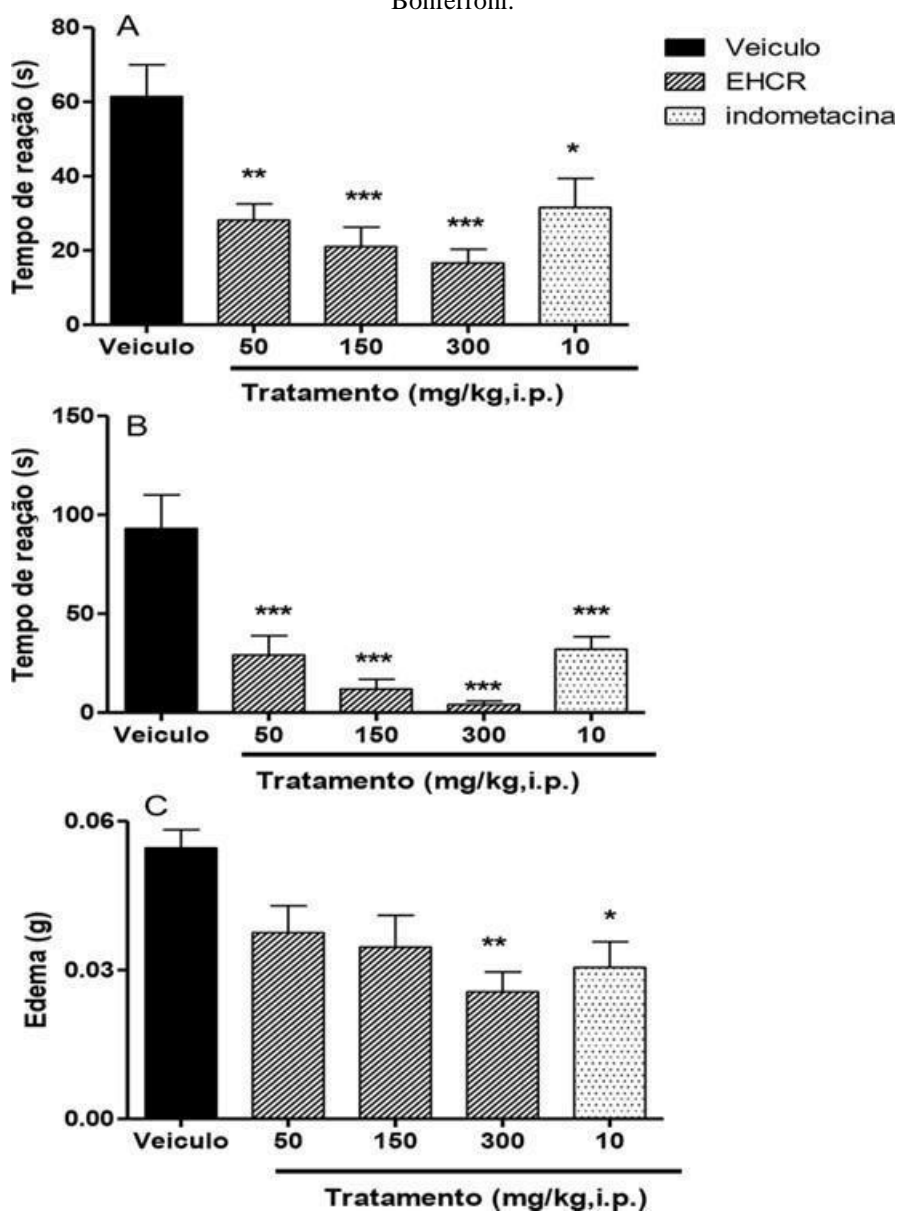
O efeito antinociceptivo do EHCR também foi avaliado no teste da formalina e os resultados estão expressos na figura 3. Na primeira fase da nocicepção induzida pela formalina (fase I) (Figura 3 A) se observa diminuição significativa ($p < 0,05$; $p < 0,001$) do tempo de lambidas da pata injetada com formalina nos grupos de animais tratados com EHCR em doses de 50 mg/kg, e 150 e 300 mg/kg e da Indometacina (10 mg/kg), quando comparado com o grupo controle. As inibições máximas (IMs) calculadas foram, respectivamente, de 54%, 65%, 73% e 49%. Na segunda fase do processo doloroso induzido pela formalina, representada na (Figura 2B), os resultados demonstram que o EHCR promoveu uma redução da dor inflamatória de forma dose-dependente. Em todas as doses utilizadas houve diminuição significativa da nocicepção quando comparada com o controle. Também foi observado efeito antinociceptivo

da Indometacina ($p < 0,001$). (Figura 3C). As IMs calculadas para o EHCR (50, 150 e 300 mg/kg) foram, respectivamente, de 68%, 87% e 95%, e para a Indometacina, 65%. Os resultados demonstram ainda que o efeito do EHCR na dor inflamatória na dose de 300 mg/kg se mostrou superior ao controle positivo Indometacina. Os resultados também demonstraram que houve redução significativa ($p < 0,01$) do edema nos animais tratados com EHCR na dose de 300 mg/kg com IM de 53%. Como esperado, também a Indometacina 10 mg/kg foi eficaz em reduzir ($p < 0,05$) o edema induzido pela formalina, com IM de 44% (Figura 3C).

3.3 EFEITO DO EHCR SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA E GLUTAMATO

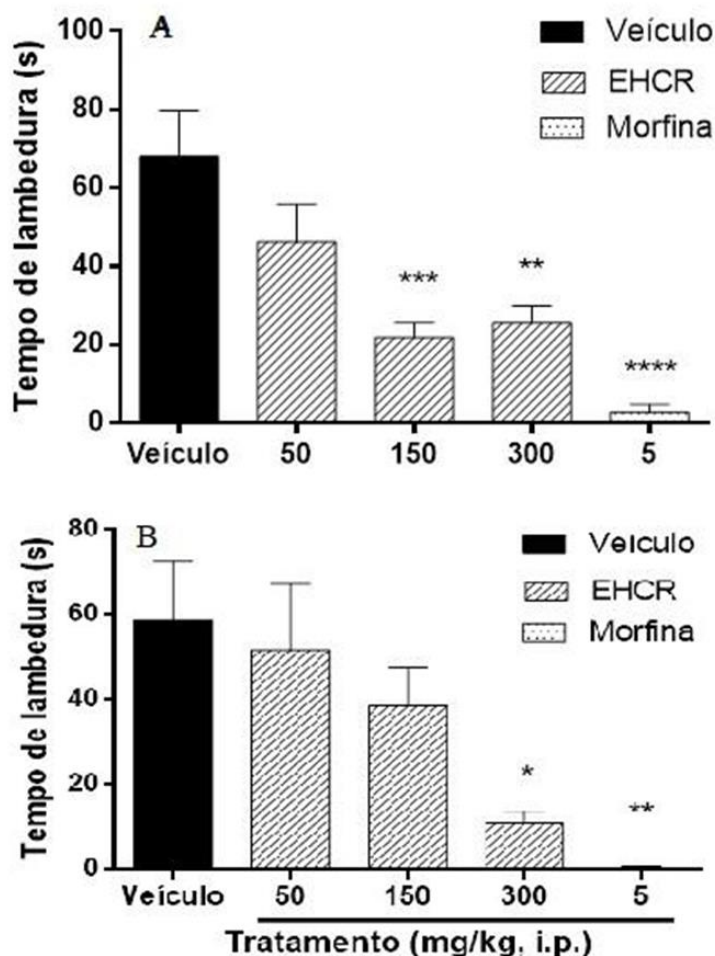
Os resultados representados na figura 4A referem-se aos efeitos dos tratamentos sobre a nocicepção induzida pela capsaicina, enquanto que na figura 4B estão representados os resultados referentes ao teste do glutamato. De acordo com os resultados, o tratamento dos animais com EHCR (150 e 300 mg/kg) promoveu redução significativa ($p < 0,001$; $p < 0,01$) da resposta dolorosa (tempo de lambertura) induzida pela capsaicina quando comparados ao controle, com IMs calculadas respectivamente, de 68% e 62%. Da mesma forma, a Morfina (controle positivo), também promoveu resposta antinociceptiva significativa ($p < 0,0001$) com IM de 96% (Fig. 4 A). No teste de dor induzida pelo glutamato observa-se que dos animais tratados com o EHCR, somente a dose de 300 mg/kg do extrato foi efetiva em reduzir de forma significativa o processo doloroso ($p < 0,05$) com IM de 82%. Também neste teste, o efeito antinociceptivo da Morfina foi observado ($p < 0,001$), com IM calculada em 96% (Fig. 4 B).

Figura 3. Efeito do EHCR (50, 150 e 300 mg/kg) e da Indometacina (10 mg/kg) sobre a nocicepção induzida pela formalina (2,5%). A (fase neurogênica) B (fase inflamatória) e C (edema). Cada barra representa a média dos experimentos (n=8) seguido dos respectivos EPs. Asteriscos denotam significância estatística (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) quando comparado com o grupo controle (Veículo). ANOVA seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor.

Figura 4. Efeito do EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.), e da Morfina (5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de lambertura da pata (injetada com capsaicina) dos camundongos (A). Sobre o tempo de lambertura da pata injetada com glutamato (30 nmol/pata) (B). Cada barra representa a média dos experimentos (n=8) seguido dos respectivos EPMS. Asteriscos denotam a significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) quando comparado com o grupo controle (Veículo). ANOVA seguido do teste de Bonferroni.



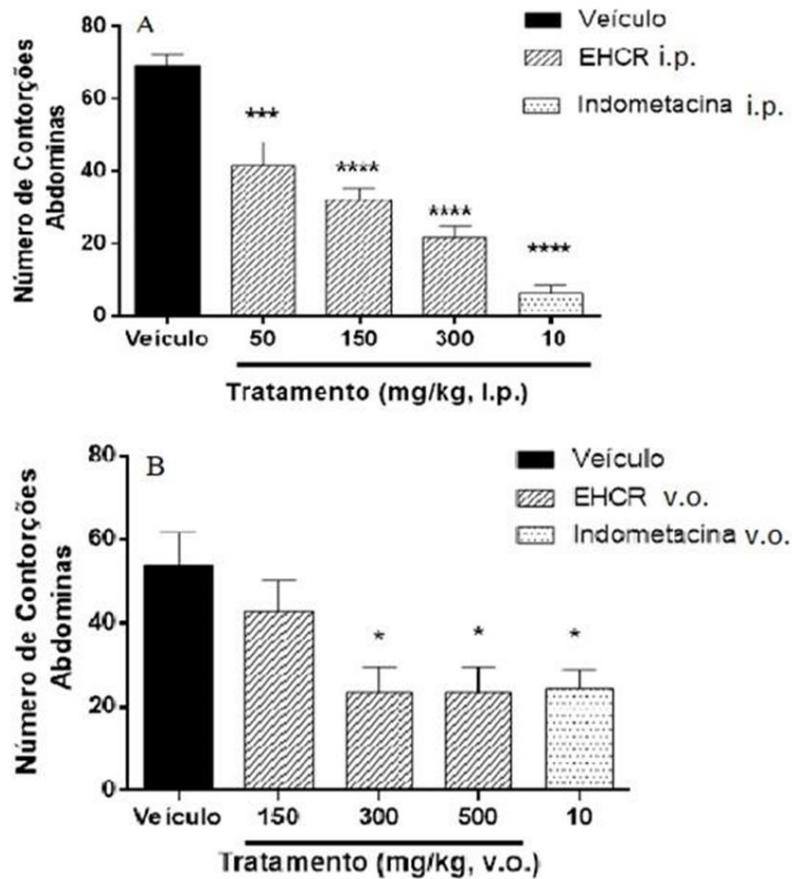
Fonte: Autor.

3.4 EFEITO DO EHCR SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento com EHCR sobre a nocicepção induzida por ácido acético (0,6%) estão representados na figura 5. Os resultados demonstram que o EHCR administrado por via intraperitoneal promoveu significativa redução do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em todas as doses utilizadas (Figura 5A). As percentagens de IMs calculadas foram respectivamente de 40%, 54% e 69%. Conforme esperado, o tratamento dos animais com Indometacina (controle positivo) também promoveu inibição das contorções abdominais nos animais ($p < 0,0001$) com uma IM de 90%. Quando administrado por via oral (Figura 5B), somente as doses de 300 e 500 mg/kg promoveram significativa ($p < 0,05$) redução do número de contorções abdominais, ambas com

IMs de 56%. Também neste experimento a Indometacina foi efetiva em promover redução do número de contorções abdominais, com IM de 55%.

Figura 5. Efeito do tratamento com EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.) e Indometacina (10 mg/kg, i.p.) (A) e tratamento v.o. com EHCR (50, 150 e 300 mg/kg) e Indometacina (10 mg/kg) (B) sobre nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada barra representa a média dos experimento (n=8) seguido dos respectivos EPMS. Asteriscos denotam significância estatística (*p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001) quando comparado com o grupo controle (Veículo). ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

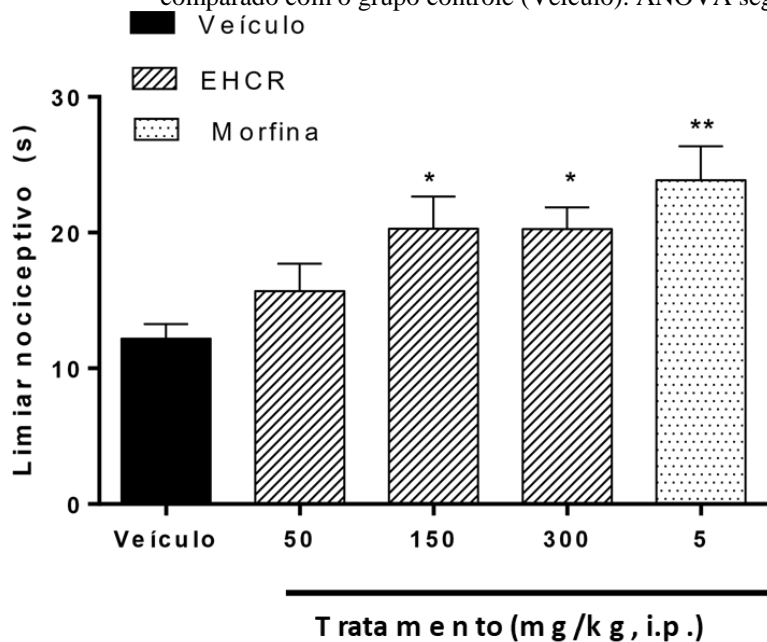


Fonte: Autor.

3.5 EFEITO DO EHCR SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CALOR – TESTE DA PLACA QUENTE

Na figura 6 estão expressos os resultados obtidos referentes à antinocicepção do EHCR (50, 150 e 300 mg/kg) no teste da nocicepção induzida pelo calor (teste da placa quente). Os resultados demonstram que o limiar nociceptivo dos animais submetidos ao teste foi aumentado de forma significativa (p<0,05) somente com as doses de 150 e 300 mg/kg do EHCR quando comparado com o grupo controle (veículo). Entretanto, um mesmo perfil farmacológico foi observado com ambas as doses, com IMs bastante semelhantes, de aproximadamente 65%. Também se observa que os animais tratados com Morfina tiveram aumento do limiar nociceptivo (p<0,01), com IM de 95%.

Figura 6. Efeito do EHCR (50, 150 e 300 mg/kg, i.p.) e da Morfina (5 mg/kg, i.p.) sobre o limiar nociceptivo de animais (camundongos) submetidos ao teste da placa quente. Cada barra representa a média dos experimentos (n=8) seguido dos respectivos EPMS. Asteriscos denotam significância estatística (*p<0,05; **p<0,01) quando comparado com o grupo controle (Veículo). ANOVA seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram validados em testes farmacológicos *in vivo* de dor aguda as propriedades antinociceptiva de *C. retusum* com o EHCR. A triagem dessa propriedade farmacológica foi realizada utilizando testes animais, nos quais o processo doloroso pode ser induzido quimicamente com: formalina, capsaicina, ácido acético ou glutamato, ou ainda termicamente, sendo caso o calor (teste da placa quente). Como reportado anteriormente, a planta em estudo *C. retusum* exibe um perfil fitoquímico bastante semelhante à *C. ambrosioides*, outra espécie do gênero *Chenopodium*, detentora de várias propriedades medicinais, principalmente antinociceptiva e anti-inflamatória. Ambas as espécies são utilizadas na medicina popular para o tratamento de processos patológicos onde as dores agudas e/ou crônicas fazem parte da sintomatologia. (Rodrigues *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2014). Outra espécie do gênero *Chenopodium* como, *Chenopodium album* L. também tem seus efeitos antinociceptivos identificados (Dai *et al.*, 2002) o que incentivou a pesquisa com a planta em estudo.

No presente estudo, o primeiro teste utilizado foi o de teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que corresponde ao primeiro teste *in vivo*, geralmente utilizado em laboratórios do mundo inteiro (Barret, 2015, Abboud *et al.*, 2021). Desenvolvido por Collier e colaboradores (1968), desde então o teste é descrito como modelo típico de dor inflamatória e

tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para o rastreio de propriedades analgésicas ou anti-inflamatórias de novos agentes. Na maioria dos casos é usado como teste para estudar os efeitos antinociceptivos de extratos e compostos naturais ou sintéticos (Imam, Moniruzzaman, 2014) partindo para outros mais específicos. Sugere-se que esse teste de nocicepção represente a estimulação do mecanismo periférico, já que a administração do agente flogístico (nesse caso o ácido acético) leva a um aumento nos níveis de ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). O mecanismo pelo qual o ácido acético promove a nocicepção se dá através da liberação de mediadores endógenos, incluindo prostaglandinas (PGE₂ e PGE_{2α}), bradicinina, serotonina, histamina e citocinas que estimulam os neurônios nociceptivos; a dissociação de prótons do ácido que por sua vez ativam canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) e receptores de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1), ambos localizados nos neurônios aferentes primários (Nascimento, 2016). Tais mediadores se acumulam nos fluidos peritoneais que podem induzir vários neurônios nociceptivos periféricos sensíveis a anti-inflamatório não esteroideal (AINE) dentro da cavidade peritoneal (Sani *et al.*, 2012). A irritação prolongada da cavidade peritoneal tem sido associada ao aumento nos níveis de PGEs no líquido peritoneal, o que aumenta a permeabilidade capilar e a liberação de glutamato e substância P de terminais de fibras aferentes periféricas (Castellain *et al* 2014). O teste de ácido acético tem suas limitações – pois testes cujo parâmetro de avaliação são contorções abdominais do animal apresentam baixa especificidade mas, de modo geral, pode-se dizer que se trata de um método bem consolidado na literatura para avaliação do potencial nociceptivo de substâncias. As contorções abdominais são o movimento de contração e rotação do abdome do animal associadas ao movimento de extensão das patas traseiras (Collier *et al.*, 1968; Nascimento, 2016, Mat *et al*, 2023). No presente estudo foi demonstrado que o tratamento dos animais com EHCR administrado tanto por via oral quanto intraperitoneal, foi capaz de reduzir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com perfil de resposta muito semelhante aos obtidos com *C. ambrosiodes* (Grassi *et al.*, 2013). Com base no que foi exposto acima, a capacidade do EHCR de atenuar os efeitos do ácido acético sugere que o efeito antinociceptivo do extrato possa envolver, em parte, sua capacidade de inibir COX e LOX nos tecidos periféricos, levando à diminuição da síntese de PGEs e ao impedimento da transdução da dor em nociceptores aferentes primário. Entretanto, testes posteriores são necessários para comprovar tais efeitos.

Uma vez que o EHCR foi capaz de reduzir as contorções abdominais induzidas por ácido acético, o segundo teste de dor utilizado no estudo foi o teste da formalina. Esse teste foi descrito por Hunskaar & Hole (1987), o qual permite verificar a efetividade de agentes

antinociceptivos a partir da avaliação comportamental em duas fases do processo doloroso: a fase neurogênica (primeira fase) e a fase inflamatória (segunda fase). Nesse teste, a injeção de formalina na pata posterior traseira do animal resulta em comportamentos associados à dor, como lambida ou mordida da pata lesada (Silva *et al.*, 2013, Abboud *et al.*, 2021). É um teste muito utilizado na mensuração da nocicepção e como já reportado, o teste caracteriza-se por duas fases: a fase neurogênica ou aguda (primeira fase) que inicia imediatamente após a injeção de formalina e permanece pelos primeiros 5 minutos; e a fase de origem inflamatória (segunda fase) que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina. Isso torna o teste vantajoso em relação aos outros testes de nocicepção, pois possibilita a avaliação de dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo. Entre as fases neurogênica e inflamatória, há o período denominado intervalo de quiescência (Komatsu *et al.*, 2019), que ocorre devido a uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais e espinhais do animal (Silva *et al.*, 2013; Castellain *et al.*, 2014). A primeira fase, de origem neurogênica, está relacionada à estimulação química dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e das fibras do tipo A δ e à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase possui relação com a liberação de mediadores pró-inflamatórios (bradicinina, prostaglandinas e serotonina) (Silva *et al.*, 2013, Lopes *et al.*, 2019). Tais mediadores também estão associados ao edema, outro parâmetro que foi avaliado através do teste de formalina. Eles são responsáveis por uma alteração da permeabilidade vascular local, que leva à perda de fluido para o terceiro espaço, gerando o achado do edema (Coelho, 2004). Sabe-se que o teste da formalina é um dos testes mais adequados para identificação de agentes anti-inflamatórios. (Soyocak *et al.*, 2019;)

No presente estudo, o EHCR promoveu a redução do tempo de reação nas duas fases (neurogênica e inflamatória) do processo doloroso induzido pela formalina. Além disso, cabe ressaltar que todas as doses de EHCR tiveram uma redução do tempo de reação na fase I (neurogênica) do teste. Isso sugere que o EHCR possa exercer analgesia de ação central, assim como Morfina e Codeína, agindo sobre nociceptores responsáveis pela ativação da fibra C, das fibras do tipo A δ e a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. Já na fase II (inflamatória) do teste, todas as doses de EHCR foram efetivas em reduzir a dor de forma estatisticamente relevante, com ação farmacológica a Indometacina. Esse achado também sugere que a ação do EHCR sobre os mediadores pró-inflamatórios (bradicinina, prostaglandinas e serotonina), corroborando com os resultados obtidos no teste do ácido acético. O efeito antinociceptivo de *C. ambrosiodes* também foi constatado através do teste da formalina (Grassi *et al.*, 2013). Os efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos observados com

o tratamento da indometacina, sobretudo na fase II do teste da formalina, e sua ação antiedematogênica e no teste do ácido acético, são relacionados do seu mecanismo de ação farmacodinâmico predominantemente sobre os mediadores pró-inflamatórios, atuando principalmente na dor de origem inflamatória e pouco na dor de origem neurogênica (Tan *et al.*, 2018).

Outro teste utilizado para mensuração da antinocicepção do EHCR também realizado neste estudo foi o teste da capsaicina. A injeção subcutânea de capsaicina, uma neurotoxina extraída da pimenta de gênero *Capsicum sp.*, induz dor de origem neurogênica por meio da ativação de fibras aferentes primárias do tipo C, levando a liberação espinal de glutamato e substância P (Klein-Junior *et al.* 2017). Também estimula os receptores ionotrópicos TRPV1, presentes nos neurônios sensoriais primários, aumentando a liberação de glutamato e neuropeptídeos que contribuem no processo doloroso, se assemelhando muito à dor de origem neurogênica detectada no teste de formalina (Grassi *et al.*, 2013). No presente estudo, os resultados com as doses de 150 e 300 mg/kg de EHCR demonstraram o efeito antinociceptivo do EHCR sobre a dor de origem neurogênica e corroboram com os resultados obtidos na fase neurogênica do teste da formalina. Como esperado, o controle positivo morfina também apresentou efeito significativo, visto que seu mecanismo de ação sobre a dor de origem neurogênica está relacionado com o fato de ser um agonista do receptor opioide μ / δ misto (OR) (Yadlapalli *et al.*, 2017). Da mesma forma que nos testes anteriores, o EHCR apresentou resultados semelhantes aos obtidos por Grassi *et al.*, (2013) em seus estudos sobre a *C. ambrosioides*, que também reduziu de forma significativa a nocicepção causada pela capsaicina.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório de grande importância para o sistema nervoso central (SNC). Na literatura é reportado que seu mecanismo de ação como agente nociceptivo se dá através da ativação dos nociceptores ionotrópicos como NMDA (N-metil D-aspartato) e AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e também receptores metabotrópicos, que por sua vez modulam a abertura dos canais iônicos, levando à despolarização dos nociceptores (Santos, 2010, Boccella *et al.*, 2020). Desta forma, a aplicação de glutamato na pata de roedores promove dor, sendo incluído como modelo de nocicepção (Abboud *et al.*, 2021). No presente estudo, a ação antinociceptiva do EHCR foi o teste de glutamato. Os resultados obtidos demonstraram que o EHCR (300 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pela aplicação de glutamato na pata do animal. Os resultados obtidos no estudo sugerem que o EHCR possa estar bloqueando as respostas induzidas pelo glutamato via receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos, porém, outros testes

serão necessários para verificar se o mecanismo de ação do EHCR envolve o sistema glutamatérgico.

A temperatura elevada ou extremamente baixa pode gerar danos teciduais que promovem liberação de mediadores do processo doloroso sendo também considerada estímulo térmico para a dor. O aumento da temperatura promove a ativação de canais iônicos térmicos sensíveis como o nociceptor TRPV1 que quando ativado promovem influxo de sódio nos neurônios nociceptivos primários despolarizando-os promovendo potenciais de ação (Chem *et al.*, 2020). Nesse estudo, o último teste de dor utilizado envolveu um estímulo diferente dos anteriores descritos. No teste de placa quente, como o nome sugere, a dor é induzida através do estímulo térmico. Os animais são colocados sobre uma placa a aproximadamente 50°C e é contabilizado o tempo de latência a resposta comportamental à dor. Nesse teste, somente substâncias com ação central conseguem aumentar o tempo de resposta à dor (limiar nociceptivo) induzida pela placa quente (como os opióides, que não coincidentemente são usados como controle positivo neste teste). Os nociceptores (particularmente as fibras C e A δ) são estimulados devido à ativação dos receptores vanilóides (como os receptores do tipo VR-1, cujo limiar de ativação é de 43 °C, e os receptores VRL1, cujo limiar de ativação é de 52 °C) (Silva *et al.*, 2013). Os resultados demonstraram um aumento significativo no limiar nociceptivo à dor termogênica nos animais sob efeito de EHCR nas doses de 150 mg/kg e 300 mg/kg. Tais resultados corroboram com resultados obtidos na literatura com outras espécies do gênero, como *C. opulifolium* (doses de 100 a 200 mg/kg) e também a *C. album* (na dose de 150 mg/kg), avaliadas no mesmo teste farmacológico (Ajayi *et al.*, 2017; Magama, Asita, 2017).

Todos os testes de dor utilizados no estudo exigem que o sistema motor dos animais esteja intacto, pois de alguma forma, o comportamento doloroso observado e mensurado envolvia mecânica. Desta forma, foi inserido nos protocolos experimentais do estudo, o teste do campo aberto. O teste é realizado em um aparato circular ou quadrado cercado por paredes de vidro ou acrílico transparente para evitar que o animal fuja. O assoalho do aparato o qual é marcado com quadrantes é possível realizar a quantificação da atividade locomotora e exploratória do animal durante o teste. Trata-se de um teste bastante utilizado devido a sua simplicidade, facilidade de realização e rápida mensuração e interpretação dos comportamentos (Tolardo *et al.*, 2010). O número de cruzamentos é o parâmetro mais importante quando se pretende verificar se o efeito de uma substância envolve o sistema motor. No presente estudo o número de cruzamentos não foi alterado pelo EHCR e coincidem com os resultados obtidos com *C. opulifolium* (Ajayi *et al.*, 2017) e *C. ambrosioides* (Grassi *et al.*, 2013), sugerindo que

os resultados obtidos não têm interferência do efeito do extrato sobre a performance motora dos animais.

Um dos fatores que nos motivaram a estudar os efeitos antinociceptivos de *C. retusum* foi a sua semelhança fitoquímica com *C. ambrosioides*, e o fato de esta exibir efeito antinociceptivo comprovado (Grassi *et al.*, 2013) e ser usada na medicina popular no manejo da dor. De fato, o estudo fitoquímico das partes aéreas do extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* resultou no isolamento de dois novos monoterpenos: poliol, 4-hidroxi-4 (α ou β) -isopropil-2-metil-2-ciclo-hexen-1-ona (1) e 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α , 5 α , 6 α -triol (2), juntamente com cinco compostos conhecidos, (1S, 2S, 3R, 4S) -1-metil-4- (propan- 2-il) ciclo-hexano-1,2,3,4-tetrol (3), (1R, 2S, 3S, 4S) - 1,2,3,4-tetra-hidroxi-p-mentano (4), (1R, 2S) -3-p-menten-1,2-diol (5), (1R, 4S) -p-ment-2-en-1-ol (6) e 1,4-di-hidroxi-p-menth-2- ene (7) (Hou *et al.*, 2017). Também foram isolados da planta vários alcaloides (Shoab *et al.*, 2016), flavonoides como quercetina, luteolina, e outros compostos com atividade antinociceptiva comprovada cientificamente (Liu *et al.*, 2022, Ntalouka, Tsirivakou, 2023, Estudos fitoquímicos com *C. retusum* estão sendo conduzidos por Farias (resultados não publicados) e evidenciaram 65% de semelhança fitoquímica com *C. ambrosioides*. Ao que tudo indica, a semelhança entre as duas plantas quanto as suas respectivas propriedades farmacológicas pode ser devido aos fitoconstituintes que ambas as espécies possuem em comum.

5 CONCLUSÃO

Os resultados em conjunto nos permitem concluir que o EHCR exibe provável efeito antinociceptivo validando, em parte, o uso de *Chenopodium retusum* no manejo da dor. Os resultados equivalem às propriedades já encontradas em *Chenopodium ambrosioides* no que tange a antinocicepção. Porém, estudos posteriores são necessários para determinação dos fitoconstituintes responsáveis pela ação antinociceptiva bem como o seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- Abbas MA. Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chem Biol Interact.* 330:109178, 2020.
- Abboud C, Duveau A, Bouali-Benazzouz R, Massé K, Mattar J, Brochoire L, Fossat P, Boué-Grabot E, Hleihel W, Landry M. Animal models of pain: Diversity and benefits. *J Neurosci Methods.* 348:108997, 2021.
- Abubakar A, Nazifi AB, Odoma S, Shehu S, Danjuma NM. Antinociceptive activity of methanol extract of *Chlorophytum alismifolium* tubers in murine model of pain: Possible involvement of α 2-adrenergic receptor and KATP channels. *J Tradit Complement Med.* 10(1):1-6, 2019.
- Ajayi AM, Tanayen JK, Magomere A, Ezeonwumelu JOC. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Chenopodium opofolium schrad* leaves. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 6(1): 14-21, 2017.
- Alles SRA & Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol. Rev.* 70(2): 315-347, 2018.
- Barret JE. The pain of pain: challenges of animal behaviour models. *Eur. J. Pharmacol.* 753: 183-190, 2015.
- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanism underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924(2): 219-228, 2002.
- Bellik Y, Laid B, Hasan AA. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules.* 18:322-353, 2013.
- Boccella S, Marabese I, Guida F, Luongo L, Maione S, Palazzo E. The Modulation of Pain by Metabotropic Glutamate Receptors 7 and 8 in the Dorsal Striatum. *Curr Neuropharmacol.* 18(1):34-50, 2020.
- Bonzani NE, Barboza GE, Bugatti MA, Espinar LA. Morpho-histological studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina. *Fitoterapia* 74: 207-225, 2002.
- Butler MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *RSC Adv.* 25: 415-516, 2013.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Cechinel V, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* 14(6): 401-418, 2000.
- Castellain RC, Gesser M, Tonini F, Schulte RV, Demessiano KZ, Wolff FR, Delle-Monache F, Netz DJ, Cechinel-Filho V, de Freitas RA, de Souza MM, Meyre-Silva C. Chemical composition, antioxidant and antinociceptive properties of *Litchi chinensis* leaves. *J Pharm Pharmacol* 66(12):1796-807, 2014.
- Coelho EB. Mecanismos de formação de edemas. *Medicina – Ribeirão Preto.* 37: 189-198, 2004.

Collier HOJ, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 32(2):295-310, 1968.

Dai Y, Ye WC, Wang ZT, Matsuda H, Kubo M, But PP. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album L* in mice. *J Ethnopharmacol.* 81(2):245-50, 2002.

De Souza MM, Bella Cruz A, Schuhmacher MB, Kreuger MRO, Freitas RA, Bella Cruz RC, Bellé Bresolin TM, Cechinel Filho V. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos.. *Ciências Farmacêuticas contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos.* 3:119-131, 2006.

Desborough MJR & Keeling DM. The aspirin story – from willow to wonder drug. *Br. J. Haematol.* 177(5): 674-683, 2017.

Filho AW, Cechinel Filho V, Olinger L, De Souza MM. Quercetin: futher investigation of its antinociceptive. Properties and mechanisms of action. *Arch. Pharm. Res.* 31:713-721, 2008.

Filho FSA, De Oliveira PL, Mariath JED. Tricommas de *Chenopodium retusum Juss.* ex Moq. *Insula* 21: 43-58, 1992.

Gonçalves CJ, Lenoir AS, Padaratz P, Corrêa R, Niero R, Cechinel-Filho V, Campos Buzzi Fd. Benzofuranones as potential antinociceptive agents: structure-activity relationships. *Eur J Med Chem.* 56:120-6, 2012.

Grassi LT, Malheiros A, Meyre Silva C, Buss ZS, Monguilhott ED, Frode TS, Da Silva KABS, De Souza MM. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, antinociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.* 145: 127-138, 2013.

Gripp ELO, Carneiro LU, Pereira,ISP, Vega MRG, & Marinho, BG. Avaliação das propriedades analgésicas de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith LC / Evaluation of analgesic properties of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith LC. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(1): 382–395, 2020

Hou SQ, Li YH, Huang XZ, Li R, Lu H, Tian K, Ruan RS, Li YK. Polyol monoterpenes isolated from *Chenopodium ambrosioides*. *Nat Prod Res.* 31(21):2467-2472, 2017.

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

Imam MZ & Moniruzzaman M. Antinociceptive effect of ethanol extract of leaves of *Lannea coromandelica*. *J. Ethnopharmacol.* 154(1): 109-115, 2014.

Inaltekin A & Kivrak Y. Evaluation of the Effect of Vortioxetine on Pain Threshold By Hot-Plate Test in Mice. *Noro Psikiyatr Ars.* 58(4):274-277, 2021.

Kamen LB & Feeko KJ. Opioid Syndrome: Failed Opioid Therapy for Chronic Noncancer Pain. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 25:375-395, 2014.

Kheto A, Das R, Deb S, Bist Y, Kumar Y, Tarafdar A, Saxena DC. Advances in isolation, characterization, modification, and application of *Chenopodium starch*: A comprehensive

review. Int J Biol Macromol. 222(Pt A):636-651, 2022.

Klein-Júnior LC, Zambiasi D, Salgado, GR, Monache FD, Filho VC, Buzzi FC. The validation of *Calophyllum brasiliense* (“guanandi”) uses in Brazilian traditional medicine as analgesic by in vivo antinociceptive evaluation and its chemical analysis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 390, 733-739, 2017.

Komatsu T, Katsuyama S, Takano F, Okamura T, Sakurada C, Tsuzuki M, Ogawa K, Kubota A, Morinaga O, Tabata K, Sakurada T. Possible involvement of the μ opioid receptor in the antinociception induced by sinomenine on formalin-induced nociceptive behavior in mice. Neurosci Lett. 699:103-108, 2019.

Kumar S, Rastogi S, Kumar S, Mahendra P, Bansal M, Chandra L. Pain in trigeminal neuralgia: neurophysiology and measurement: a comprehensive review. J. Med. Life. 6(4):383- 388, 2013.

Liu C, Liu DQ, Tian YK, Mei W, Tian XB, Xu AJ, Zhou YQ. The Emerging Role of Quercetin in the Treatment of Chronic Pain. Curr Neuropharmacol. 20(12):2346-2353, 2022.

Lopes DM, Cater HL, Thakur M, Wells S, McMahon SB. A refinement to the formalin test in mice. F1000Res. 8:891, 2019.

Macedo-Júnior SJ, Nascimento FP, Luiz-Cerutti M, Santos ARS. The role of peripheral adenosine receptors in glutamate-induced pain nociceptive behavior. Purinergic Signal. 17(2):303-312, 2021.

Magama S & Asita AO. Evaluation of *Chenopodium album* Linn, crude methanolic leaf extract for central antinociceptive activity in albino mice using the hot plate test. Int. J. Sci. 6:1-9, 2017.

Martínéz E, Aira Z, Buesa I, Aizpurual I, Rada D, Azkue JJ. Embodied pain in fibromyalgia: disturbed somaterepresentations and increased plasticity of the body schema. Plos One. 13(4): 1 – 17, 2018.

Mat NH, Bakar SNS, Murugaiyah V, Chawarski MC, Hassan Z. Analgesic effects of main indole alkaloid of kratom, mitragynine in acute pain animal model. Behav Brain Res. 439:114251, 2023.

Melo Júnior JCF & Boerger MRT. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. Rev. Hoehnea. 42:211-212, 2015.

Nascimento SR. Avaliação da atividade antinociceptiva de compostos derivados da *Parapiptadenia rigida* e *Cadrella fissilis* em ensaios farmacológicos “in vivo”. Videira. Mestrado (Ciência e Biotecnologia), Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira. 2016.

Ntalouka F, Tsrivakou A. Luteolin: A promising natural agent in management of pain in chronic conditions. Front Pain Res (Lausanne). 2023.

Pentkowski NS, Rogge-Obando KK, Donaldson TN, Bouquin SJ, Clark BJ. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. Neurosci Biobehav. 127:647-658, 2021.

Peres MB, Vercillo UE, Dias BFS. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? Biodiversidade Bras. 45-48, 2011.

Rodrigues JGM, Albuquerque PSV, Nascimento JR, Viana Campos JA, Godinho ASS, Araújo SJ, Brito JM, Jesus CM, Miranda GS, Rezende MC, Negrão-Côrrea DA, Rocha CQ, Silva LA, Guerra RNM, Nascimento FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. Journal of Ethnopharmacology. 264, 2021.

Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology. 31(12): 1279-1285, 1992.

Sani MHM, Zakaria ZA, Balan T, Teh LK, Salleh Z. Antinociceptive activity of metanol extract of *Muntingia calabura* leaves and the mechanisms of action involved. 1-10, 2012.

Santos FY. Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal na antinocicepção induzida pelo medo.. São Paulo. Mestrado (Psicobiologia), Universidade de São Paulo. São Paulo. 58, 2010.

Sen T, Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 147:59-110, 2015.

Servin ETN, Czezczko NG, Malafaia O, Torres OJM, Lima FCVM, Silva GEB, Cartágenes MSS, & Garcia JBS. Effect of Arrabidaea Chica Verlot Hydroalcoholic Extract on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis of Rat Knees. Brazilian Journal of Health Review, 3(3): 7038–7057, 2020

Sharifi-Rad M, Ozcelik B, Altın G, Daşkaya-Dikmen C, Martorell M, Ramírez-Alarcón K, Alarcón-Zapata P, Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Alves Borges Leal AL, Melo Coutinho HD, Gyawali R, Tahergorabi R, Ibrahim SA, Sahrifi-Rad R, Sharopov F, Salehi B, Contreras MM, Segura-Carretero A, Sen S, Sahrifi-Rad J. Salvia spp. Plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. Trends Food Sci. Technol. 80:242–263, 2018.

Shoaib M, Shah SWA, Ali N, Shah I, Ullah S, Ghias M, Tahir MN, Gul F, Akhtar S, Ullah A, Akbar W, Ullah A. Scientific investigation of crude alkaloids from medicinal plants for the management of pain. BMC Complement. Altern. Med. 16: 1-8, 2016.

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

Silva MGC, Amorim RNL, Câmara CC, Fontenele-Neto JD, Soto-blanco B. Acute and Sub-Chronic Toxicity of Aqueous Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Leaves in Rats. Journal of Medicinal Food. 17:979-984, 2014.

Smejkal K. Selected natural phenolic compounds - potential treatment for peripheral neuropathy? Ceska. Slov. Farm. 63: 55-70, 2014.

Soyocak A, Kurt H, Cosan DT, et al. Tannic acid exhibits anti-inflammatory effects on formalin-induced paw edema model of inflammation in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 38(11):1296-1301, 2019.

Tan J, Deng Z, Liu G, Hu S, Liu S. Anti-inflammatory polymersomes of redox-responsive polyprodrug amphiphiles with inflammation-triggered indometacina release characteristics. *Biomaterials*. 162: 121-132, 2018.

Tolardo R, Zetterman L, Bitencourt DR, Mora TC, De Oliveira FL, Biavatti MW, Amoah SKS, Burger C, De Souza MM. Evaluation of behavioural and pharmacological effects of *Hedysmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *J. Ethnopharmacol*. 128(1): 63-70, 2010.

Vogel HG & Vogel WH. "Pharmacological assays", in *Drug Discovery and Evaluation*. Texas: J. A. Majors Company. 360-418, 2007.

Walton DM & Marsh J. The Multidimensional Symptom Index: a new patient reported outcome for pain phenotyping, prognosis, and treatment decisions. *Eur J Pain*, 2018.

Wang, Victor C., and William J. Mullally. "Pain Neurology." *The American Journal of Medicine*, 133(3): 273-280, 2020.

Yadlapalli JSK, Dogra N, Walbaum AW, Wessinger WD, Prather PL, Crooks PA, Dobretsov M. Evaluation Of Analgesia, Tolerance, And The Mechanism Of Action Of Morphine-6-O-Sulfate Across Multiple Pain Modalities In Sprague-Dawley Rats. *Anesth Analg*. 3(125): 1021-1031, 2017.

Zakaria ZA, Jaios ES, Omar MH, Abd Rahman S, Hamid SS, Ching SM, Teh LK, Salleh MZ, Deny S, Taher M. Antinociception of petroleum ether fraction derived from crude methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves and its possible mechanisms of action in animal models. *BMC Complement Altern Med*. 16(1):488, 2016.