



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
Professor Aloísio Teixeira



**EVELYNN DALILA DO NASCIMENTO MELO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
DAS CHALCONAS SINTÉTICAS SUBSTITUÍDAS LC24, LC31 E LC41 *IN VIVO*.**

**MACAÉ, 2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
Professor Aloísio Teixeira



EVELYNN DALILA DO NASCIMENTO MELO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS  
CHALCONAS SINTÉTICAS SUBSTITUÍDAS LC24, LC31 E LC41 *IN VIVO*.

Trabalho de conclusão de curso (TCC)  
apresentado ao Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Campus Macaé, como requisito para obtenção  
do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Lima do Carmo

MACAÉ, 2021

Verso da folha de rosto

CIP - Catalogação na Publicação (biblioteca@macae.ufrj.br)

MM528a Melo, Evelyn Dalila do Nascimento  
Avaliação das atividades antinociceptiva  
e anti inflamatória das chalconas  
sintéticas substituídas LC24, LC31 e LC41  
*in vivo* / Evelyn Dalila do Nascimento Melo.  
-- Rio de Janeiro, 2021.  
46 f.

Orientadora: Paula Lima do Carmo.  
Trabalho de conclusão de curso  
(graduação) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor  
Aloísio Teixeira, Bacharel em Farmácia,  
2021.

1. nocicepção. 2. inflamação. 3.  
chalconas. I. Carmo, Paula Lima do,  
orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

EVELYNN DALILA DO NASCIMENTO MELO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS  
CHALCONAS SINTÉTICAS SUBSTITUÍDAS LC24, LC31 E LC41 *IN VIVO*.

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

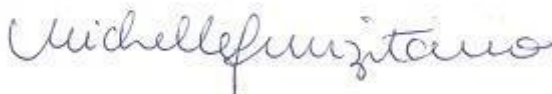
Macaé, 10 de maio de 2021.

Comissão avaliadora:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Lima do Carmo  
UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4689418225228922>



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano  
UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/6637126351943749>



Prof. Dr. André Gustavo Calvano Bonavita  
UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4396019359399323>

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus por estar sempre guiando meus passos e abençoando o meu caminho e minhas escolhas, assim como permitindo a concretização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Élide Maria e Vanderlei, por sempre me apoiarem com muito amor e por todo o suporte durante a vida. Em especial à minha mãe que sempre lutou e batalhou para que eu tivesse oportunidades melhores.

Aos meus avós, Maria e Manoel, por todo o amor e dedicação, além do apoio em todas as minhas decisões e pela preocupação em sempre me ver feliz e realizada no curso que sempre sonhei.

A minha irmã e companheira de vida Elyandra que sempre embarcou nos meus sonhos e que, mesmo nas minhas ausências, me compreende.

Ao meu primo Arthur, que mesmo de longe, se faz presente na minha vida.

Aos meus amigos da faculdade, em especial a Tamires e Natalie, por todo o amor e carinho, apoio, companheirismo e fidelidade. Além das ajudas com as obrigações acadêmicas.

Ao grande amigo inesquecível Gabriel Pietro. Obrigada por ter feito parte da minha história e por ter tornado o primeiro ano da faculdade mais leve e prazeroso. Na esperança do nosso reencontro.

Aos meus melhores amigos, Vinicius e Ana Rosa, por sempre estarem ao meu lado, por todo o incentivo e por comemorarem comigo a cada obstáculo vencido.

À minha querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Lima do Carmo, por sempre me incentivar a ser mais dedicada e responsável, por me acolher no Grupo de Pesquisa em Farmacologia de Produtos Bioativos, por todos os ensinamentos passados, por não medir esforços em ver meu crescimento e me ajudar a enxergar as coisas com novas perspectivas. Além de toda paciência e dedicação.

As minhas amigas de laboratório Isabela e Mirella por serem tão amorosas e sempre dispostas a me ajudar em qualquer momento. Este trabalho é nosso.

À minha orientadora do mestrado, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano, por aceitar me orientar na pós e por ceder gentilmente as chalconas, assim como agradeço ao João por sintetizá-las.

Ao Prof. Dr. André Calvano Bonavita por todo o auxílio e suporte ao laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos. Assim como ao Igor pelas ajudas e conselhos em relação aos experimentos.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Mário Sérgio Schultz, por ser tornar um grande amigo e me ensinar valores da vida que vou levar pra sempre comigo, além de ser um grande exemplo de humildade.

Aos amigos Rebeca e Roberto por todo o auxílio e ajuda no Laboratório Integrado de Química do Nupem.

Aos amigos e Bioteristas Liliam e Felipe por todo o zelo com os animais, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelos conselhos de vida. Vocês foram essenciais para a realização deste projeto.

Aos animais que fizeram parte deste estudo, que perderam as suas vidas em prol da ciência.

À UFRJ/Macaé e ao seu corpo docente, em especial aos professores do curso de farmácia, por participarem de forma efetiva na minha formação e por me abrirem portas.

À PIBIC-UFRJ por fomentar esta pesquisa com a concessão da bolsa de iniciação científica.

Muito obrigada a todos.

## RESUMO

Existe a necessidade de desenvolvimento de fármacos para o tratamento de dor aguda, e muitos trabalhos descrevem as chalconas como fonte de novos produtos bioativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório *in vivo* das chalconas sintéticas substituídas LC24 (4'-metoxichalcona), LC31 (2' -clorochalcona) e LC41 (4-nitro-2'-clorochalcona), cujas atividades anti-inflamatórias *in vitro* já haviam sido descritas. Foram utilizados camundongos suíços machos, pré-tratados via intraperitoneal com o veículo DMSO, ou com os controles positivos ( morfina ou indometacina) ou com as chalconas. Foi realizado o teste da formalina, sendo esta injetada via intraplantar, e então cronometrado o tempo gasto pelo animal lambendo a pata nas fases neurogênica e inflamatória. O segundo ensaio foi o teste da placa quente, no qual os animais foram colocados sobre esta e cronometrado o tempo de latência até que agitassem as patas. E, por último, o teste da placa quente modificado, no qual foram administrados carragenina e salina nas patas traseiras esquerda e direita, respectivamente. Posteriormente, os animais foram colocados sobre a placa quente e calculada a diferença dos tempos de latência entre as patas. Como resultados foram observados: 1) Teste da formalina: As chalconas foram avaliadas nas mesmas doses (10, 30 e 60 mg/kg). Na fase neurogênica todas apresentaram efeito antinociceptivo. A LC24 (10; 30 e 60 mg/kg) reduziu o tempo de lambida da pata de  $60,3 \pm 4,9$  s (DMSO) para  $38,9 \pm 4,1$ ,  $28,1 \pm 3,4$ , e  $35,0 \pm 5,5$  s ( $P < 0,05$ ) respectivamente; a LC31 (30 mg/kg), para  $34,8 \pm 5,4$  s ( $P < 0,05$ ); e a LC41 (60 mg/kg), para  $36,5 \pm 5,6$  s ( $P < 0,05$ ). Já na fase inflamatória, a LC24 (60 mg/kg) apresentou efeito antinociceptivo reduzindo o tempo de lambida da pata de  $361,6 \pm 17,8$  s (DMSO) para  $271,2 \pm 13,1$  s ( $P < 0,05$ ); e a LC41 (10; 30 e 60 mg/kg), para  $280,2 \pm 23,6$ ;  $232,4 \pm 24,8$  e  $285,1 \pm 23,5$  s, respectivamente ( $P < 0,05$ ). 2) Teste da placa quente: nenhuma das chalconas testadas obtiveram resultados significativos neste teste. 3) Teste da placa quente modificado: LC24 (60 mg/kg) e LC41 (10; 30 e 60 mg/kg) apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em quase todos os tempos avaliados. No tempo de 15 minutos, por exemplo, a LC24 reduziu a variação de latência entre as patas de  $4,7 \pm 0,7$ s (DMSO) para  $1,5 \pm 1,0$  ( $P < 0,05$ ); e a LC41, para  $0,0 \pm 0,0$ ;  $0,0 \pm 0,0$  e  $0,3 \pm 0,2$  s ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Pode-se concluir que LC24, LC31 e LC41 apresentaram efeitos antinociceptivos *in vivo*, por mecanismos centrais quando a dor foi desencadeada por estímulo químico, mas não por estímulo térmico. Além disso, as chalconas LC24 e LC41 também apresentaram efeito antinociceptivo relacionado a mecanismos anti-inflamatórios.

**Palavras-chave:** Nociceção; Inflamação; Chalconas.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de transdução de sinais nos nociceptores.....	12
Figura 2 – Ativação e sensibilização dos nociceptores através de mediadores inflamatórios .....	14
Figura 3 – Mecanismos periféricos e centrais da nocicepção .....	16
Figura 4 – Locais de ação dos opioides .....	18
Figura 5 – Regulação inibitória pelo GABA na neurotransmissão .....	19
Figura 6 – Estrutura química das chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) .....	24
Figura 7 – Reação de Claisen-Schmidt .....	24
Figura 8 – Modelo de dor aguda pelo teste da formalina .....	29
Figura 9 – Protocolo experimental do teste da formalina .....	29
Figura 10 – Placa quente .....	30
Figura 11 – Protocolo experimental do teste da placa quente .....	30
Figura 12 – Protocolo experimental do teste da placa quente modificado .....	31
Figura 13 – Efeito da LC24 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e 2ª (B) fases do teste da formalina .....	32
Figura 14 - Efeito da LC31 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e 2ª (B) fases do teste da formalina .....	32
Figura 15 - Efeito da LC41 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e 2ª (B) fases do teste da formalina .....	33



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de fármacos que fazem parte do arsenal terapêutico para controle da dor .....	23
Tabela 2 – Estruturas químicas das chalconas LC24, LC31 e LC41 .....	26
Tabela 3 – Efeito da LC24 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg no teste da placa quente. .....	34
Tabela 4 – Efeito da LC31 na dose de 30 mg/kg no teste da placa quente .....	34
Tabela 5 – Efeito da LC41 na dose de 60 mg/kg no teste da placa quente .....	35
Tabela 6 – Efeito da LC24 na dose de 60 mg/kg no teste da placa quente modificado .....	35
Tabela 7 – Efeito da LC41 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg no teste da placa quente modificado .....	36

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- ACC – Córtex cingulado anterior
- AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais
- AMPA-R – Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- ANOVA – Análise de variância simples
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- COX-2 - Ciclooxigenase-2
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DRG – Gânglio da raiz dorsal
- GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- IC<sub>50</sub> – concentração inibitória média
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta
- LC24 – 4' –metoxichalcona
- LC31 – 2' –clorochalcona
- LC41 – 4 –nitro-2'-clorochalcona
- LPS – Lipopolissacarídeo
- NGF – Fator de crescimento neuronal
- NMDA-R – Receptor N-metil D-aspartato
- NO – Óxido nítrico
- NK1 – Receptor de neurocinina-1
- MGlur – Receptor metabotrópico de glutamato
- P2X – Receptor purinérgico ativado por ATP
- PAG – Região Cinzenta periaquedutal
- PFC – Córtex pré-frontal
- PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PRGC – Proteína relacionada ao gene da calcitonina
- PRGC-R – Receptor da proteína relacionada ao gene da calcitonina
- rACC – Córtex cingulado anterior rostral
- RVM – Medula rostral – ventromedial
- S1 – Córtex somatossensorial primário
- S2 – Córtex somatossensorial secundário
- SNC – Sistema nervoso central
- SNP – Sistema nervoso periférico

TNF -  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TrKa – Receptor de tropomiosina quinase A

TRPV1 – receptor de potencial transitório vanilóide tipo I

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 Classificações da dor	10
1.2 Mecanismos periféricos da nocicepção	11
1.3 Mecanismos centrais da nocicepção	14
1.4 Mecanismos de modulação da dor	16
1.5 O processo inflamatório na condução da dor	19
1.6 Problemáticas em relação à terapia farmacológica da dor e inflamação	20
1.7 Chalconas	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	26
<b>3 OBJETIVOS</b>	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1 Síntese das chalconas	27
4.2 Animais	28
4.3 Teste da formalina	28
4.4 Teste da placa quente	29
4.5 Teste da placa quente modificado	30
4.6 Análises estatísticas	31
<b>5 RESULTADOS</b>	31
5.1 Teste da formalina	31
5.2 Teste da placa quente	33
5.3 Teste da placa quente modificado	35
<b>6 DISCUSSÃO</b>	36
<b>7 CONCLUSÕES</b>	38
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Classificações da dor

A dor pode ser compreendida, segundo a *International Association for the Study of Pain*, como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Além disso, pode ser classificada de diferentes formas, sendo uma destas de acordo com o tempo e a duração configurando-se em dor aguda ou dor crônica. A dor aguda ocorre através da ativação dos nociceptores por dano tecidual através de estímulos químicos, térmicos ou mecânicos. Este tipo de dor é auto limitante podendo ser controlada ao longo de dias a semanas, além disso, desempenha papel vital para fornecer sinais de alerta de que algo está errado e de que precisa de mais exames e também é capaz de ativar o ramo simpático do sistema nervoso autônomo produzindo diferentes tipos de respostas como, por exemplo, careta facial, comportamento de guarda, inquietação e outros (ANWAR, 2016).

A dor crônica geralmente persiste por três meses ou mais. Pode ser afetada por fatores físicos, ambientais e psicológicos. A qualidade de vida, bem-estar e capacidade de funcionar do indivíduo ficam comprometidos com este tipo de dor, além disso, a adaptação positiva a este quadro não ocorre, à medida que o tempo passa o sistema doloroso vai se tornando hiper-responsivo e dessa forma ocorre a produção de uma dor intensa, disseminada e incessante (VO; MARX; PENLES, 2008).

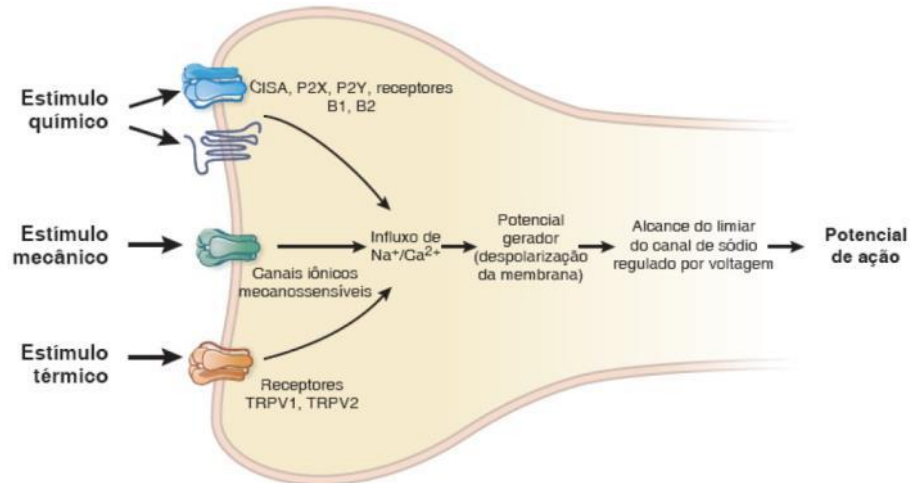
Quanto aos mecanismos neurofisiológicos, a dor pode ser classificada em dor nociceptiva e dor não nociceptiva. Em relação à dor nociceptiva, danos externos causam uma lesão que é detectada e percebida através dos nociceptores (receptores especializados da dor). As informações obtidas são transmitidas aos centros reflexos e ao sistema nervoso central (SNC) para que ocorra o processamento e assim podem ser moduladas pelo controle descendente que pode alterar a percepção (REICHLING; GREEN; LEVINE, 2013; SNEDDON, 2018). Já a dor não nociceptiva é subdividida em dor neuropática e dor idiopática (AWAR, 2016). A dor neuropática ocorre através de uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (GIERTHMHULEN; BARON, 2016). Por sua vez, a dor idiopática,

também chamada de dor psicogênica, é aquela que faz com que o indivíduo sofra fisicamente sem uma causa orgânica pré-estabelecida (DACORSO; DACORSO, 2018).

## **1.2 Mecanismos periféricos da nocicepção**

Mecanismos eletrofisiológicos e neuroquímicos complexos envolvem as etapas de nocicepção aguda, sendo assim diferentes etapas são descritas, como: 1) impulso nociceptivo causado por algum estímulo (térmico, mecânico, químico, elétrico), transdução de sinal no local da ativação dos nociceptores seguida da condução do mesmo ao longo da fibra nervosa aferente primária; 2) modulação do sinal no corno dorsal da medula espinhal em direção aos locais supra espinhais; e 3) integração de sinais onde o impulso nociceptivo é convertido em uma mensagem consciente, ou seja, um componente sensitivo-discriminativo (intensidade, duração do estímulo nociceptivo, localização) é atribuído à sensação dolorosa causando, por fim, características desagradáveis da dor (MARTIN, 2018).

O primeiro evento que ocorre na nocicepção é a transdução de sinais que envolve a conversão dos estímulos periféricos, nas fibras sensoriais nociceptivas, em um potencial de ação. Um impulso nervoso é criado quando a intensidade do estímulo é suficiente para atingir o limiar de um potencial de ação e, dessa forma, este se propaga ao longo da fibra aferente primária para o SNC (Figura 1). Dependendo da intensidade do estímulo, fibras nervosas adicionais são recrutadas assim como áreas adicionais do sistema nervoso. Normalmente as fibras aferentes primárias transmitem informações de mais de um receptor de dor secundário à ramificação das fibras aferentes (GARLAND, 2012).



Fonte: GRIFFIN; WOOLF (2014).

Figura 1. Mecanismos de transdução de sinais nos nociceptores. Estímulos químicos, mecânicos ou térmicos são capazes de ativar seus receptores periféricos específicos ocasionando um influxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente despolarização nervosa periférica. O potencial gerado pelo estímulo nociceptivo leva à formação de um potencial de ação se o limiar do canal de  $\text{Na}^+$  regulado por voltagem for alcançado.

O neurônio aferente primário é pseudounipolar onde um único axônio se bifurca em um ramo periférico e um ramo central. Os corpos celulares desses neurônios ficam localizados no sistema nervoso periférico (SNP) na raiz posterior ou nos gânglios trigêmeos. O axônio periférico se ramifica em fibras terminais na pele, músculos, tendões ou articulações. Cada fibra terminal é responsável pela formação de um receptor somatossensorial de dor (nociceptores). Em contrapartida, o axônio central é direcionado para o SNC para promover sinapses em neurônios nociceptivos de segunda ordem (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

As fibras periféricas somatossensoriais são divididas em três grupos. O primeiro grupo é composto pelas fibras A- $\alpha$ , A- $\beta$  e A- $\gamma$ . Estas são mielinizadas e, portanto, a condução nervosa é rápida. Estão envolvidas no toque e na propriocepção e não desempenham papel na percepção nociva. O segundo grupo corresponde às fibras A- $\delta$  que são pequenas e condutoras lentas, quando comparadas às fibras descritas anteriormente, além de serem envolvidas geralmente em situações de dor aguda. Estas são ainda subdivididas em dois grupos. Algumas possuem alto limiar de excitabilidade e por isso respondem apenas a estímulos mecânicos intensos e outras também possuem resposta ao calor em temperaturas nocivas e não nocivas. O terceiro grupo é composto pelas fibras C que são pequenas, não apresentam mielina e, portanto, apresentam condução muito lenta e

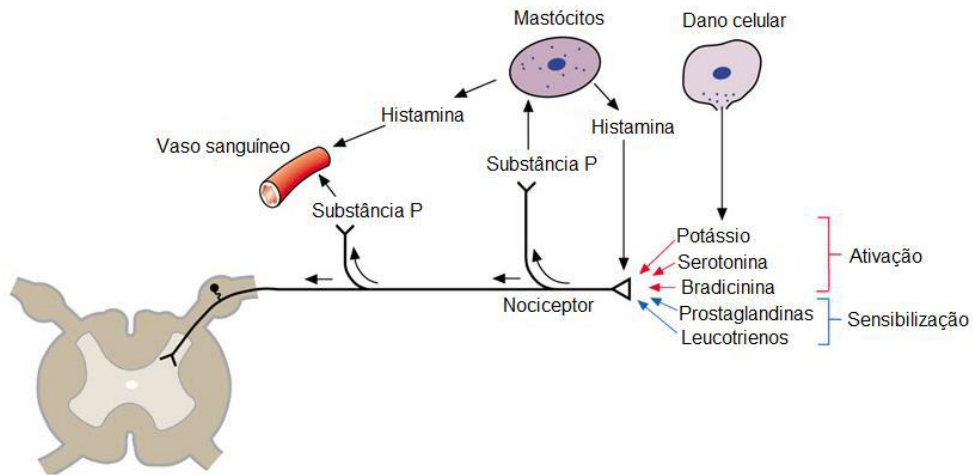
estão envolvidas, em sua grande maioria, na percepção da dor (DINAKAR; STILLMAN, 2016).

Os nociceptores apresentam canais iônicos que promovem a transdução de estímulos para a geração de potenciais de ação, além de apresentarem receptores para mediadores inflamatórios e outras moléculas. Estes receptores são canais iônicos ou ativam segundos mensageiros para que influenciem a atividade do canal. A manutenção da dor pode ocorrer quando existir uma regulação positiva dos receptores excitatórios através de um processo de sensibilização por estímulos nocivos contínuos ou condições inflamatórias persistentes (SCHAIBLE, 2006). Um exemplo é o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) que possui papel fundamental na função dos neurônios sensoriais da fibra C. A percepção central ocasionada pela excitação dos neurônios sensoriais primários é consequência do aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  que pode ser induzido por diferentes classes de ativadores como pH baixo, calor nocivo, mediadores lipídicos endógenos e vanilóides naturais (LEE et al., 2019).

A nocicepção é mediada por mensageiros moleculares intracelulares e extracelulares. Os nociceptores, quando ativados, transmitem as informações via neurotransmissor excitatório glutamato. A ativação do nociceptor também é estimulada por uma série de mediadores inflamatórios que são secretados no local da lesão (Figura 2). Esses mediadores são produtos químicos como, por exemplo, bradicinina e outros peptídeos, alguns neurotransmissores como serotonina, lipídeos como as prostaglandinas e algumas neurotrofinas, como o fator de crescimento neuronal (NGF). Essas moléculas são capazes de excitar os nociceptores ou diminuir o limiar de ativação destes e, com isso, ocorre a transmissão dos sinais aferentes ao corno dorsal da medula espinhal. Também são responsáveis pelo processo de inflamação neurogênica que é caracterizado pelo evento em que os próprios nociceptores ativados liberam neurotransmissores – substância P – do terminal periférico e, com isso, pode ocorrer vasodilatação e um aumento da permeabilidade vascular, o que permite o extravasamento de proteínas e fluidos para o espaço extracelular próximo ao terminal periférico do nociceptor; e, por fim, podem ainda ocorrer a estimulação das células imunológicas que acabam contribuindo para o processo inflamatório. Todas essas alterações neuroquímicas contribuem para a ativação das fibras aferentes primárias (GARLAND, 2012; APKARIAN et al., 2005).



Outras substâncias também contribuem para a ativação dos nociceptores. Essas substâncias são geralmente liberadas em casos de danos teciduais, são elas: globulina, proteína quinase, acetilcolina, serotonina, trifosfato de adenosina, ácido araquidônico que, quando metabolizado, gera prostaglandinas que são capazes de bloquear o efluxo de potássio do nociceptor e este último torna-se mais sensível. A histamina também é liberada após estimulação dos mastócitos e possui papel na inflamação e no processo de dor, assim como ocorre a liberação do NGF que se liga em seus receptores na membrana dos nociceptores (TrKa), além da liberação da substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (DINAKAR; STILLMAN, 2016).



Fonte: Adaptado de Bear et al. (2002).

Figura 2. Ativação e sensibilização dos nociceptores através de mediadores inflamatórios.

### 1.3 Mecanismos centrais da nocicepção

Através do gânglio da raiz dorsal (DRG) os potenciais de ação, com frequência proporcional à intensidade do estímulo, são propagados ao longo dos axônios das fibras nociceptivas com destino aos terminais do axônio no corno dorsal da medula espinhal (Figura 3). As fibras A- $\delta$  são responsáveis pela transmissão da “primeira dor” que é caracterizada por ser rápida e bem localizada, enquanto a fibra C transmite a “segunda” dor que é caracterizada por ser lenta e mal localizada (WOLLER et al., 2017).

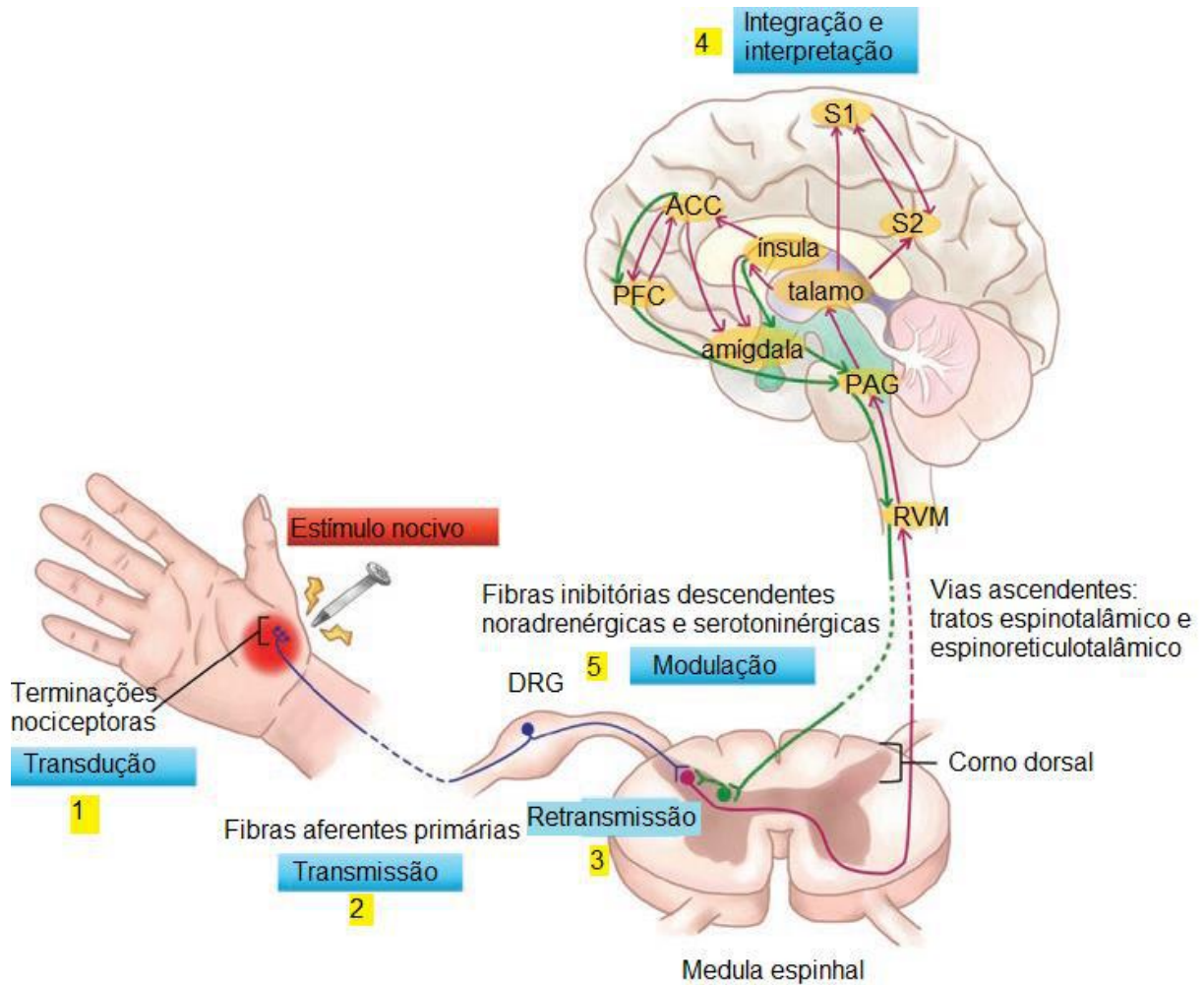
As fibras nervosas aferentes primárias possuem projeção no corno dorsal da medula espinhal que, por sua vez, é organizada anatomicamente e eletrofisiologicamente em lâminas. Os nociceptores A- $\delta$  projetam-se para a lâmina I e

para o corno dorsal mais profundo, a lâmina V. As fibras A- $\alpha$ , A- $\beta$  e A- $\gamma$ , que correspondem ao toque leve, projetam-se nas lâminas profundas: III, IV e V. Por outro lado, as fibras C projetam-se nas lâminas superficiais I e II (BASBAUM et al., 2009).

Os neurônios de segunda ordem da lâmina I, localizados na medula espinhal superficial, são considerados como neurônios nociceptivos específicos, pois recebem sinalização de alto limiar. O outro grupo de neurônios de segunda ordem, localizados mais profundamente, ou seja, na lâmina V, recebem sinalizações de baixo limiar (fibras A) e alto limiar (fibras A- $\delta$  e C) (WOLLER et al., 2018).

A principal saída do corno dorsal da medula espinhal para o cérebro é realizada através dos neurônios que possuem projeção nas lâminas I e V após serem ativados pela liberação de glutamato. Estes neurônios são localizados na origem de múltiplas vias ascendentes onde inclui os tratos espinotalâmico e espinoreticulotalâmico. Ambos transmitem mensagens de dor, porém o primeiro transmite para o tálamo, e é relevante para os aspectos discriminatórios sensoriais da experiência da dor, e o segundo para o tronco cerebral, apresentando relevância para dores pouco localizadas. As projeções da medula espinhal para a região parabraquial também possuem alta relevância, pois ocorre uma conexão rápida dessa região com a amígdala que é importante no processamento de reações aversivas da experiência da dor (BASBAUM; JESSELL, 2000; WOLLER et al., 2017).

Não existe uma área exclusiva cerebral que seja essencial para a dor, pois esta resulta da ativação de diversas estruturas, sendo algumas relacionadas às propriedades sensoriais-discriminativas como, por exemplo, o córtex somatossensorial, e outras relacionadas aos aspectos emocionais como o giro cingulado anterior e o córtex insular. Ainda ocorre ativação de áreas corticais pré-frontais e dos gânglios da base e cerebelo (regiões que geralmente não estão associadas ao processamento da dor). A partir do tronco cerebral e dos locos talâmicos as informações chegam às estruturas corticais (APKARIAN et al., 2005; BASBAUM et al., 2009).



Fonte: Adaptado de MARTIN (2018).

Figura 3. Mecanismos periféricos e centrais da nocicepção (cortex cingulado anterior (ACC), gânglio da raiz dorsal (DRG), substância cinzenta periaquedutal (PAG), cortex pré-frontal (PFC), medula rostral-ventromedial (RVM), cortex somatossensorial primário (S1), cortex somatossensorial secundário (S2).

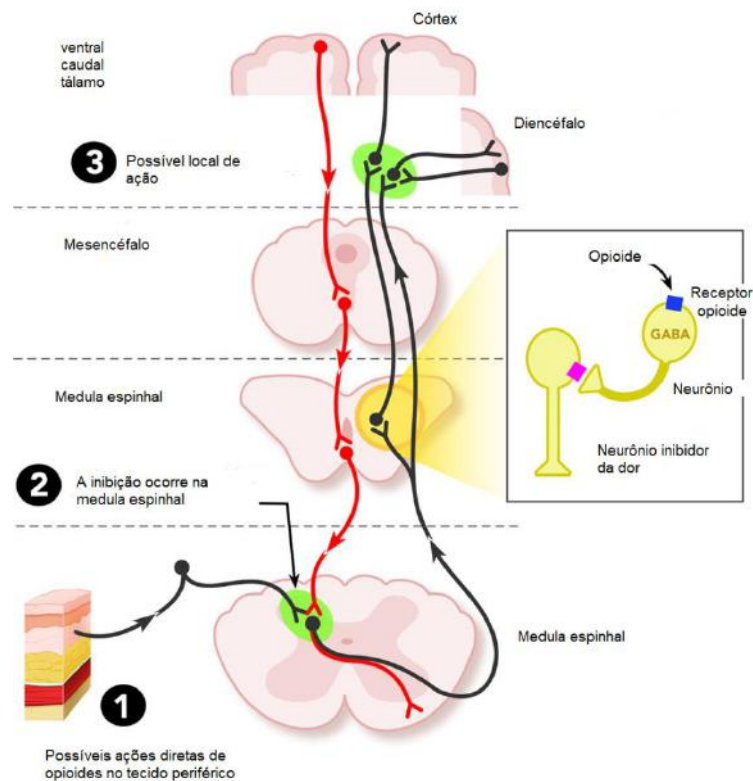
#### 1.4 Mecanismos de modulação da dor

A dor é modulada por um circuito modulador da dor descendente que surge em várias áreas como o hipotálamo, a amígdala e o cortex cingulado anterior rostral (rACC) e então “alimenta” a região cinzenta periaquedutal (PAG) – região localizada no interior do tegmento do mesencéfalo que é responsável pela ativação do sistema inibitório endógeno da dor através da ação de neurotransmissores como serotonina e noradrenalina – e, por fim, chega à medula espinhal. Foi demonstrado que neurônios localizados no núcleo magno da rafe e núcleo reticular gigantocelular projetam-se para os cornos dorsais espinhais e assim contribuem para uma melhora

de forma direta ou indireta na experiência da dor por modularem o tráfego nociceptivo (Figura 3) (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; STEEDS, 2009).

A via descendente que se origina na PAG se projeta para o corno dorsal da medula espinhal através da medula rostral-ventromedial (RVM). A ativação deste sistema acarreta em analgesia pela inibição da transmissão nociceptiva ascendente em nível da medula espinhal (BASBAUM; FIELDS, 1984).

O sistema opioide tem grande relevância na modulação do comportamento da dor. Até o momento, quatro diferentes receptores opioides foram caracterizados, sendo eles Mu ( $\mu$ ), Delta ( $\delta$ ), Kappa ( $\kappa$ ) e receptor opioide tipo-1 (ORL1) (DHAWAN et al., 1996; AL-HASANI; BRUCHAS, 2011). Esses receptores estão presentes nas vias descendentes da dor que incluem o *locus coeruleus* e a PAG, mas também são expressos nas estruturas corticais, límbica e mesencéfalo (Figura 4) (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011). Todos os receptores opioides são acoplados à proteína G, sendo ativados em condições naturais pelos opioides endógenos, sendo eles  $\beta$ -endorfina, encefalinas e dinorfinas (LAW; WONG; LOH, 2000). Os peptídeos encefalinas e dinorfinas também são capazes de inibir pré-sinápticamente a liberação de glutamato, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a substância P através da ativação dos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  presentes nos neurônios aferentes nociceptivos primários (Figura 5) (DREWS, 2006).

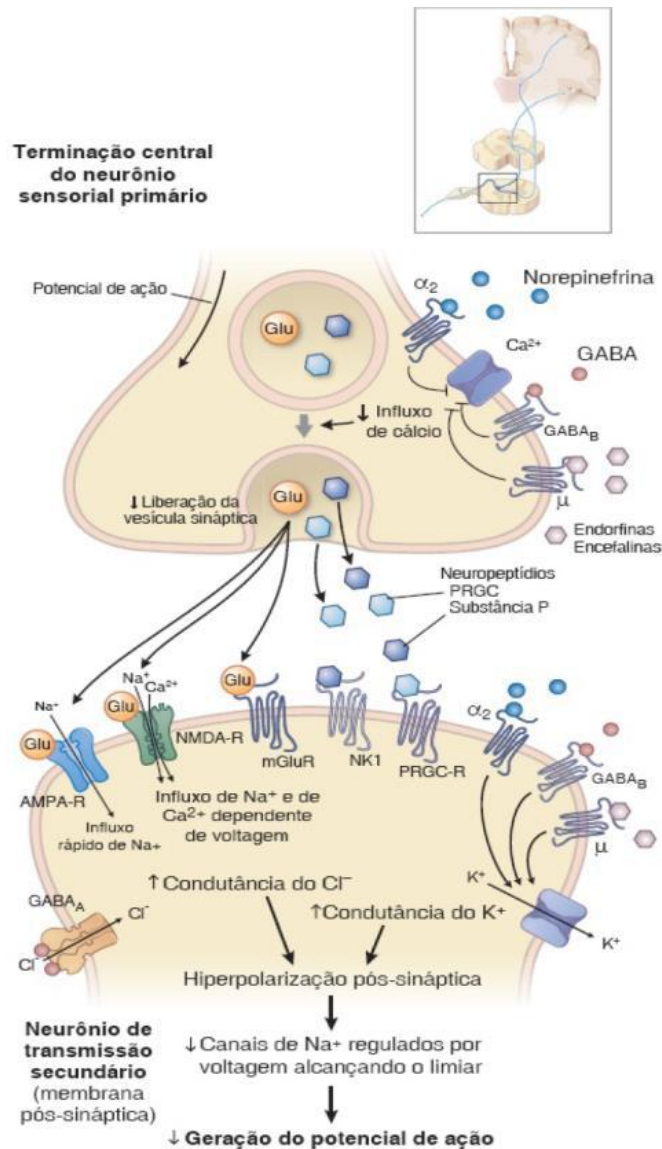


Fonte: Adaptado de Al-Hasani e Bruchas, 2011.

Figura 4. Locais de ação dos opioides (em preto a transmissão da dor da periferia para o SNC e em vermelho a via de modulação descendente da dor pelos opioides).

Os neurônios GABAérgicos, presentes na PAG e na RVM, liberam o neurotransmissor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que age em seus receptores causando uma inibição dos neurônios que se projetam para a medula espinhal (Figura 4) (LAU; VAUGHAN, 2014). Esta inibição GABAérgica também está presente na via ascendente, tanto em nível pré-sináptico como em nível pós-sináptico; sendo a primeira através da redução da atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem, e segunda, mediada pelo aumento do influxo de  $Cl^-$  e aumento do efluxo de  $K^+$  (Figura 5) (GRIFFIN; WOOLF, 2014).

Além disso, a norepinefrina, através do receptor  $\alpha_2$ , por serem expressos nas membranas pré e pós-sinápticas, quando ativados pela norepinefrina espinal, promovem a redução da liberação das vesículas pré-sinápticas (inibindo os canais de  $Ca^{2+}$ ) e diminuição da excitação pós-sináptica (abrindo dos canais de  $K^+$ ) (Figura 5) (GRIFFIN; WOOLF, 2014).



Fonte: GRIFFIN; WOOLF, 2014.

Figura 5. Regulação inibitória pelos receptores opioide, GABAérgico e noradrenérgico na via ascendente de dor. (Receptor adrenérgico  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ ), Receptor opioide Mi ( $\mu$ ), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), Proteína relacionada ao gene da calcitonina (PRGC), Glutamato (Glu), Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA-R), Receptor N-metil D-aspartato (NMDA-R), Receptor metabotrópico de glutamato (mGluR), Receptor da neurocinina-1 (NK1), Receptor da proteína relacionada ao gene da calcitonina (PRGC-R).

### 1.5 O processo inflamatório na condução da dor

O processo inflamatório pode ser capaz de sensibilizar os nociceptores fazendo com que seu limiar de ativação seja menor e responsivo até mesmo para estímulos leves e normalmente inócuos (Figura 2). Essa sensibilização depende de mediadores inflamatórios que são capazes de alterar propriedades de resposta dos canais iônicos por ativação de segundos mensageiros. Esta sensibilização periférica

tem como consequência uma hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos no SNC (sensibilização central) ocasionando características fisiopatológicas da dor nociceptiva, sendo elas a alodinia e hiperalgesia (GOLD; GEBHART, 2010; SCHAIBLE; RICHTER, 2004; SCHAIBLE; EBERSBERGER; NATURA, 2011).

No terminal sensorial do nociceptor podem existir classes de receptores específicos para determinados mediadores inflamatórios. Os mediadores bradicinina e prostaglandinas, por exemplo, são capazes de ativar e sensibilizar, respectivamente, os nociceptores em minutos. A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) atua nos receptores de prostaglandinas E, sendo este acoplado à proteína G, e ativa a proteína quinase A que tem como consequência a fosforilação dos receptores TRPV1 assim como também é capaz de sensibilizar o canal de Na<sup>+</sup> dependente de voltagem. Sendo assim, inibidores da síntese de prostaglandinas atuam na redução da sensibilização nociceptiva periférica (SCHAIBLE; EBERSBERGER; NATURA, 2011).

As citocinas, por sua vez, podem atuar regulando a expressão dos receptores, assim como induzindo a sua excitabilidade. Este fato torna-se importante já que na fase aguda da inflamação os macrófagos, que quando ativados produzem citocinas, podem influenciar diretamente os corpos celulares dos neurônios, pois podem alcançar o DRG dos seguimentos responsáveis em inervar o tecido inflamado (SCHAIBLE et al., 2010; UÇEYLER; SCHÄFFERS; SOMMER, 2009).

Em relação ao desenvolvimento dos nociceptores e manutenção de sua integridade estrutural e funcional, é essencial a presença do NGF que atua em receptores do tipo tirosina quinase. Durante o processo inflamatório vários tipos de células podem produzir quantidades significativas de NGF e, por consequência, ocorre uma redução do limiar de ativação térmica dos canais TRPV1. Além disso, uma exposição prolongada à NGF pode aumentar a expressão de TRPV1, receptores de bradicinina, substância P e receptores purinérgicos ativados por ATP (P2X), por exemplo. O NGF também é capaz de estimular as células inflamatórias a liberar substâncias com potencial inflamatório (LANE et al., 2010; BENNETT, 2007; STEIN et al., 2009).

## **1.6 Problemáticas em relação à terapia farmacológica da dor e inflamação**

A cada ano, milhões de pessoas sofrem com a dor aguda resultante de traumas, condições patológicas e procedimentos cirúrgicos. Estima-se que a cada 5 indivíduos adultos, 1 sofra de dor aguda (GOLDBERG; MACGEE, 2011). O tratamento adequado da dor aguda é essencial para manutenção da qualidade de vida do paciente, redução do risco de complicações e de desenvolvimento de dor crônica (SINATRA, 2010; REARDON et al., 2015). O arsenal terapêutico para o controle da dor inclui analgésicos simples (dipirona e paracetamol), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), analgésicos opioides e fármacos adjuvantes (Tabela 1) (WALK; POLIAK-TUNIS, 2016).

A elevada prevalência da dor acarreta em um alto consumo destes fármacos pela população. Entre os dez medicamentos mais vendidos no Brasil em 2018, três são analgésicos e/ou anti-inflamatórios (GUIA INTERFARMA, 2019). Além disso, segundo Krawczyk et al. (2018), entre os anos de 2009 e 2015 houve um aumento de 465% nas prescrições médicas de opioides no Brasil. No entanto, uma proporção significativa dos pacientes não obtém o controle adequado da dor, o que está relacionado a diferentes fatores, como protocolos terapêuticos inadequados e o balanço desfavorável entre eficácia e tolerabilidade dos medicamentos disponíveis (GARCIA et al., 2017; SINATRA, 2010).

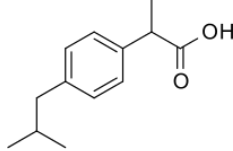
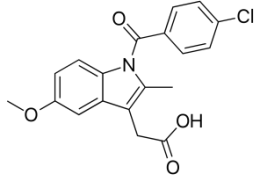
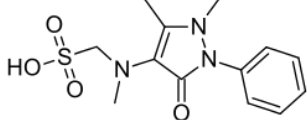
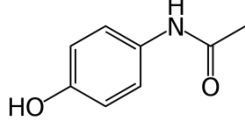
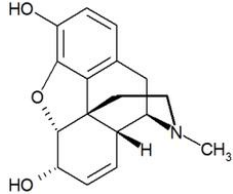
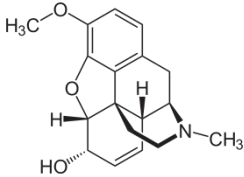
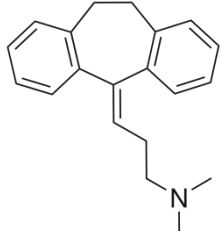
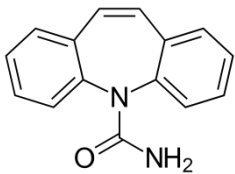
Os analgésicos simples e os AINEs são os medicamentos de escolha nos casos de dor leve a moderada. Os AINEs são amplamente utilizados devido às suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e antitérmica. Porém, estão associados a uma gama de efeitos adversos, como distúrbios gastrintestinais, inibição da função plaquetária e reações de hipersensibilidade. Além disso, apresentam alto potencial de interações medicamentosas (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012). Os analgésicos simples, por sua vez, podem apresentar grandes riscos ao paciente. A dipirona, por exemplo, pode apresentar interações medicamentosas com imunossupressores, potencial hepatotóxico sendo alguns casos relatados de lesão hepática letal, hipotensão, arritmia, broncoespasmo, erupção cutânea etc. Além disso, também é relatada a indução de agranulocitose que confere sérios riscos ao paciente (KÖTTER et al., 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2018; LUTZ, 2019). Em relação ao paracetamol, analgésico mais usado no mundo, é bem descrito a sua atividade hepatotóxica sendo uma causa bem comum de lesão hepática aguda em países desenvolvidos (CHIEW et al., 2018)



Os analgésicos opioides são preferíveis para os casos de dor moderada a severa, têm sua utilização limitada pelos efeitos adversos como náuseas, vômitos e constipação, além do potencial para a dependência e uso abusivo (YAKSH; WALLACE, 2012; KOOB; BLOOM, 1988; PATTINSON, 2008).

Dessa forma, a área de desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios/analgésicos ainda precisa ser bastante explorada.

Tabela 1. Exemplos de fármacos que fazem parte do arsenal terapêutico para controle da dor.

Classe terapêutica	Exemplos de fármacos	Estrutura química
AINEs	Ibuprofeno	
	Indometacina	
Analgésicos simples	Dipirona	
	Paracetamol	
Opioides	Morfina	
	Codeína	
Fármacos adjuvantes (antidepressivo, anticonvulsivante, etc.)	Amitriptilina	
	Carbamazepina	

## 1.7 Chalconas

As chalconas constituem um grupo de produtos naturais com diferentes atividades farmacológicas, dentre elas ação antidiabética, anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, psicoativa e neuroprotetora (SALEHI et al., 2020). Estas substâncias pertencem à classe dos flavonóides, formando uma subclasse, e apresentam uma estrutura básica de 1,3-difenil-2-propen-1-ona (Figura 6) (DEWICK, 2009). Nessa classe, o núcleo A é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o B com números ordinários; seguindo a lógica de numeração das acetofenonas e não da maioria dos flavonóides (SIMÕES et al., 2017).

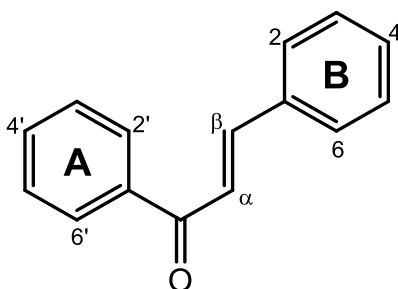


Figura 6. Estrutura química das chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona).

Inúmeras técnicas têm sido descritas para síntese de chalconas, dentre estas se destaca o método de Claisen-Schmidt, que consiste na reação de uma acetofenona com um aldeído aromático (Figura 7) (BUKHARI; JASAMI; JANTAN, 2012).

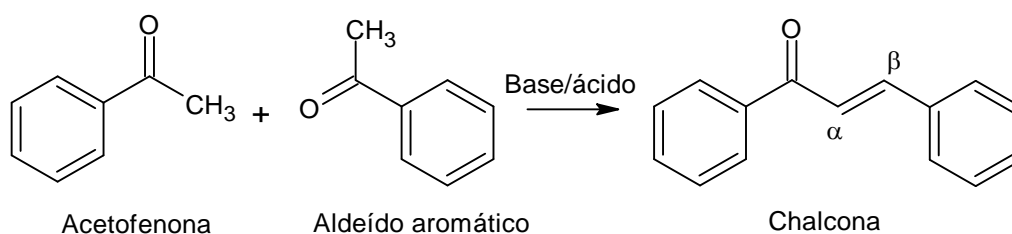


Figura 7. Reação de Claisen-Schmidt.

Muitas chalconas e seus derivados sintéticos possuem a capacidade de inibir as principais vias pró-inflamatórias, e apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (CORRÊA et al., 2001; ROJAS et al. 2002; WON et al., 2005;

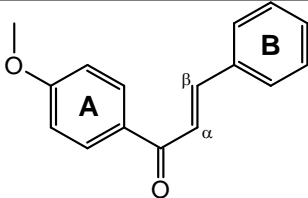
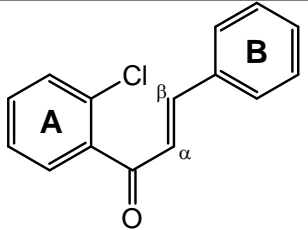
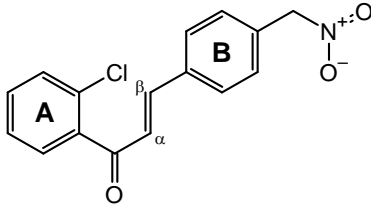
MOHAMAD et al., 2010; JANTAN et al., 2014; ISMAIL et al., 2016; STAURENGO-FERRARI et al., 2018; UR RACHID et al., 2019).

Verificou-se que estas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas de um grupo de chalconas e seus derivados possuem relação com a inibição da síntese de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas e, portanto, se tornam foco de estudo para direcionamento de novas moléculas potenciais a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (HEIDARI et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando uma série de chalconas substituídas quanto ao seu potencial anti-inflamatório *in vitro* através da avaliação dos seus efeitos imunomoduladores em linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Neste estudo, foi observado que as chalconas LC24, LC31 e LC41 (Tabela 2) apresentaram uma inibição da produção de NO, apresentando valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) de 21,3 ± 4,5; 8,4 ± 6,8 e 11,2 ± 5,0 µM, respectivamente. Além disso, as chalconas LC24 e LC41 foram capazes de inibir fortemente a produção de TNF-α, com valores de IC<sub>50</sub> de 78,8 ± 6,5 e 68,54 ± 3,3 µM, respectivamente, e interleucina 1 beta (IL-1β), com valores de IC<sub>50</sub> de 56,6 ± 3,5 e 13,5 ± 3,9 µM, respectivamente. A LC31 teve destaque para seu perfil de atividade reduzindo a produção de PGE<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> de 10,2 ± 0,5 µM), e redução na expressão das enzimas óxido nítrico induzível (iNOS) e ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) quando testada nas concentrações de 4 e 20 µg/mL. Todas essas chalconas apresentaram ausência de citotoxicidade.

Desta forma, as chalconas LC24, LC31 e LC41 foram selecionadas para investigação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo*.

Tabela 2. Estruturas químicas das chalconas LC24, LC31 e LC41.

Chalcona	Estrutura química
LC24	
LC31	
LC41	

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente não existe uma terapia que sirva como modelo de sucesso para todas as condições de dor, pois o fenômeno doloroso é complexo e possui diferentes mecanismos fisiopatológicos que acabam dificultando a identificação de alvos terapêuticos que sejam eficientes em todas as condições de dor. Além disso, ainda há a baixa previsibilidade dos ensaios pré-clínicos e baixa sensibilidade dos ensaios clínicos o que acarreta em abandono prematuro de compostos ou alvos promissores para o tratamento da dor (VARDEH; MANNION; WOOLF, 2016; WOOLF, 2010; ANDREWS ET AL., 2016; SINGLA ET AL., 2015).

Associado a isto, a terapia medicamentosa para a dor e inflamação, como já descrita anteriormente, apresenta muitos efeitos adversos importantes que podem ser prejudiciais ao indivíduo ou mesmo agravar sua condição clínica.

Tendo em vista estes aspectos, a terapia medicamentosa da dor ainda precisa ser melhorada, o que inclui estratégias como a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com melhor perfil de eficácia e segurança. Sendo assim as chalconas se tornam um ótimo alvo de estudo devido as suas atividades anti-

inflamatórias e antinociceptivas descritas na literatura; e tendo em vista que as chalconas selecionadas nunca foram estudadas sob esse prisma.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O objetivo do presente trabalho foi estudar o potencial farmacológico das chalconas sintéticas substituídas 24 (LC24), 31 (LC31) e 41 (LC41) (Tabela 3) visando nestas à identificação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos de dor aguda em camundongos suíços.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de LC24, LC31 e LC41 em protocolo de dor de origens neurogênica e inflamatória através do teste da formalina;
- Avaliar o efeito antinociceptivo por ação central das chalconas LC24, LC31 e LC41 através de estímulo térmico por meio do teste da placa quente;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório das chalconas sintéticas substituídas LC24, LC31 e LC41 utilizando o teste da placa quente modificada.

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Síntese das chalconas**

As chalconas foram sintetizadas pela equipe dos Laboratórios de Produtos Bioativos da UFRJ- campus Macaé e o de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos da UFRJ- Rio de Janeiro. A síntese ocorreu através da reação de Claisen-Schmidt entre aldeídos aromáticos apropriadamente substituídos com acetofenonas em etanol absoluto, a temperatura ambiente, na presença de KOH. As chalconas foram purificadas através de recristalização em etanol aquecido e caracterizadas conforme descrito previamente pela nossa equipe (VENTURA et al., 2015).

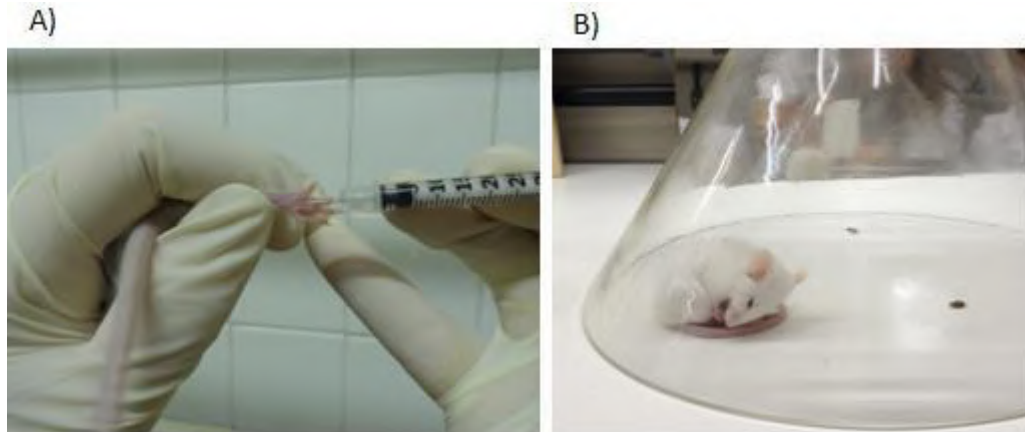
## 4.2 Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Instituto Macaé de Ciência e Tecnologia (IMCT). Foram utilizados camundongos suíços machos (18-25 g), mantidos no biotério do IMCT com temperatura e umidade controladas, em um ciclo de 12h/12h claro/escuro, e água e ração disponibilizadas sem restrição. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA da UFRJ/Macaé, sob protocolo MAC044.

As substâncias em teste foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), o controle indometacina foi solubilizado em salina e o controle morfina foi utilizado já na forma comercial diluída. O volume administrado nos animais foi padronizado em 30  $\mu$ L.

## 4.3 Teste da formalina

Neste teste os animais foram pré-tratados via intraperitoneal com o veículo (DMSO, grupo controle), a morfina (10 mg/kg, controle positivo), a indometacina (5 mg/kg, controle positivo) ou as chalconas LC24, LC31 ou LC41 nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg. Após 30 minutos, foi realizada a injeção intraplantar de 20  $\mu$ L de formalina (2,5%) na pata traseira direita do animal. Em seguida, foi cronometrado, em segundos, o tempo gasto do animal lambendo ou em agitação vigorosa da pata, durante 0-5 minutos (fase neurogênica), e durante 15-30 minutos (fase inflamatória) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A atividade antinociceptiva foi expressa como redução do tempo gasto do animal lambendo ou agitando a pata em relação ao grupo DMSO.



Fonte: (ERTHAL, 2016).

Figura 8. Modelo de dor aguda pelo teste da formalina. (A) Administração de intraplantar. (B) Observação do comportamento de lambedura e agitação da pata do camundongo.

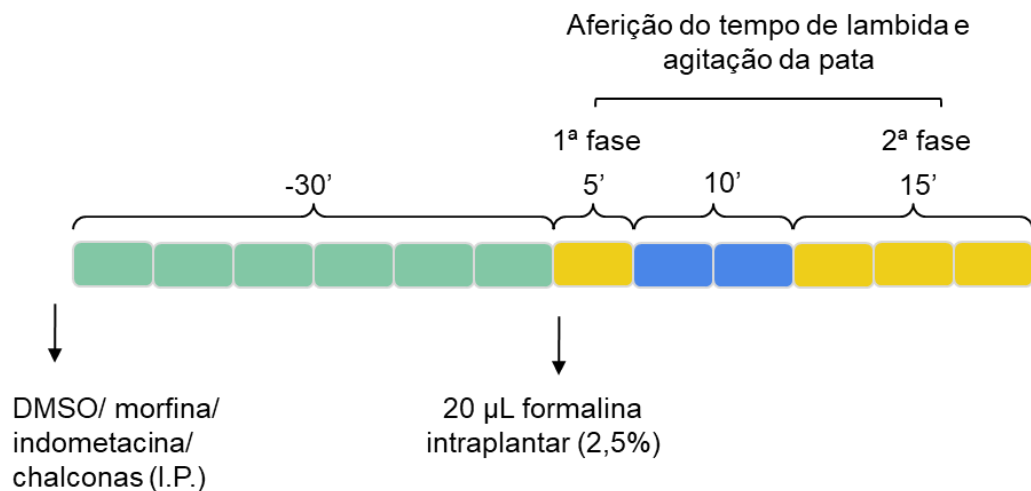


Figura 9. Protocolo experimental do teste da formalina.

#### 4.4 Teste da placa quente

Este modelo oferece como estímulo nociceptivo à temperatura. Os animais foram postos sobre a placa quente (Insight, modelo EFF-361), com a temperatura ajustada a  $54,0 \pm 0,5$  °C, e quando lambeiram, agitaram vigorosamente ou levantaram a pata foram retirados. O tempo para resposta nociceptiva foi cronometrado em segundos. Após a primeira aferição, foram administrados o veículo DMSO (grupo controle), morfina (10 mg/kg, controle positivo) ou as chalconas LC24 (10, 30 e 60 mg/kg), LC31 (30 mg/kg) e LC41 (60 mg/kg) por via intraperitoneal e, as próximas aferições de tempo de latência foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e



120 minutos (SILVA et al., 2013). Foi estipulado um tempo máximo de permanência na placa de 30 s, a fim de evitar lesões teciduais.



Fonte: (MELLO, 2017).

Figura 10. Placa quente (Insight, modelo EFF-361) usada para avaliação de efeito antinociceptivo central.

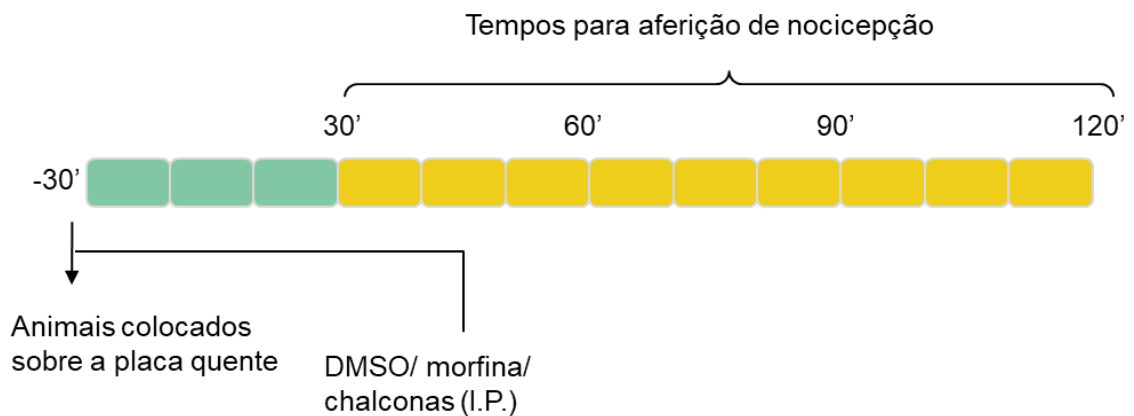


Figura 11. Protocolo experimental do teste da placa quente.

#### 4.5 Teste da placa quente modificado

O objetivo desse teste é avaliar e mensurar a nociceção inflamatória induzida pela substância carragenina (LAVICH et al., 2005). Foram administradas LC24 (60 mg/kg) e LC41 (10, 30 e 60 mg/kg) via intraperitoneal, assim como o

DMSO (grupo controle) e indometacina (4 mg/kg; controle positivo). Após o período de 30 minutos, foram administrados 500 µg/50 µL de carragenina na pata esquerda traseira e 50 µL de salina 0,9% na pata traseira direita. Após 15 minutos, os animais foram colocados sobre a placa quente (Insight, modelo EFF-361) aquecida a 51°C e o tempo para resposta de agitação e/ou elevação das patas traseiras foi contabilizado. As aferições posteriores foram nos tempos de 60, 180 e 360 minutos. Por fim, foi calculada a diferença dos tempos de latência entre as patas. O tempo máximo estabelecido para a permanência do animal sobre a placa foi de 25 s, com o objetivo de evitar lesão tecidual (LAVICH et al., 2005).

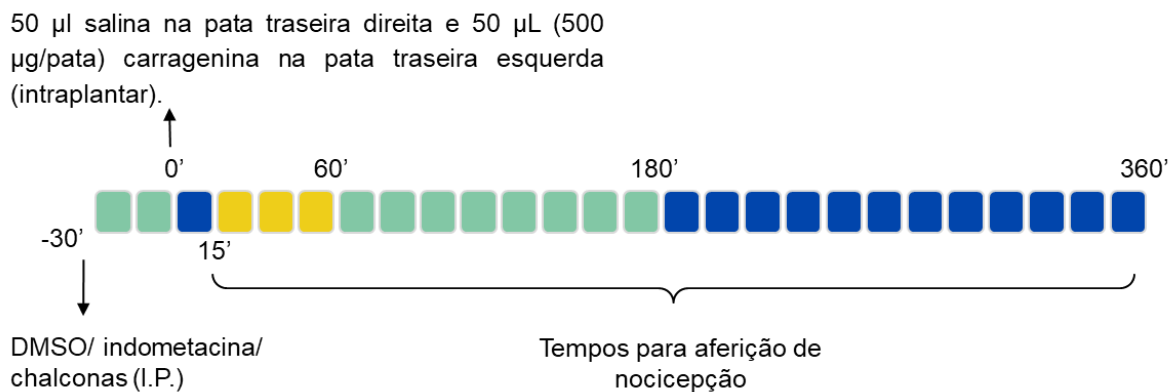


Figura 12. Protocolo experimental do teste da placa quente modificado

## 4.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 animais por grupo experimental. Para análise estatística foi usada análise de variância simples (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism versão 5.0 e as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTE DA FORMALINA

No teste da formalina, o controle positivo morfina foi capaz de reduzir o tempo de lambida das patas em ambas as fases, e o controle positivo indometacina foi

capaz de inibir apenas a 2ª fase. A LC24 apresentou resultado significativo na 1ª fase do teste em todas as doses testadas (10, 30 e 60 mg/kg), reduzindo o tempo de lambida da pata de  $60,3 \pm 4,9$  s (DMSO) para  $38,9 \pm 4,1$ ,  $28,1 \pm 3,4$ , e  $35,0 \pm 5,5$  s ( $P < 0,05$ ), respectivamente (Figura 13A). Na dose de 60 mg/kg apresentou efeito significativo na 2ª fase do teste, reduzindo o tempo de lambida da pata de  $361,6 \pm 17,8$  s (DMSO) para  $271,2 \pm 13,1$  s ( $P < 0,05$ ) (Figura 13B).

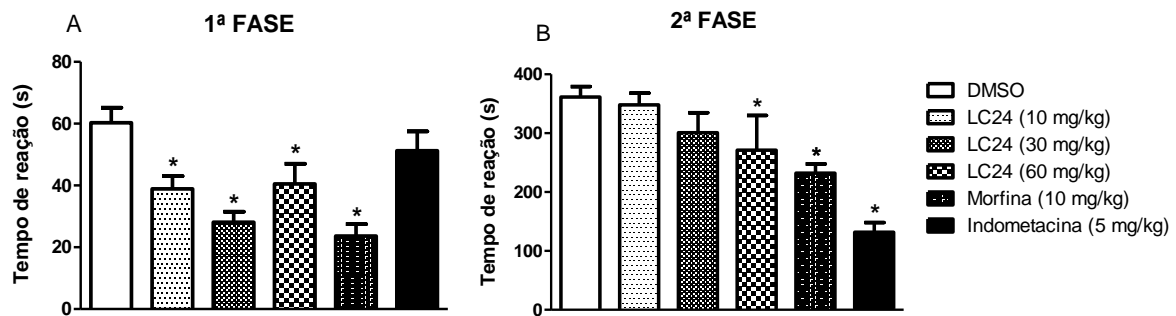


Figura 13. Efeito da LC24 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e na 2ª (B) fases do teste da formalina. (\* $P < 0,05$  vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls;  $n = 6-8$ ).

A chalcona LC31 apresentou efeito na primeira fase do teste, com a dose de 30 mg/kg, reduzindo o tempo de lambida da pata de  $60,3 \pm 4,9$  s (DMSO) para  $34,8 \pm 5,4$  s ( $P < 0,05$ ) (Figura 14A). Entretanto, não teve efeito na fase inflamatória do teste (Figura 14B).

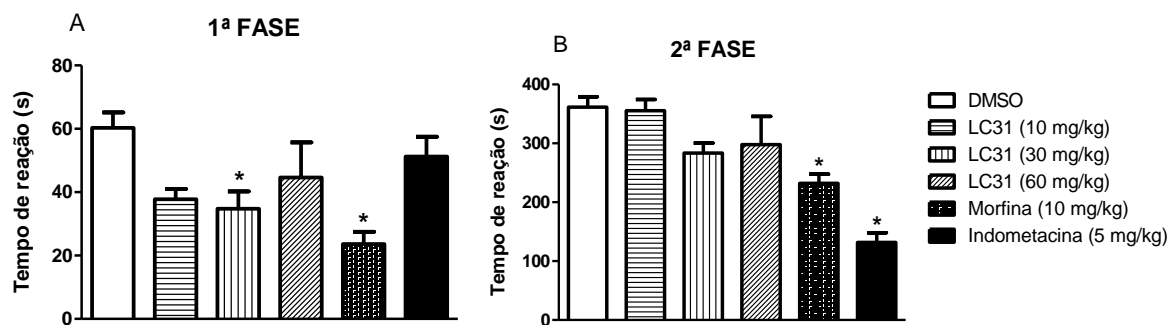


Figura 14. Efeito da LC31 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e na 2ª (B) fases do teste da formalina. (\* $P < 0,05$  vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls;  $n = 6-8$ ).

Já a LC41 apresentou efeito na 1ª fase do teste da formalina apenas na dose de 60 mg/kg (Figura 15A), reduzindo o tempo de lambida da pata de  $60,3 \pm 4,9$  s (DMSO) para  $36,5 \pm 5,6$  s ( $P < 0,05$ ). Na 2ª fase do teste, a LC41 apresentou efeito significativo em todas as doses testadas (10, 30 e 60 mg/kg), reduzindo o tempo de

lambida da pata de  $361,6 \pm 17,8$  s (DMSO) para  $280,2 \pm 23,9$ ,  $232,4 \pm 24,8$  e  $285,1 \pm 23,4$  s ( $P < 0,05$ ), respectivamente (Figura 15B).

Logo, a atividade antinociceptiva das chalconas LC24 e LC41 pode envolver mecanismos centrais e anti-inflamatórios e a atividade antinociceptiva da LC31 pode envolver mecanismos centrais.

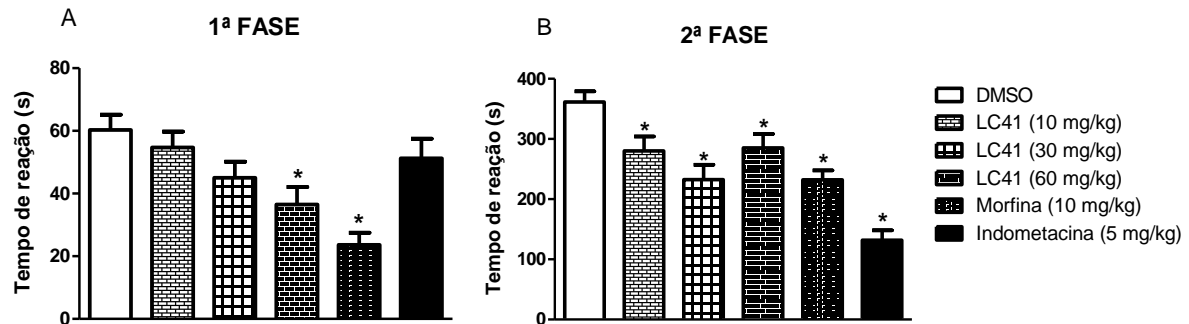


Figura 15. Efeito da LC41 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg na 1ª (A) e na 2ª (B) fases (B) do teste da formalina. (\* $P < 0,05$  vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls;  $n = 6-8$ ).

## 5.2 TESTE DA PLACA QUENTE

Como as três chalconas testadas mostraram resultados significativos na fase neurogênica do teste da formalina, todas foram avaliadas no teste da placa quente, o qual avalia a atividade antinociceptiva central através do estímulo térmico. Neste modelo apenas analgésicos de efeito central possuem a capacidade de aumentar o tempo de permanência na placa quente (SILVA et al., 2013).

A morfina (10 mg/kg) apresentou efeito significativo em todos os tempos de avaliação. Entretanto, as três chalconas testadas não foram capazes de aumentar o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3. Efeito da LC24 nas doses de 10; 30 e 60 mg/kg no teste da placa quente.

Grupos	Tempo de Latência (s)				
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
<b>DMSO</b>	8,4 ± 0,4	8,4 ± 0,7	10,5 ± 1,3	7,5 ± 0,9	9,4 ± 1,4
<b>LC24 (10 mg/kg)</b>	6,9 ± 0,5	6,3 ± 0,6	8,6 ± 0,7	6,9 ± 0,6	6,7 ± 0,4
<b>LC24 (30 mg/kg)</b>	7,4 ± 0,4	10,3 ± 1,6	9,6 ± 0,8	8,1 ± 0,4	8,3 ± 1,1
<b>LC24 (60 mg/kg)</b>	7,9 ± 0,7	9,1 ± 0,9	12,0 ± 1,1	8,6 ± 0,4	10,9 ± 0,8
<b>Morfina (10 mg/kg)</b>	10,6 ± 0,9	18,5 ± 2*	18,2 ± 2,2*	16,8 ± 2,4*	16,4 ± 1,7*

\*P<0,05 vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=6-8.

Tabela 4. Efeito da LC31 na dose de 30 mg/kg no teste da placa quente.

Grupos	Tempo de Latência (s)				
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
<b>DMSO</b>	8,4 ± 0,4	8,4 ± 0,7	10,5 ± 1,3	7,5 ± 0,9	9,4 ± 1,4
<b>LC31 (30 mg/kg)</b>	9,3 ± 0,6	8,4 ± 0,8	12,3 ± 0,9	9,9 ± 0,9	10,5 ± 1,1
<b>Morfina (10 mg/kg)</b>	10,6 ± 0,9	18,5 ± 2*	18,2 ± 2,2*	16,8 ± 2,4*	16,4 ± 1,7*

\*P<0,05 vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=6-8.

Tabela 5. Efeito da LC41 na dose de 60 mg/kg no teste da placa quente.

Grupos	Tempo de Latência (s)				
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
<b>DMSO</b>	8,4 ± 0,4	8,4 ± 0,7	10,5 ± 1,3	7,5 ± 0,9	9,4 ± 1,4
<b>LC41 (60 mg/kg)</b>	10,5 ± 0,9	11,9 ± 0,9	12,4 ± 0,9	10,2 ± 0,9	11,3 ± 0,7
<b>Morfina (10 mg/kg)</b>	10,6 ± 0,9	18,5 ± 2*	18,2 ± 2,2*	16,8 ± 2,4*	16,4 ± 1,7*

\*P<0,05 vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=6-8.

### 5.3 TESTE DA PLACA QUENTE MODIFICADO

As chalconas LC24 e LC41 foram testadas nesse modelo nas mesmas doses que apresentaram resultados significativos na 2ª fase do teste da formalina, a fase inflamatória. Como foi calculada a diferença entre as patas que receberam salina e carragenina, quanto menor essa diferença, maior o efeito antinociceptivo.

O controle indometacina reduziu a variação de latência em todos os tempos. As chalconas foram capazes de reduzir a variação de latência entre as patas dos animais, sendo o efeito significativo para a LC24 (60 mg/kg) nos tempos de 15, 60 e 180 minutos (Tabela 6); e para a LC41, nas doses de 30 e 60 mg/kg em todos os tempos de aferição do teste (Tabela 7).

Tabela 6. Efeito da LC24 na dose de 60 mg/kg no teste da placa quente modificado.

Grupos	Variação de Latência (s)			
	15 min.	60 min.	180 min.	360 min.
<b>DMSO</b>	4,7 ± 0,7	5,6 ± 0,7	4,2 ± 0,6	4,5 ± 0,6
<b>LC24 (60 mg/kg)</b>	1,5 ± 1,0*	1,0 ± 0,8*	0,3 ± 0,3*	2,9 ± 0,7
<b>Morfina (10 mg/kg)</b>	0,5 ± 0,2*	1,2 ± 0,6*	0,1 ± 0,1*	0,7 ± 0,6*

\*P<0,05 vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=6-8.

Tabela 7. Efeito da LC41 nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg no teste da placa quente modificado.

Grupos	Variação de Latência (s)			
	15 min.	60 min.	180 min.	360 min.
<b>DMSO</b>	4,7 ± 0,7	5,6 ± 0,7	4,2 ± 0,6	4,5 ± 0,6
<b>LC41 (10 mg/kg)</b>	0,0 ± 0,0*	3,7 ± 1,1	3,6 ± 1,5	3,0 ± 1,3
<b>LC41 (30 mg/kg)</b>	0,0 ± 0,0*	0,5 ± 0,3*	0,7 ± 0,5*	0,7 ± 0,5*
<b>LC41 (60 mg/kg)</b>	0,3 ± 0,2*	2,0 ± 0,5*	1,5 ± 0,9*	1,4 ± 0,9*
<b>Morfina (10 mg/kg)</b>	0,5 ± 0,2*	1,2 ± 0,6*	0,1 ± 0,1*	0,7 ± 0,6*

\*P<0,05 vs. DMSO, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=6-8.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram testadas as chalconas LC24 (4'-metoxichalcona), LC31 (2'-clorochalcona) e LC41 (4-nitro-2'-clorochalcona), cujas atividades anti-inflamatórias *in vitro* já haviam sido descritas previamente (VENTURA et al., 2015).

O primeiro ensaio *in vivo* utilizado foi o teste da formalina, o qual é um modelo muito útil para o estudo de novas substâncias as quais se acredita que tenham atividade nos mecanismos centrais, neurogênicos e inflamatórios da nocicepção (NOBRE et al., 2013; TJOLSEN, 1997). Este teste apresenta um padrão bifásico de resposta nociceptiva. A 1ª fase é caracterizada por uma resposta desencadeada pela ativação direta de nociceptores, especialmente fibras C. Já a 2ª fase é caracterizada pelo processo inflamatório periférico através dos mediadores adenosina, bradicinina, histamina, prostaglandina e serotonina, além da sensibilização central (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; BANNON; MALMBERG, 2007; NGUYEN et al., 2020).

Ficou demonstrado que após administração de LC24, LC31 e LC41 houve uma diminuição da resposta nociceptiva na fase neurogênica do teste da formalina, o que poderia sugerir uma atividade antinociceptiva por ação central. Entretanto, o efeito antinociceptivo central das chalconas não foi confirmado no teste da placa

quente, que é um modelo referência para triagem de substâncias com potencial analgésico central através de mecanismos supraespinhais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; ISMAIL et al., 2016). Essa diferença de resposta nos dois ensaios provavelmente ocorreu devido a diferença no tipo de estímulo e dor causada, uma vez que a formalina é um estímulo químico causando uma dor tônica, enquanto na placa quente o estímulo é térmico e é um modelo de dor fásica (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Talvez em outro modelo de dor central e/ou periférico ou em protocolo de tratamento prolongado o efeito possa ser observado para essas chalconas. Alguns estudos comprovam a capacidade de precursores de flavonoides em atravessar a barreira hematoencefálica devido a sua lipofilicidade (DE BOER et al., 2005; KIEKOW et al., 2016); e no caso das chalconas, por apresentarem apenas dois anéis em sua estrutura, apresentam maior flexibilidade, diferente de outros compostos cíclicos que possuem três anéis que dificultam o acesso ao sistema nervoso central (KIEKOW et al., 2016).

Sabe-se que alguns mediadores inflamatórios, como serotonina e histamina ativam diretamente os nociceptores, enquanto outros, como prostaglandinas, leucotrienos e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), facilitam a transmissão dolorosa levando à hiperalgesia e à liberação de neurotransmissores excitatórios como o aspartato, glutamato e substância P (OLIVEIRA et al., 2011). Assim, apesar dos nociceptores serem ativados por estímulos de alto limiar, quando há inflamação estas fibras podem ser ativadas por estímulos de menor intensidade (PINHO-RIBEIRO; VERRI JR; CHIU, 2017).

As chalconas LC24 e LC41 também foram capazes de reduzir a resposta nociceptiva na fase inflamatória do teste da formalina. Esta atividade antinociceptiva por ação anti-inflamatória foi confirmada no teste da placa quente modificado, no qual a administração intraplantar do polissacarídeo sulfatado carragenina produz uma resposta bifásica, onde a formação do edema é resultado da produção de diversos mediadores inflamatórios. A primeira fase (até 150 minutos) é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, e a fase tardia (150 minutos em diante) é caracterizada pela produção aumentada de prostaglandinas (OGONOWSKI et al., 1997).

O estudo *in vitro* realizado previamente com as chalconas LC24, LC31 e LC41 corrobora a ação anti-inflamatória observada *in vivo*, uma vez que estas substâncias



foram capazes de inibir a produção de PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2 e NO em macrófagos ativados por LPS (VENTURA et al., 2015).

Fazendo uma análise de relação estrutura-atividade, de forma geral as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das chalconas são aumentadas com a introdução de substituintes no anel ligado diretamente à carbonila. A LC24 apresenta o substituinte metoxi na posição 4', sendo descrito na literatura que a presença do grupo metóxi em posição *para* (4') é capaz de aumentar a atividade anti-inflamatória por inibição da COX (BANO et al., 2013). A presença de grupos retiradores de elétrons no anel ligado diretamente à carbonila, como o substituinte cloro na posição 2' na LC41, está relacionado com o aumento do efeito antinociceptivo em modelos de dor aguda pelo teste da formalina e teste de contorções abdominais (CORRÊA et al., 2001). Além disso, também é atribuído ao grupamento nitro uma atividade complementar para inibição da COX-2 (BUKHARI et al., 2012), sendo este grupamento presente na LC41 na posição 4 do anel aromático ligado ao carbono beta da função olefínica.

A possibilidade de administração oral é uma característica desejável no desenvolvimento de novos candidatos à fármacos. E as chalconas com melhor perfil de efeitos, LC21 e LC41 não violaram nenhum dos quesitos da regra de Lipinski, indicando uma boa biodisponibilidade oral teórica (VENTURA et al., 2015). Desta forma, LC21 e LC41 podem ser consideradas interessantes candidatas ao desenvolvimento de novas terapias analgésicas.

## 7 CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se concluir que as chalconas LC24, LC31 e LC41 apresentaram efeito antinociceptivo *in vivo*, por mecanismos centrais quando a dor foi desencadeada por estímulo químico, mas não por estímulo térmico. Além disso, as chalconas LC24 e LC41 apresentaram efeito antinociceptivo por provável mecanismo de ação anti-inflamatória. A perspectiva futura desse trabalho será investigar a atividade da LC21 e LC41 em modelos de dor neuropática.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHILLES, A.; MOHRING, A.; DANNENBERG, L.; ZEUS, T.; KELM, M.; POLSIN, A. Analgesic medication with dipyron in patients with coronary artery disease: Relation to MACCE. **International Journal of Cardiology**, Amsterdã, v. 336, p. 76-81, 2017.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2011.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, Amsterda, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004.

ANDREWS, N. A. et al. Ensuring transparency and minimization of methodologic bias in preclinical pain research: PPRECISE considerations. **Pain**, Amsterdam, v. 157, n. 4, p. 901–909, abr. 2016.

ANWAR, K. Pathophysiology of pain. **Disease a Month**, Chicago, v. 62, n. 9, p. 324-329, 2016.

APKARIAN, A. V.; BUSHNELL, M. C.; TREEDE, R-D.; ZUBIETA, J-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, Londres, v. 9, n. 4, p. 463–463, 2005.

BALTIERI, D. A.; STRAIN, E. C.; DIAS, J. C.; SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; ANDRADE, A. G. D. Diretrizes para o tratamento de pacientes com síndrome de dependência de opióides no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 259-269, 2004.

BANNON, A. W.; MALMBERG, A. B. Models of Nociception: Hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, New York, v. 41, n. 1, p. 8.9.1 – 8.9.16, 2007.

BANO, S. JAVED, K.; AHMAD, S.; RATHISH, I. G.; SINGH, S.; CHAITANYA, M.; ARUNASREE, K. M.; ALAM, M. S. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 65, p. 51–59, 2013.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, Massachusetts, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 7, n. 1, p. 309–338, 1984.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. Perception of pain. **Neuroscience principles**, Nova York, p. 472 – 491, 2000.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M; A. **O Sistema Somatossensorial**. In. Neurociencias: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre: Artmed, 4<sup>o</sup> ed. 2002.

BENNETT, D. NGF, Sensitization of Nociceptors. In: SCHMIDT, R. F.; WILLIS, W. D. (Eds.). **Encyclopedia of Pain**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1338–1342, 2007.

BUKHARI, S. N. A.; AHMAD, W.; BUTT, A. M.; AHMAD, N.; AMJAD, M. W. B.; HUSSAIN, M. A.; SHAH, V. H.; TRIVED, A. R. Synthesis and evaluation of chalcone analogues and pyrimidines as cyclooxygenase (COX) inhibitors. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Nigéria, v. 6, n. 14, p. 1064-1068, 2012.

CHIEW, A. L.; GLUUD, C.; BROK, J.; BUCKLEY, N. A.; Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Reino Unido, v. 2, n. 2, p. 1-71, 2018.

CORRÊA, R.; PEREIRA, M. A.; BUFFON, D.; SANTOS, L. D.; FILHO, V. C.; SANTOS, A. R.; NUNES, R. J. Antinociceptive properties of chalcones. structure-activity relationships. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 334, n. 10, p. 332-334, 2001.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DACORSO, L. M.; DACORSO, S. T. D. M. Dores crônicas na atualidade. **Estudos de psicanálise**, Belo Horizonte, n. 50, p. 87-94, 2018.

DE BOER, V. C. J.; DIHAL, A. A.; WOUDE, H. V. D.; ARTS, I. C. W.; WOLFFRAM, S.; ALINK, G. M.; RIETJENS, I. M. C. M.; KEIJER. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 135, n. 7, p. 1718-1725, 2005.

DREWES, A. M. The physiology of pain. **Ugeskrift for Laeger**, v.168, n. 20, p. 1941-1943, 2006.

DHAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P. S.; HAMON, R. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 48, n. 4, p. 567–592, 1996.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F.; Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. **Neuroscience Letters**, Connecticut, v. 83, n. 2, p. 207-211, 1987.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of Pain. **Seminars in Pediatric Neurology**, Filadélfia, v. 23, n. 3, p. 201–208, 2016.

ERTHAL, Vanessa. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por meio da radiação laser no acuponto e36 (zusanli) em camundongos**. 2016. Tese (doutorado em engenharia elétrica e informática industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; S.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, H. Potencial farmacológico das chalconas: uma breve revisão. **Revista Virtual Química**, v. 10, n. 5, p. 1455-1473, 2018.

GARCIA, J. B. S.; BONILLA, P.; KRAYCHETE, D. C.; FLORES, F.C.; VALTOLINA, E. D. P.; GUERRERO, C. Optimizing post-operative pain management in Latin America. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 4, p. 395-403, 2017.

GARLAND, E. L. Pain Processing in the Human Nervous System. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, Filadélfia, v. 39, n. 3, p. 561–571, 2012.

GIERTHMÜHLEN, J.; BARON, R. Neuropathic Pain. **Seminars in Neurology**, Nova Iorque, v. 36, n. 5, p. 462–468, 2016.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, New York, v. 16, n. 11, p. 1248–1257, 2010.

GOLDBERG, D. S.; MCGEE, J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**, Londres, v. 11, p. 770-775, 2011.

GRIFFIN, R. S.; WOOLF, C. J. **Farmacologia da analgesia**. In: GOLAN, D. L.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia. Guanabara Koogan, p. 569-605, 3<sup>o</sup> ed, 2014.

GROSSER, T., SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. **Anti-inflammatory, antipyretic and analgesic agents; gout pharmacotherapy**, In: GOODMAN & GILMAN'S: The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill (Eds.), California, USA; Chapter 18, 12<sup>th</sup> ed., 2012.

GUIA INTERFARMA 2019 da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/guia-interfarma-2019-interfarma2.pdf>. Acesso em: 30/03/2021.

HEIDARI, M. R.; FOROUMADI, A.; AMIRABADI, A.; SAMZADEH-KERMANI, A.; AZIMZADEH, B. S.; ESKANDARIZADEH, A. Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of a Novel Rigid 3, 4-Dihydroxy Chalcone in Mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, n. 1, p. 399–406, 2009.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Hagerstown, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

ISMAIL, N. I.; MING-TATT, L.; LAJIS, N.; AKHTAR, M. N.; KIRA, A. A.; PERIMAL, E. K.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive effect of 3-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-(5-methylfuran-2-yl)prop-2-en-1-one in mice models of induced nociception. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 8, p. 1077, 2016.

JANTAN, I.; BUKHARI, S.N.A.; ADEKOYA, O.A.; SYLTE, I. Studies of synthetic chalcone derivatives as potential inhibitors of secretory phospholipase A<sub>2</sub>,

cyclooxygenases, lipoxygenase and pro-inflammatory cytokines. **Drug, Design and Development and Therapy**, Auckland, v. 8, p. 1405–1418, 2014.

KIEKOW, C. J.; FIGUEIRÓ, F.; DIETRICH, F.; VECCHIA, L. D.; PIRES, E. N. S.; JANDREY, E. H. F.; GNOATTO, S. C. B.; SALBEGO, C. G.; BATTASTINI, A. M. O.; GOSMANN, G. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF- $\kappa$ B nuclear translocation and caspase-3 activation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 84, p. 116–122, 2016.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, Nova York, v. 242, n. 4879, p. 715-723, 1988.

KÖTTER, T.; COSTA, B. R. D.; FASSLER, M.; BLOZIK, E.; LINDE, K.; JUNI, P.; SCHERER, S. R. M. Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, San Francisco, v.10, n. 4, p. 1-18, 2015.

KRAWCZYK, N.; GREENE, M.C.; ZORZANELLI, R.; BASTOS, F.I. Rising trends of prescription opioid sales in contemporary Brazil, 2009-2015. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 108, n. 5, p. 666-668, 2018.

LANE, N. E.; SCHNITZER, T. J.; BIRBARA, C. A.; MOKHTARANI, M.; SHELTON, D. L.; SMITH, M. D.; BROWN, M. T. Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 363, n. 16, p. 1521–1531, 2010.

LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 29, p. 159–164, dez. 2014.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S. B.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 445-451, 2005.

LAW, P.-Y.; WONG, Y. H.; LOH, H. H. Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 389–430, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, H. et al. Discovery of dual-acting opioid ligand and TRPV1 antagonists as novel therapeutic agents for pain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 182, p. 111634, 2019.

LUTZ, M. Metamizole (Dipyrone) and the liver: a review of the literature. **The Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 59, n. 11, p. 1433-1442, 2019.

MARTIN, E. Pathophysiology of Pain. **Pain Management in Older Adults**, p. 7-29, 2018.

MELLO, Renata de Jesus. **Atividades analgésicas e anti-inflamatórias do extrato hidroalcolico e frações de folhas da espécie Vitex polygama**. 2017. Tese (mestrado em ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé, Macaé, 2017.

MERSKEY, M.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain. **IASP Press**, Seattle, p. 209-214, 1994.

MICHAELIDES, A.; ZIS, P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. **Postgraduate Medicine**, Londres, v. 131, n. 7, p. 438-444, 2019.

MOHAMAD, A.S.; AKHTAR, M.N.; ZAKARIA, Z.A.; PERIMAL, E.K.; KHALID, S.; MOHD, P.A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 647, n.1-3, p. 103-109, 2010.

NOBRE, M. E. P.; CORREIA, A. O.; BORGES, M. B.; SAMPAIO, T. M. A.; CHAKRABORTY, A. S.; GONÇALVES, D. O.; BRITO, G. A. C.; LEAL, L. K. A. M.; FELIPE, C. F. B.; LUCETTI, D. L.; ARIBA, R. M.; VIANA, G. S. B. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. **Nutrition Research**, Nova Iorque, v. 33, n. 5, p. 422-433, 2013.

OGONOWSKI, A. A.; MAY, S. W.; MOORE, A. B.; BARRET, L. T.; O'BRYANT, C. L.; POLLOCK, H. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 280, n. 2, p. 846-853, 1997.

OLIVEIRA CMB, TSA RKS, ISSY AM, GEROLA LR, SALOMÃO R. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

PATTINSON, K. T. Opioids and the control of respiration. **British Journal of Anaesthesia**, Londres, v. 100, n. 6, p. 747-758, 2008.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI JR, W.A.; CHIU I. M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in Immunology**, Reino Unido, v. 38, n. 1, p. 5-19, 2017.

POPE, N.; TALLON, M.; MCCONIGLEY, R.; LESLIE, G.; WILSON, S. Experiences of acute pain in children who present to a healthcare facility for treatment: a systematic review of qualitative evidence. **JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports**, Adelaide, v. 15, n. 6, p. 1612-1644, 2017.

RAJA et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

REARDON, D. P.; ANGER, K. E.; SZUMITA, P. M. Pathophysiology, assessment, and management of pain in critically ill adults. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Reino Unido, v. 72, n. 18, p. 1531-1543, 2015.

REICHLING, D. B.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. The fundamental unit of pain is the cell. **Pain**, Amsterdam, v. 154, p. 1-19, 2013.

RODRÍGUEZ-MARTIN, S.; MARTÍN-MERINO, E.; LERMA, V.; RODRÍGUEZ-MIGUEL, A.; GONZÁLEZ, O.; GONZÁLEZ-HERRADA, C.; RAMÍREZ, E.; BELLÓN, T.; ABAJO, F. J. D. Active surveillance of severe cutaneous adverse reactions: A case-population approach using a registry and a health care database. **Pharmacoepidemiology & Drug Safety**, Chichester, v. 17, n. 9, p. 1042-1050, 2018.

ROJAS, J.; DOMÍNGUEZ, J.N.; CHARRIS, J.E.; LOBO, G.; PAYÁ, M.; FERRÁNDIZ, M.L. Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 8, n. 37, p. 699-705, 2002.

SALEHI, B.; QUISPE, C.; CHAMKHI, I.; OMARI, N. E.; BALAHBIB, A.; JAVAD SHARIFI-RAD, J.; BOUYAHYA, A. L.; AKRAM, M.; LQBAL, M.; DOCEA, A. O.; CARUNTU, C.; LEYVA-GÓMEZ, G.; DEY, A.; MARTORELL, M.; CALINA, D.; LÓPEZ, V.; LES, F. Pharmacological properties of chalcones: a review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 11; n. 18, p. 592654, 2020.

SCHAIBLE, H.-G. Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin, v. 177, p. 3–28, 2006.

SCHAIBLE, H.-G.; BANCHET, G. S. V.; BOETTGER, M. K.; BRAUER, R.; GAJDA, M.; RICHTER, F.; HENSELLEK, S.; BRENN, D.; NATURA, G. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain: Cytokines and joint pain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1193, n. 1, p. 60–69, 2010.

SCHAIBLE, H.-G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 13, n. 2, p. 210, 2011.

SCHAIBLE, H.-G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, Berlin, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O.; ALMEIDA, R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacia**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SINATRA, R. Causes and consequences of inadequate management of acute pain. **Pain Medicine**, Malden, v. 11, p. 1859-1871, 2010.

SINGLA, N. et al. Assay Sensitivity of Pain Intensity Versus Pain Relief in Acute Pain Clinical Trials: ACTTION Systematic Review and Meta-Analysis. **The Journal of Pain**, Philadelphia, v. 16, n. 8, p. 683–691, 2015.

SMITH, M. B. **Nucleophilic Species That Form Carbon-Carbon Bonds**. In: Organic Synthesis. [s.l.] Elsevier, p. 659-742, 2017.

SNEDDONS, L. U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, Bethesda, v. 33, p. 63-73, 2018.

STAURENGO-FERRARI, L.; RUIZ-MIYAZAWA, K.W.; PINHO-RIBEIRO, F.A.; FATTORI, V.; ZANINELLI, T.H.; BADARO-GARCIA, S.; BORGHI, S. M.; CARVALHO, T. T.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A. *Trans*-chalcone attenuates pain and inflammation in experimental acute gout arthritis in mice. **Front Pharmacology**, Lausanne, v. 9, n. 1123, p. 1-15, 2018.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 12, p. 507–511, 2009.

STEIN, C.; CLARK, J. D.; OH, U.; VASKO, M. R.; WILCOX, G. L.; OVERLAND, A. C.; VANDERAH, T. W.; SPENCER, R. H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 90–113, 2009.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. **The Pharmacology of Pain**, Berlin, p. 1-20, 1997.

ÜÇEYLER, N.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 67–78, jun. 2009.

UR RASHID H.; XU, Y.; AHMAD, N.; MUHAMMAD, Y.; WANG, L. Promising antiinflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E(2), inducible NO synthase and nuclear factor kappa activities. **Bioorganic Chemistry**, Amsterdã, v. 87, p. 335-365, 2019.

VARDEH, D.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. **The Journal of Pain**, Philadelphia, v. 17, n. 9, p. T50–T69, 2016.

VENTURA, T. L. B. V.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; SOUZA, A. M. T. S.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 8072-8093, 2015.

VO, P.; MARX, S.; PENLES, L. Unmet needs among patients experiencing acute and chronic pain: Results from a survey of 606 pain patients and 491 physicians. **The Journal of Pain**, Estados Unidos, v. 9, n. 4, p. 69, 2008.



WALK, D.; POLIAK-TUNIS, M. Chronic pain management: an overview of taxonomy, conditions commonly encountered, and assessment. **Medical Clinics of North America**, Filadélfia, v. 100, p. 1-16, 2016.

WOLLER, S. A.; EDDINGER, K. A.; CORR, M.; YAKSH, T. L. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, v. 35, n. 5, p. 40–46, 2017.

WON, S. J., LIU, C. T., TSAO, L. T., WENG, J. R., KO, H. H., WANG JP.; LIN, C. N. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 40, n. 1, p. 103-112, 2005.

WOOLF, C. J. Overcoming obstacles to developing new analgesics. **Nature Medicine**, New York, v. 16, n. 11, p. 1241–1247, 2010.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

YAKSH, T. L.; WALLACE, M. S. **Opioid analgesia and treatment of pain**. In: GOODMAN & GILMAN'S: The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill (Eds.), California, USA; Chapter 18, 12<sup>th</sup> ed., 2012.