

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Biomedicina

Trabalho de Conclusão de Curso
Luiz Paulo Chaves de Souza
Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

**EFEITO ANESTÉSICO GERAL DO MENTOL:
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE REFLEXOS AUTONÔMICOS
CARDIOVASCULARES**

Uberlândia
2020

Luiz Paulo Chaves de Souza

**EFEITO ANESTÉSICO GERAL DO MENTOL:
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE REFLEXOS AUTONÔMICOS
CARDIOVASCULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Instituto de Ciências
Biomédicas como requisito parcial para
a obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-
da-Silva

**Uberlândia
2020**

**EFEITO ANESTÉSICO GERAL DO MENTOL:
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE REFLEXOS AUTONÔMICOS
CARDIOVASCULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
aprovado pela banca examinadora como
requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, 18 de agosto de 2020

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

Prof.^a Dr.^a Mani Indiana Funez

Prof.^a Dr.^a Patrícia Fidelis-de-Oliveira

Resumo

Este trabalho teve como objetivo analisar o possível efeito anestésico do mentol em ratos Wistar com foco na inibição de reflexos autonômicos cardiovasculares. Assim, após a administração de doses que promoveram hipnose, os seguintes parâmetro foram avaliados frente à aplicação de estímulo pressórico na pata traseira dos animais: (I) alteração na pressão arterial média e na frequência cardíaca, ambas aferidas diretamente (via canulação da artéria femoral e ampliação de sinal mecanoelétrico através de transdução de sinal analógico para digital); (II) tempo para a perda do reflexo de endireitamento e presença de reflexo de retirada da pata; (III) tempo de hipnose. Empregou-se como controle positivo a administração da mistura de cetamina com xilazina em doses sub-anestésicas. Observou-se que tanto o tempo de hipnose como a latência para o aparecimento desse efeito foram maiores nos animais tratados com mentol quando comparados aos controles. O número de animais que perderam o reflexo de endireitamento ou o reflexo de retirada da pata foi semelhante ao do controle. Os reflexos cardiovasculares foram evocados com elevada frequência nos animais que perderam o reflexo de retirada da pata, à semelhança do que se observou nos animais sub-anestesiados com cetamina e xilazina. Conclui-se que o mentol apresenta efeitos hipnótico e antinociceptivo insuficientes para a produção de anestesia cirúrgica.

PALAVRAS-CHAVE: terpeno, sistema nervoso, reflexos cardiovasculares, nocicepção.

Abstract

The present study aimed to analyze the possible anesthetic effect of menthol in Wistar rats focusing on the inhibition of cardiovascular autonomic reflexes. Thus, after the administration of doses that induced immobilization, the following parameters were analyzed while a pressure stimuli was applied to the hind paw of these animals: (I) mean arterial pressure and heart rate alterations (measured via cannulation of the femoral artery and magnification of the mechanoelectric signal using a pressure transducer); (II) time for loss of straightening reflexes and presence of paw withdrawal reflex; (III) hypnosis time. The administration of ketamine plus xylazine in subanesthetic doses was used as positive control. Both the hypnosis time and the latency for hypnosis induction were greater in animals treated with menthol when compared with controls. Neither the number of animals that lost the straightening reflex nor the number of animals that presented paw withdrawal reflex were different related to controls. Despite the loss of withdrawal reflex, animals treated with menthol still presented cardiovascular alterations in response to the pressure stimuli on the paw; a similar result was observed after the administration of ketamine plus xylazine. Therefore, the hypnotic and antinociceptive effects of menthol are not enough to produce surgical anesthesia.

KEYWORDS: terpenes, nervous system, cardiovascular reflexes, nociception.

Lista de tabelas

Tabela 1 Anestésicos e mecanismos de ação. Fármacos anestésico de diferentes classes e seus mecanismos de ação.....	13
Tabela 2 Tabela de terpenos. Exemplos representativos de terpenos de cada um dos tipos. Fonte: Wikipedia e The Pherobase.....	14

Lista de figuras

Figura 1 Unidade de Isopreno (C₅). Fonte: Wikipedia	14
Figura 2 Estrutura química do mentol. Ilustração da estrutura química do mentol, objeto de estudo desse trabalho. Fonte: Wikipedia	15
Figura 3 Clipe de fichário. Instrumento utilizado no protocolo experimental para aplicar pressão na pata do animal.	17
Figura 4 Esquema do protocolo metodológico	19
Figura 5 Número de animais que entraram em hipnose e que perderam o reflexo de endireitamento. A) Número de animais que apresentaram efeito hipnótico após a administração de cetamina + xilazina ou de mentol (não há diferença entre os grupos; $P > 0,999$ – teste exato de Fisher). B) Número de animais que apresentaram perda do reflexo de retirada (não há diferença entre os grupos $P = 0,580$ – teste exato de Fisher). $N = 5-11$	20
Figura 6 Tempo de latência para hipnose e tempo de hipnose. A) Tempo de latência para se atingir a hipnose ($P = 0,04$, Mann Whitney) e B) tempo total de hipnose ($P = 0,01$, Mann Whitney) após a administrações de cetamina + xilazina ou mentol. Os dados representam os valores individuais com a mediana (indefinida no grupo tratado com mentol para o tempo total de hipnose). $N = 5-9$ Erro! Indicador não definido.	
Figura 7 Variação temporal da pressão arterial média. Variação de pressão arterial média (PAM em mmHg), em relação a pressão arterial basal após a administração de cetamina + xilazina ou mentol. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 4-5$	21
Figura 8 Variação temporal da frequência cardíaca. Variação de frequência cardíaca média (FC em batimentos por minuto) em relação a pressão arterial basal após a administração de cetamina + xilazina ou mentol. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 4-5$	22
Figura 9 Reflexos cardiovasculares. Exemplo dos reflexos cardiovasculares evocados pelo estímulo pressórico na pata no rato. No quadrante superior a pressão arterial pulsátil, no central, a pressão arterial média e no inferior a frequência cardíaca	23
Figura 10 Variação da pressão arterial média frente ao estímulo pressórico. Variação de pressão arterial média (PAM; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de cetamina + xilazina (C+X) frente ao estímulo pressórico na pata. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. $N = 5$. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média.	24
Figura 11 Variação da pressão arterial média frente ao estímulo pressórico. Variação de pressão arterial média (PAM; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de mentol frente ao estímulo pressórico na pata. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. $N = 4$. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média.	23
Figura 12 Variação da frequência cardíaca frente ao estímulo pressórico. Variação de frequência cardíaca (FC, positiva e negativa) na primeira hora após a administração de cetamina + xilazina frente ao estímulo pressórico na pata. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. $N = 5$. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média.	25
Figura 13 Variação da frequência cardíaca frente ao estímulo pressórico. Variação de frequência cardíaca (FC; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de mentol frente ao estímulo	

pressórico na pata. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. $N = 4$. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. 24

Figura 14 | Frequência de ocorrência de reflexo cardiovascular na presença e na ausência de reflexo motor. A) Observação qualitativa da frequência de ocorrência do reflexo cardiovascular na ausência de reflexo motor frente ao estímulo pressórico na pata após administração de cetamina + xilazina ou de mentol ($P=0.0159$, Mann Whitney). B) Observação qualitativa da frequência de ocorrência do reflexo cardiovascular na presença de reflexo motor frente ao estímulo pressórico na pata após administração de cetamina + xilazina ou de mentol ($P=0.6667$, Mann Whitney). $N = 4-5$. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. 25

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. Farmacologia dos produtos naturais	11
1.2. Dor, nocicepção, analgesia e anestesia	12
1.3. Anestésicos gerais e produtos naturais	12
1.4. Mentol	15
2. Objetivos	16
2.1. Geral:	16
2.2. Específico:	16
3. Materiais e método	17
3.1. Animais	17
3.2. Canulação arterial	17
3.3. Procedimento experimental	17
3.4. Análise estatística	18
4. Resultados	20
4.1. Perda dos reflexos de endireitamento e retirada	20
4.2. Tempo de latência para indução de hipnose e tempo de hipnose	20
4.3. Efeito sobre a pressão arterial média	21
4.4. Efeito sobre a frequência cardíaca	22
4.5. Efeito sobre os reflexos autonômicos cardiovasculares	22
4.6. Frequência de ocorrência dos reflexos cardiovasculares	25
5. Discussão	25
6. Conclusão	27
Referências	28
ANEXOS	33

1. Introdução

1.1. Farmacologia dos produtos naturais

Os estudos farmacológicos de produtos naturais representam uma ferramenta importante para a descoberta de novos agentes terapêuticos (RODRIGUES et al., 2016). De fato, tais estudos têm evidenciado uma série de atividades biológicas relevantes, tais como atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e citotóxica. Ainda, ações sobre o sistema nervoso, como atividade antidepressiva, ansiolítica, analgésica e anestésica também são frequentemente descritas (CALIXTO; CALIXTO, 2019; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; XIAO; BAI, 2019).

Grandes avanços farmacológicos e terapêuticos ocorreram a partir de estudos com produtos naturais. A cocaína, um psicoestimulante com atividade anestésica local, é um exemplo bem conhecido da afirmação anterior. Contudo, diversos outros exemplos podem ser citados, tais como: a morfina e a codeína, opioides analgésicos; a atropina, um anticolinérgico; a cafeína, um estimulante dos sistema nervoso central; a nicotina, que possui efeitos sobre o comportamento; além de, entre outros, diversos anti-inflamatórios, como o ácido acetilsalicílico, o resveratrol e a curcumina (DEBNATH et al., 2018; HOWES et al., 2020; SCHRÖR, 2016).

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos pode seguir a seguinte ordem: (1) triagem fenotípica (screening), (2) isolamento e caracterização estrutural, (3) estudo do mecanismo de ação, (4) estudos pré-clínicos, (5) estudos clínicos e (6) comercialização. Em muitos países, as três primeiras etapas são desenvolvidas majoritariamente dentro das universidades e as últimas em indústrias ou em parceria público-privada (KATZ; BALTZ, 2016). Nesse projeto, estudamos o potencial anestésico geral do mentol, substância quimicamente bem caracterizada, extensamente utilizada na indústria cosmética, mas cujo efeito anestésico não foi totalmente validado e tampouco descrito em mamíferos, apesar dos diversos relatos do seu emprego para essa finalidade em peixes (AYDIN; BARBAS, 2020; BOTREL et al., 2019; CAN et al., 2019; KASAI; HOSOSHIMA; YUN-FEI, 2014; ROSS; ROSS, 2009; SEPULCHRO et al., 2016; SIMÕES; GOMES, 2009; SPANGHERO et al., 2019; TETA; KAISER, 2019; UEHARA et al., 2019).

1.2. Dor, nociceção, analgesia e anestesia

Para a discussão que se segue, é importante compreendermos os conceitos de dor, nociceção, analgesia e anestesia. Segundo a *International Association for the Study of Pain (IASP)*, dor é “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Nociceção é “o processo neural de codificação de estímulos nocivos”; em nota, a IASP esclarece que “as consequências da codificação podem ser autonômicas (por exemplo, pressão arterial elevada) ou comportamentais (reflexo de retirada motor ou comportamento nocifensivo mais complexo). A sensação de dor não está necessariamente implícita”. Aliás, segundo a IASP, a definição de dor evita vinculá-la ao estímulo. Em outras palavras, “a atividade induzida no nociceptor e nas vias nociceptivas por um estímulo nocivo não é a dor, a qual é sempre um estado psicológico, embora possamos apreciar que a dor geralmente tenha uma causa física próxima”. Analgesia refere-se à “ausência de dor em resposta à estimulação que normalmente seria dolorosa”. O termo anestesia descreve a perda de sensações (ou seja, insensibilidade), seja no corpo todo ou em parte dele (TRANQUILLI; GRIMM, 2017). Anestesia geral “é um estado reversível induzido por drogas consistindo de inconsciência, amnésia, antinociceção, imobilidade, com manutenção estável das condições fisiológicas” (BROWN; PAVONE; NARANJO, 2018).

Vale ressaltar a íntima e bem descrita relação entre as vias de nociceção e a rede central autonômica, o que sugere que os reflexos simpáticos e parassimpáticos fazem parte da experiência sensorial da dor (BURTON; FAZALBHOY; MACEFIELD, 2016; CORTELLI et al., 2013). Esta relação embasa a avaliação da inibição de reflexos autonômicos como consequência da antinociceção no presente estudo.

1.3. Anestésicos gerais e produtos naturais

Nas últimas décadas, muitos estudos procuraram elucidar os mecanismos envolvidos na indução de anestesia geral. Inicialmente, acreditava-se que os anestésicos gerais agiam sobre os lipídeos da membrana de neurônios do sistema nervoso central, alterando sua fluidez e, conseqüentemente, a permeabilidade e a excitabilidade celulares. Posteriormente, foi sugerido que o efeito de anestésicos gerais decorria da ação desses agentes sobre proteínas de membrana, em especial canais iônicos, bloqueando a despolarização de fibras nervosas (FRANKS; LIEB, 1994; PAVEL et al., 2020; YAMAKURA et al., 2001).

Atualmente, apesar de ainda haver muito a ser elucidado, os mecanismos específicos de muitas das drogas já foram relativamente bem descritos. Assim, o propofol potencializa, quase que exclusivamente, a funcionalidade de receptores GABA_A, esteroides anestésicos somam à potenciação de GABA_A a inibição de receptores nicotínicos, enquanto que os barbitúricos, além de ambas as atividades, ainda inibem receptores de glutamato (Tabela 1) (BROWN; PAVONE; NARANJO, 2018).

Como descrito acima, um anestésico geral ideal deve produzir: perda de consciência, amnésia, analgesia, inibição de reflexos autônomos (que reflete o efeito antinocepcivo) e relaxamento da musculatura estriada esquelética (BONHOMME et al., 2019; EILERS; YOST, 2017). É importante destacar que não existe nenhuma substância descrita que seja capaz de induzir um estado de anestesia isoladamente; cada fármaco promove, em graus variados, um ou mais dos referidos efeitos: a cetamina e os opioides, por exemplo, são analgésicos, o propofol, hipnótico, enquanto que certos anticolinérgicos são bloqueadores neuromusculares (BROWN; PAVONE; NARANJO, 2018). Não por acaso, a obtenção de um estado adequado de anestesia geral envolve a administração de mais de um fármaco.

Tabela 1 | Anestésicos e mecanismos de ação

DROGA	CLASSE	RECEPTOR	EFEITO	Ref.
Propofol	Anestésico parenteral	GABA _A	A ação na subunidade β3 do receptor GABA _A potencializa a ação desse receptor, aumentando o influxo de Cl ⁻ em neurônios piramidais, no tálamo, no tronco cerebral, no estriado e na medula espinhal, causando um efeito hipnótico	(BROWN; PAVONE; NARANJO, 2018; VALLEJO et al., 2019; YIP et al., 2013)
Isoflurano	Anestésico volátil	GABA _A	A ação alostérica positiva sobre as subunidades α1, β2 e 3 e γ2 do receptor GABA _A no tálamo causa um efeito sedativo	(GARCIA; KOLESKY; JENKINS, 2010; JIA et al., 2008)
		Receptores de glicina	A ação em receptores de glicina aumenta o influxo de Cl ⁻ em neurônios encefálicos e medulares causando sedação e relaxamento muscular	(CHENG; KENDIG, 2002; HAWKLEY; PRESTON; MAANI, 2020)
Alfaxalona	Esteróide anestésico	GABA _A	A potenciação da funcionalidade do receptor GABA _A hiperpolariza neurônios no tronco cerebral e neurônios pós sinápticos, induzindo analgesia e sedação	(ERRINGTON; GIOVANNI; CRUNELLI, 2014)
		Receptores nicotínicos	A inibição de receptores colinérgicos nicotínicos inibe a deflagração de potencial de ação e pode estar envolvida na modulação, entre outros, do SN simpático	(SHIRAISHI et al., 2002)
Fenobarbital e Tiopental	Barbitúricos	GABA _A	O aumento na probabilidade de abertura do canal de cloreto do receptor GABA _A no SNC induz um efeito sedativo e hipnótico	(LEWIS; ADAMS, 2020)
		Receptores nicotínicos	A ação de barbituratos na inibição de receptores colinérgicos nicotínicos impede o influxo de Na ⁺ e pode estar envolvida na depressão do SNC	(KAMIYA et al., 2001)
		Receptores de glutamato	A inibição de receptores do tipo AMPA causa a diminuição do influxo de íons Ca ²⁺ em neurônios	(TAVERNA et al., 1994; YAMAKURA et al., 1995, 2001)

Os produtos de origem natural mais importantes que apresentam atividade potencialmente anestésica pertencem às classes dos alcaloides, flavonoides e terpenos. O mentol, objeto do presente estudo, pertence à classe dos terpenos, os quais descreveremos mais detalhadamente a seguir (HAVSTEEN, 1983; TSUCHIYA, 2017).

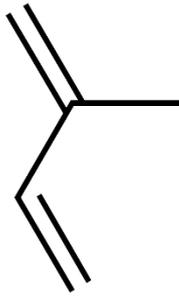


Figura 1 | Unidade de Isopreno (C₅). Fonte: Wikipedia.

Segundo COX-GEORGIAN *et al.* (2019), terpenos, também conhecidos como terpenoides ou isoprenoides, representam a maior classe de produtos naturais. São formados a partir do metabolismo secundário de plantas e também podem ser produzidos por animais. Esses produtos naturais são gerados a partir de unidades de isopreno, detentoras de cinco átomos de carbono - C₅ (Figura 1) - e nomeados de acordo com o número total de carbonos em suas estruturas: os terpenos que possuem apenas 5 carbonos são denominados hemiterpenos; 10 carbonos, monoterpenos; 15 carbonos, sesquiterpenos; 20 carbonos, diterpenos; 25 carbonos, sesterpenos; 30 carbonos, triterpenos e 40 carbonos, tetraterpenos (Tabela 2) (DEWICK, 2002; GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; WALLACH, 1887).

Tabela 1 | Tabela de terpenos com exemplos representativos

TERPENO	TIPO	ESTRUTURA
Isopreno	Hemiterpeno	
Mentol	Monoterpeno	
Zingerona	Sesquiterpeno	
Retinol	Diterpeno	
Scalaradial	Sesterpeno	
Ácido Betulínico	Triterpeno	
β-caroteno	Tetraterpeno	

Os terpenos menores, em especial os monoterpenos, são muito voláteis, enquanto que os terpenos com estruturas maiores formam esteróis e óleos fixos (JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2016). Essa diversidade possibilita a ampla utilização de terpenoides na indústria farmacêutica, onde são empregados para conferir aroma e sabor a formulações (fenchona), para ajudar na absorção de drogas de aplicação dérmica (limoneno), bem como na aromaterapia (mircenol), uma modalidade de terapia alternativa empregada para tratar dores crônicas, ansiedade, depressão e estresse (BREUS, 2019; DE MATOS et al., 2019; HUANG et al., 2012; LIM; LIU; CHAN, 2009; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008)

De importância para o nosso estudo, cabe salientar que a literatura sugere que os terpenoides possuem atividade sobre os receptores GABA_A, inclusive em baixas concentrações, possuindo, portanto, grande potencial no tratamento de doenças neuropsiquiátricas (MANAYI et al., 2016). Os estudos mostram que o aristolen-1(10)-en-9-ol, um sesquiterpeno, foi capaz de reduzir a ambulação promovida pela cafeína e de prolongar o tempo de sono induzido por fenobarbital, tendo sua atividade farmacológica reduzida por inibidores da atividade do receptor GABA_A (OKUGAWA et al., 1996; TAKEMOTO et al., 2015; TSUCHIYA, 2017).

1.4. Mentol

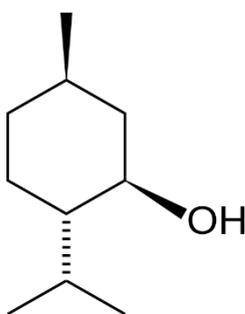


Figura 2 | Estrutura química do mentol. Fonte: Wikipedia.

O mentol (Figura 2) é um álcool monoterpênico cíclico produzido como metabólito secundário de espécies do gênero *Mentha* e está presente no óleo essencial de diversas plantas. Conhecido pelo sabor e pelo aroma característicos, é utilizado industrialmente na produção de fármacos, cosméticos e pesticidas (OZ et al., 2017).

GALEOTTI *et al.* (2001) descreveram a atividade anestésica local do mentol. O mediador dessa atividade parece ser o receptor TRPM8, um canal de receptor de potencial transitório, também responsável pela nossa percepção de frio (LIU et al., 2013). Estudos recentes trazem evidências de que o mentol também pode ter atividade sobre outros canais iônicos, o que reforça sua capacidade de alterar a excitabilidade celular e, conseqüentemente, o seu potencial uso terapêutico (GAUDIOSO et al., 2012; OZ et al., 2017).

Diversos estudos têm sugerido a utilização do mentol e óleos essenciais ricos em terpenos, como anestésicos para peixes (AYDIN; BARBAS, 2020; BOTREL et al., 2019; CAN et al., 2019; KASAI; HOSOSHIMA; YUN-FEI, 2014; ROSS; ROSS, 2009; SEPULCHRO et al., 2016; SIMÕES; GOMES, 2009; SPANGHERO et al., 2019; TETA; KAISER, 2019;

UEHARA et al., 2019). Entretanto, a maioria dos relatos baseia-se apenas em análises comportamentais e poucos estudos investigaram o potencial anestésico geral do mentol em mamíferos.

Ainda, vários estudos evidenciaram diversas ações do mentol sobre o sistema nervoso. UMEZU & MORITA (2003) e nosso grupo de pesquisa (SILVEIRA et al., 2014) observamos que a administração de mentol a roedores promoveu um aumento na atividade locomotora (ambulação) dos animais; CHOUDHARY et al. (2019) descreveram a atividade do mentol como modulador alostérico positivo de receptores colinérgicos nicotínicos em nematódeos; KAWASAKI *et al.* (2013) mostraram que a administração de mentol diretamente no nervo ciático de sapos pode inibir a deflagração de potenciais de ação; LAU *et al.* (2014) mostraram que o mentol é capaz de modular a expressão do receptor GABA_A no mesencéfalo e outros estudos sugerem, ainda, a ação direta do mentol sobre esse receptor (CORVALÁN; ZYGADLO; GARCÍA, 2009; HALL et al., 2004; WATT et al., 2008; ZHANG et al., 2008). GALEOTTI et al. (2002) descreveram a atividade anestésica do mentol mediada pela modulação seletiva de receptores opioides centrais do tipo kappa e UMEZU & MORITA (2003) ainda demonstraram a possível atividade do mentol na liberação de dopamina.

Considerando o potencial efeito do mentol sobre o tecido nervoso e sua utilização como anestésico em peixes, bem como a praticidade e o baixo preço desse composto em relação a anestésicos gerais clássicos, propusemo-nos a avaliar o efeito hipnótico desse monoterpene e sua capacidade de atenuar reflexos cardiovasculares (que se apresentam como resposta autonômica à nocicepção) evocados por estímulos pressóricos em ratos Wistar.

2. Objetivos

2.1. Geral:

Testar a hipótese de que o mentol tem propriedade anestésica geral em ratos.

2.2. Específico:

Avaliar se o mentol causa relaxamento muscular, hipnose, antinocicepção e inibição de reflexos autônomos cardiovasculares, utilizando como controle positivo a mistura de cetamina com xilazina em doses subanestésicas.

3. Materiais e método

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando de 250-350 g, os quais foram cedidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA/UFU). Os animais foram mantidos em condições de livre acesso à ração e água e mantidos no depositário de animais da Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia em gabinetes com controle de temperatura (25° C) e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 h. Os procedimentos do presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU: protocolo: 047/18 e seus adendos; ANEXOS I-III), obedecendo à legislação vigente.

3.2. Canulação arterial

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e tiveram cânulas de polietileno (PE-10 fundido à PE-50) inseridas em suas artérias femorais. Após fixação das cânulas nas artérias, suas extremidades mais calibrosas (PE-50) foram transpassadas subcutaneamente (com auxílio de trocater), exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. O tamanho das cânulas foi ajustado de acordo com o tamanho dos animais. Após recuperação anestésica, os animais retornavam para as gaiolas e os experimentos com a administração de drogas eram realizados 24 horas após a inserção das cânulas.

3.3. Procedimento experimental



Figura 3 | Clipe de fichário. Instrumento utilizado no protocolo experimental para aplicar pressão na pata do animal.

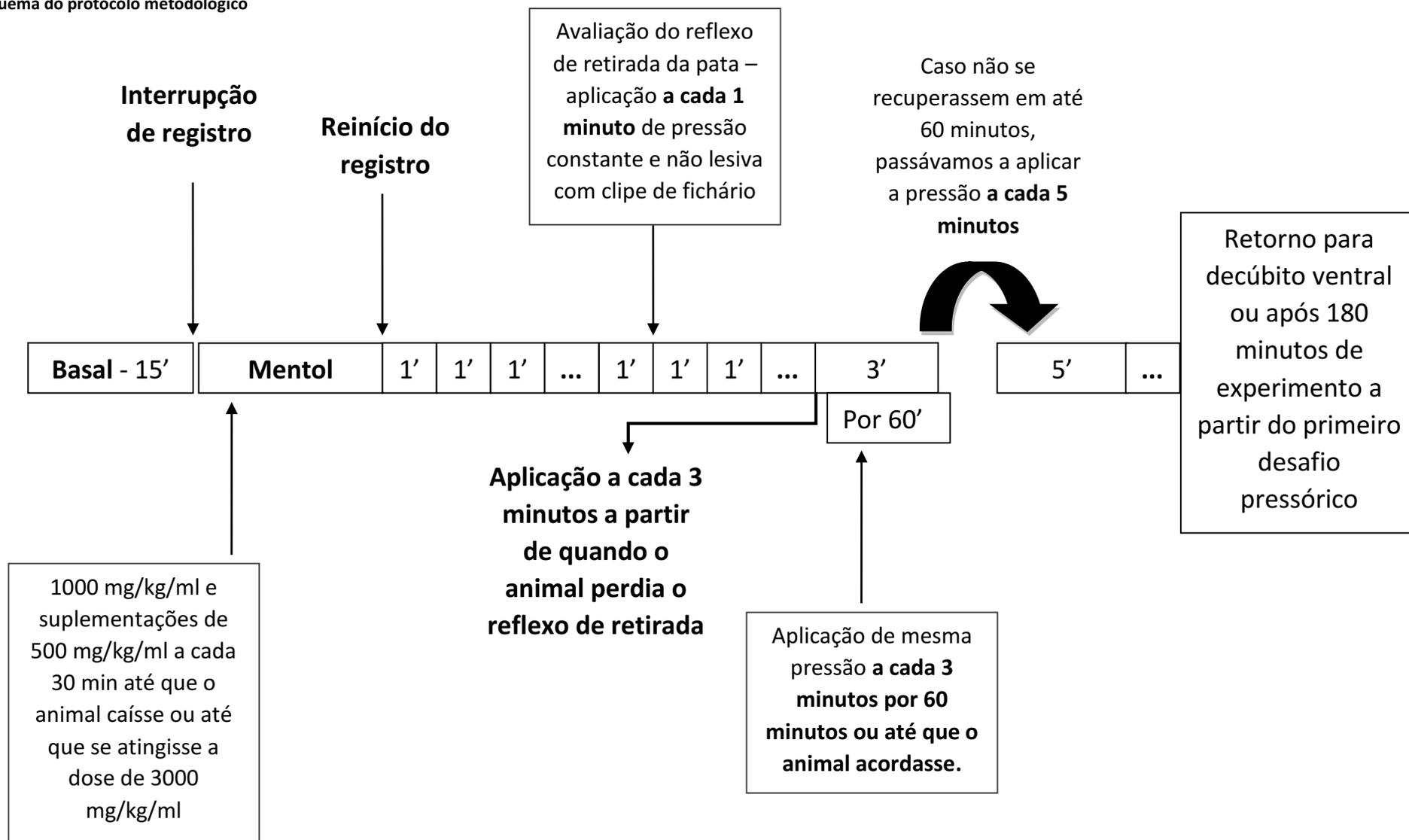
No dia do experimento, os animais foram levados para o laboratório, as cânulas foram conectadas a um transdutor de pressão mecanoelétrico, o sinal foi amplificado e convertido de analógico para digital e visualizado em um computador através do software *LabChart 8*. A pressão arterial média (PAM; em mmHg) e a frequência cardíaca (FC; em batimentos por minuto; BPM) foram então determinadas. Após o registro da PAM e da FC basais dos animais acordados durante 15 minutos, o registro era interrompido momentaneamente para a administração de mentol (1000 mg/kg, i.p, seguida de suplementações de 500 mg/kg a cada 30 minutos até que o animal perdesse o reflexo de endireitamento ou até que a dose máxima de 3000 mg/kg fosse atingida), dissolvido em óleo de oliva, ou da mistura de cetamina com

xilazina (empregada como controle positivo), nas doses intermediárias (subanestésicas) previamente descrita na literatura (i.e, 70 mg/kg e 7 mg/kg, i.p., respectivamente) (STRUCK et al., 2011). Imediatamente após a administração das diferentes substâncias, a cânula era novamente conectada ao transdutor para o registro da PAM e da FC ao longo do experimento. Um minuto após a administração das diferentes substâncias, os ratos eram colocados deitados de lado a cada minuto e o tempo para a verificação da perda do reflexo de endireitamento era avaliado. Um minuto após a perda do reflexo de endireitamento, avaliava-se o reflexo de retirada da pata; para tanto, aplicava-se na pata traseira dos animais (região do metatarso), em intervalos de um minuto, uma pressão constante e não lesiva com o auxílio de um clipe de fichário (1,5 cm; figura 3) (STRUCK et al., 2011). O tempo para a perda do reflexo de retirada era então computado e deste momento em diante, até o 60º minuto, o clipe era colocado em intervalos de 3 minutos. Caso os animais não se recuperassem no intervalo de uma hora, o clipe era então colocado em intervalos de 5 minutos (esse protocolo objetivou evitar lesões nas patas devidas à frequência de estímulos) (Figura 4). O clipe era removido imediatamente sempre que o reflexo de retirada fosse observado e permaneceu na pata por 10 segundos quando o reflexo de retirada estivesse ausente. Objetivou-se com esse procedimento verificar se havia inibição dos reflexos cardiovasculares (Figura 9) pelos diferentes tratamentos frente ao estímulo pressórico da pata. Os ratos eram observados até que ocorresse retorno para a posição de decúbito ventral, ou até que houvesse um movimento vigoroso da cabeça e do tronco frente a administração do estímulo pressórico; na ausência destes, até que se atingisse 180 minutos de experimento a partir do primeiro desafio pressórico. O tempo de sono foi determinado subtraindo-se o tempo para recuperação da anestesia daquele necessário para que se observasse a perda do reflexo de endireitamento. Após o experimento, os animais anestesiados eram eutanasiados por exsanguinação.

3.4. Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram determinadas através do teste de Mann-Whitney, teste “t”-Student ou teste exato de Fisher. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism® 5.0. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

Figura 4 | Esquema do protocolo metodológico



4. Resultados

4.1. Perda dos reflexos de endireitamento e retirada

Não houve diferença entre a quantidade relativa de animais que perderam o reflexo de endireitamento (entraram em hipnose) e o reflexo de retirada quando se compara o grupo tratado com mentol e o grupo controle (Figura 5).

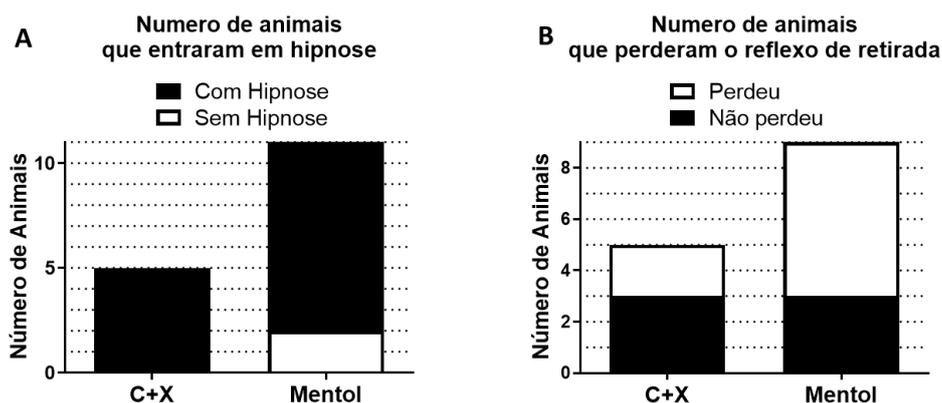


Figura 5 | A) Número de animais que apresentaram efeito hipnótico após a administração de cetamina + xilazina ou de mentol (não há diferença entre os grupos; $P > 0,999$ – teste exato de Fisher). B) Número de animais que apresentaram perda do reflexo de retirada (não há diferença entre os grupos $P = 0,580$ – teste exato de Fisher). $N = 5-11$.

4.2. Tempo de latência para indução de hipnose e tempo de hipnose

Houve diferença no tempo necessário para que o animal entrasse em hipnose após a última administração da droga e no tempo total de hipnose, sendo ambos maiores no grupo tratado com mentol em relação ao grupo controle (Figura 6). No grupo controle a mediana para o tempo de latência de hipnose foi de cerca de 4 minutos, enquanto que para o mentol, esse tempo foi de cerca de 9 minutos; já em relação ao tempo de hipnose, no grupo controle a mediana foi de cerca de 20 minutos, enquanto no grupo tratado com mentol a maioria dos animais continuou em hipnose após as três horas de experimento (Figura 6).

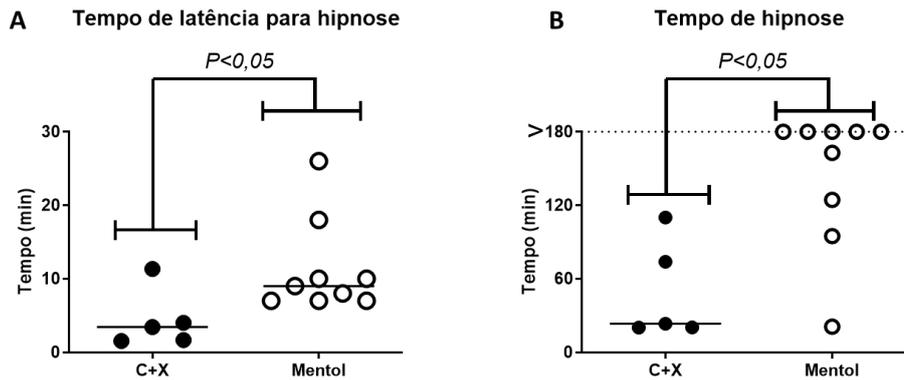


Figura 6 | A) Tempo de latência para se atingir a hipnose ($P=0,04$, Mann Whitney) e B) tempo total de hipnose ($P=0,01$, Mann Whitney) após a administrações de cetamina + xilazina ou mentol. Os dados representam os valores individuais com a mediana (indefinida no grupo tratado com mentol para o tempo total de hipnose). $N=5-9$.

4.3. Efeito sobre a pressão arterial média

Quanto ao efeito do mentol sobre a pressão arterial, observou-se que, enquanto a administração de cetamina com xilazina causou queda transitória da PAM, o que ocorreu nos primeiros dez minutos após a administração, o mentol causou queda mais duradoura que se manteve significativa até o 53º minuto do experimento (Figura 7).

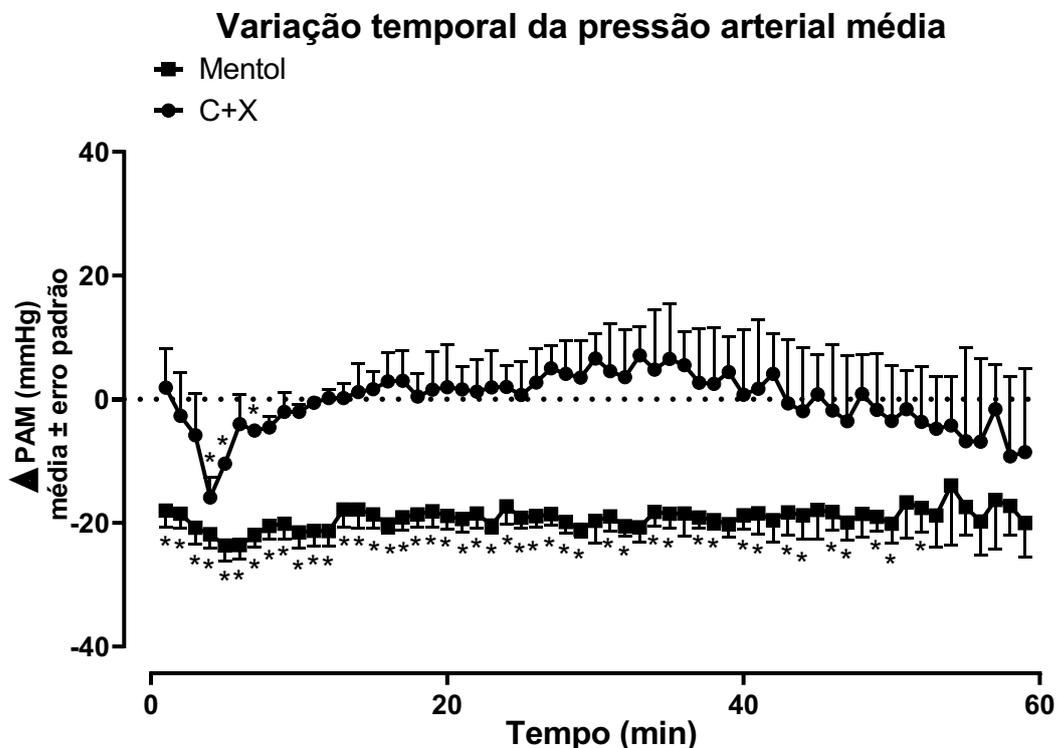


Figura 7 | Variação de pressão arterial média (PAM em mmHg), em relação a pressão arterial basal, após a administração de cetamina + xilazina ou mentol. $*P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N=4-5$.

4.4. Efeito sobre a frequência cardíaca

Quanto ao efeito sobre a frequência cardíaca, não observamos uma alteração estatisticamente significativa no grupo tratado com mentol. No grupo controle foi observado um aumento da FC após o 53º minuto após a administração da mistura de cetamina com xilazina (Figura 8).

Variação temporal da frequência cardíaca

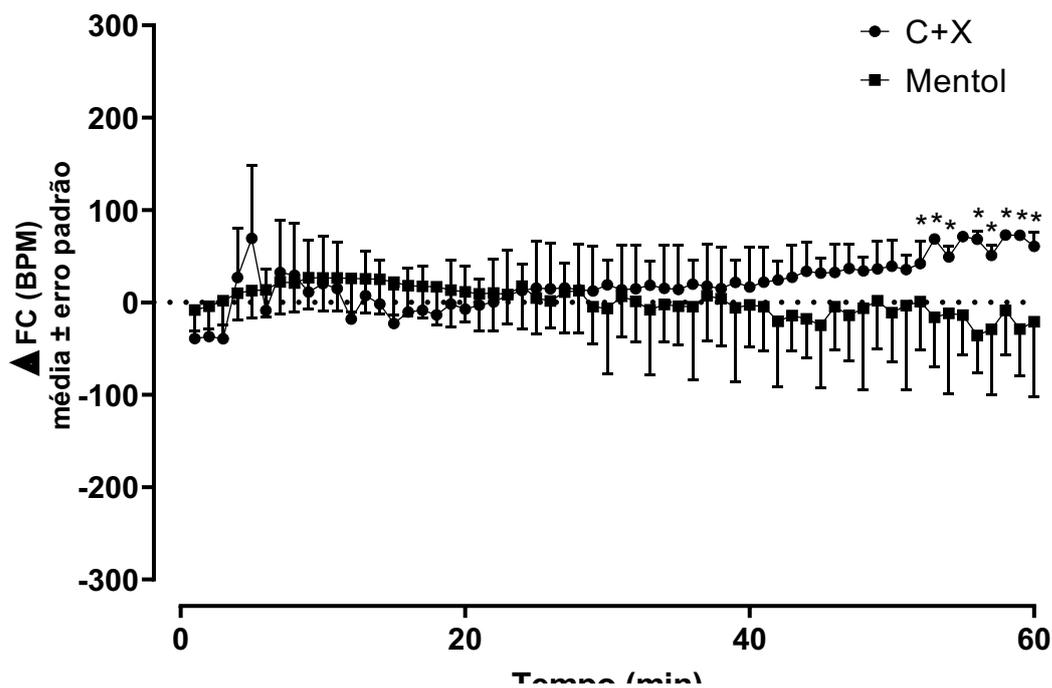
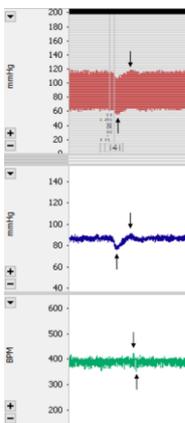


Figura 8 | Variação de frequência cardíaca média (FC em batimentos por minuto) em relação a pressão arterial basal após a administração de cetamina + xilazina ou mentol. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 4-5$.

4.5. Efeito sobre os reflexos autonômicos cardiovasculares



A administração da mistura de cetamina com xilazina ou de mentol não aboliu os reflexos cardiovasculares evocados por estímulo pressórico na pata dos animais. Os reflexos cardiovasculares se expressaram como alterações na pressão arterial (Figuras 9, 10 e 11) e na frequência cardíaca (Figuras 9, 12 e 13). Utilizou-se como valor basal para a determinação das variações pressóricas e de frequência cardíaca a média desses parâmetros nos 20 segundos que antecederam cada desafio pressórico na pata.

Figura 9 | Reflexos cardiovasculares. Exemplo dos reflexos cardiovasculares evocados pelo estímulo pressórico na pata do rato. No quadrante superior a pressão arterial pulsátil, no central, a pressão arterial média e no inferior a frequência cardíaca.

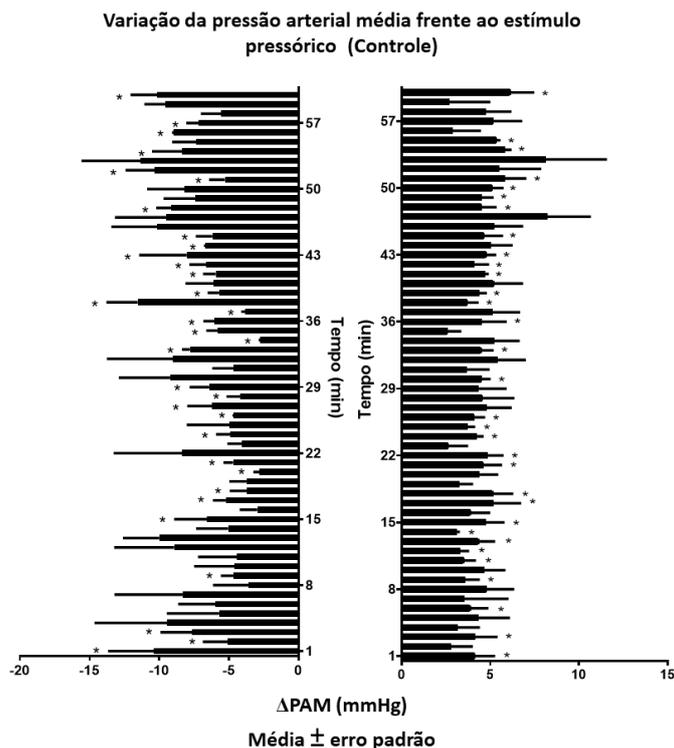


Figura 10 | Variação de pressão arterial média (PAM; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de cetamina + xilazina (C+X) frente ao estímulo pressórico na pata. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 5$.

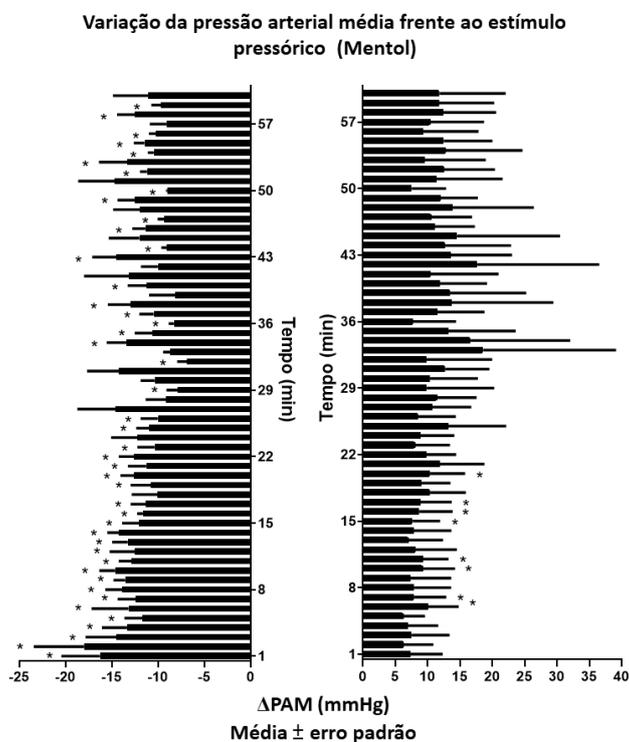


Figura 11 | Variação de pressão arterial média (PAM; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de mentol frente ao estímulo pressórico na pata. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 4$.

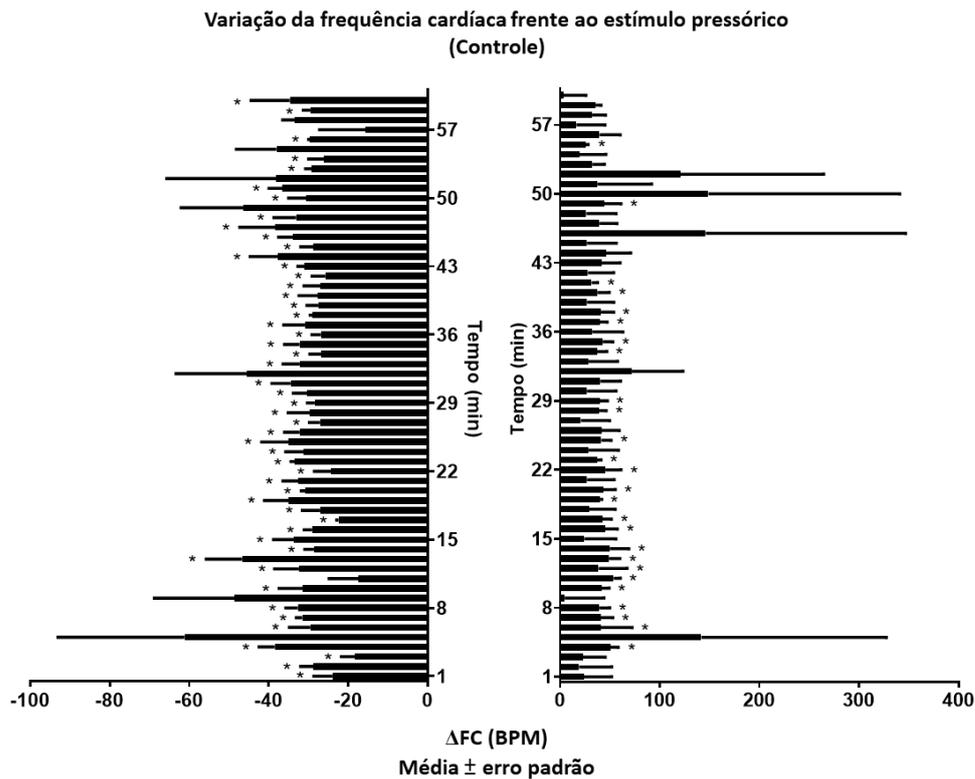


Figura 12 | Variação de frequência cardíaca (FC, positiva e negativa) na primeira hora após a administração de cetamina + xilazina frente ao estímulo pressórico na pata. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 5$.

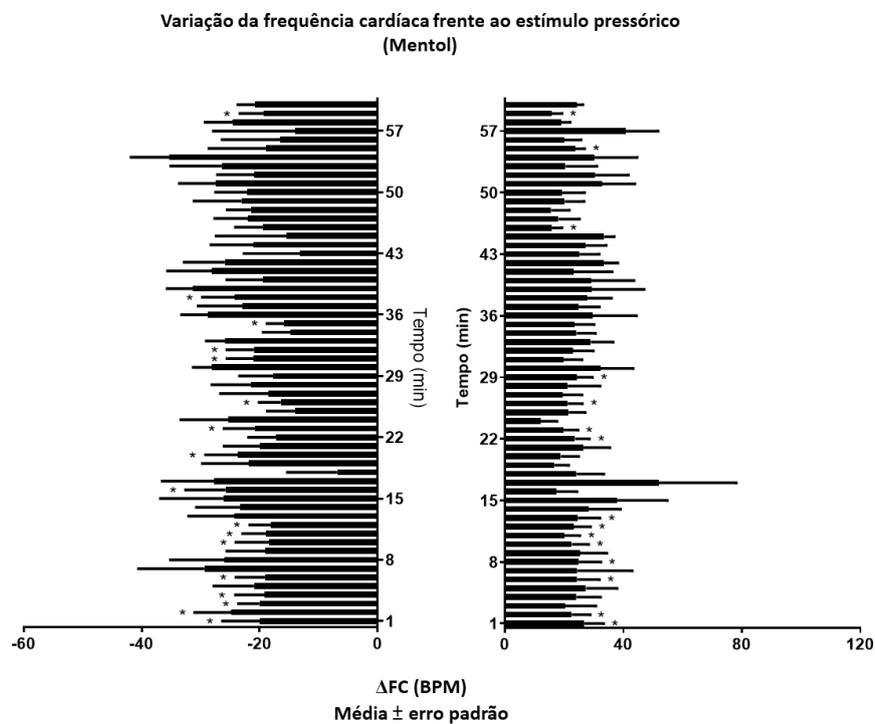


Figura 13 | Variação de frequência cardíaca (FC; positiva e negativa) na primeira hora após a administração de mentol frente ao estímulo pressórico na pata. * $P < 0,05$ vs 0 (ausência de alteração), teste “t”-Student. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N = 4$.

4.6. Frequência de ocorrência dos reflexos cardiovasculares

Não houve diferença na frequência de reflexos cardiovasculares entre os grupos tratados com cetamina com xilazina ou com mentol quando não havia reflexo motor (Figura 14A). Entretanto, quando o reflexo de retirada estava presente, a frequência de reflexos cardiovasculares foi maior no grupo tratado com mentol do que no grupo controle (Figura 14B).

Frequência de ocorrência de reflexo cardiovascular na presença e na ausência de reflexo motor

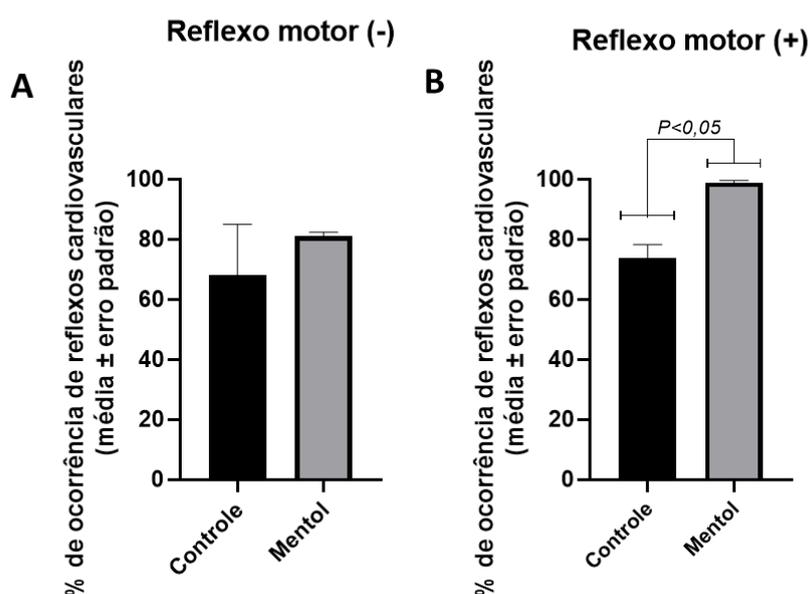


Figura 14 | A) Observação qualitativa da frequência de ocorrência de reflexos cardiovasculares na ausência de reflexo motor frente ao estímulo pressórico na pata após administração de cetamina + xilazina ou de mentol ($P=0.6667$, Mann Whitney). B) Observação qualitativa da frequência de ocorrência de reflexos cardiovasculares na presença de reflexo motor frente ao estímulo pressórico na pata após administração de cetamina + xilazina ou de mentol ($P=0.0159$, Mann Whitney). Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. $N=4-5$.

5. Discussão

O mentol produziu hipnose (inconsciência) e relaxamento muscular, como sugerido pela perda do reflexo de endireitamento observado (Figura 5A). A latência para a indução da hipnose foi maior no grupo tratado com mentol do que no grupo controle (Figura 6A), o que pode estar relacionado a diferenças tanto farmacocinéticas como farmacodinâmicas entre os dois tratamentos. A produção de hipnose é compatível com a atividade descrita para o mentol sobre o receptor $GABA_A$ (CORVALÁN; ZYGADLO; GARCÍA, 2009; HALL et al., 2004; LAU et al., 2014; ZHANG et al., 2008). Segundo

estudos anteriores, a ação do mentol sobre esse receptor é diferente daquela descrita para esteroides anestésicos, benzodiazepínicos e barbituratos, mas ocorre no mesmo sítio em que age o agente o hipnótico propofol (WATT et al., 2008). Assim como observado após a administração de propofol, o mentol promove excitação que precede a indução de hipnose; de fato, o mentol promove aumento na atividade locomotora em roedores com a administração de doses menores, seguido de efeitos depressores e perda de coordenação motora com doses maiores (SILVEIRA et al., 2014; UMEZU & MORITA, 2003).

Como relatado anteriormente, o mentol é capaz de ativar o receptor TRPM8 e KOZYREVA, KOZARUK & MEYTA (2019) descreveram que a ativação cutânea desse receptor está associada à elevação da pressão arterial. Por outro lado, o mentol pode promover vasodilatação e possui efeito anti-hipertensivo (SILVA, 2020). Vários mecanismos parecem estar envolvidos na dilatação vascular produzida pelo mentol, tais como: ativação endotelial do TRPM8 levando a um aumento na liberação de óxido nítrico (NO); bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L; inibição da via de sinalização RhoA/Rho quinase (SILVA, 2020). Assim, dada a via de administração utilizada, a diminuição da pressão arterial média observada em nosso estudo (Figura 7) era um efeito esperado.

A perda de reflexo de retirada não foi induzida em todos os animais (Figura 5B), apesar do longo período de hipnose (Figura 6B), o que sugere que a dose média de mentol administrada (1400 mg/kg) para induzir a perda de reflexo de endireitamento não foi suficiente para promover antinocicepção em todos os animais. Contudo, é importante ressaltar que a maioria dos animais (~67%) apresentou perda de reflexo de retirada, sugerindo algum nível de antinocicepção após a administração de mentol. Esse dado corrobora evidências previamente descritas por GALEOTTI et al. (2002) que relatam que a administração oral de mentol aumenta o limiar de dor no teste de placa quente e de que ambas administrações, oral e intracerebroventricular, causam analgesia no teste de contração abdominal. Ainda, como a literatura sugere que o mentol é capaz de inibir a deflagração de potenciais de ação em motoneurônios (KAWASAKI et al., 2013) poderíamos questionar o quanto dos efeitos observados em nosso estudo decorre de inibições em circuitarias do sistema nervoso central. Apesar de ser impossível separar componentes periféricos e centrais nos efeitos produzidos pelo mentol com os protocolos que empregamos, a magnitude da inibição dos reflexos cardiovasculares ao estímulo pressórico na pata (Figuras 11 e 13) sugere que ações centrais estavam presentes (variações muito maiores seriam esperadas caso não houvesse depressão significativa).

Cabe ressaltar que o efeito do mentol sobre os reflexos cardiovasculares foi similar ao observado com a administração de doses subanestésicas da mistura de cetamina com xilazina (Figuras 14A, 10 e 12). A incapacidade do mentol em inibir reflexos autonômicos ainda não havia sido descrita pela literatura. A elevada frequência de evocação de reflexos autonômicos, em animais que perderam o reflexo de retirada da pata frente a aplicação de estímulo pressórico, evidencia a presença de nocicepção nos animais tratados com mentol (Figura 14B). De fato, como nos explicam BROWN, PAVONE & NARANJO (2018) “se um paciente estiver inconsciente depois de receber apenas propofol e tem um aumento na frequência cardíaca e pressão arterial em resposta à incisão cirúrgica, este é um exemplo de nocicepção”. Assim, os efeitos centrais do mentol administrado isoladamente são incompatíveis com o que se espera de um estado de anestesia geral. Essa sugestão é reforçada pela observação de que a elevada dose de mentol empregada se associou a uma frequência de aparecimento de reflexos autonômicos, quando o reflexo de retirada também estava presente, que foi superior àquela observada no grupo subanestesiado com a mistura de cetamina com xilazina (figura 14B). Portanto, acreditamos que estudos adicionais possam fundamentar a utilização do mentol em associação com outras drogas objetivando produzir um estado de anestesia geral. Entretanto, com base em nossos dados, questionamos o uso dessa substância isoladamente como esse propósito.

6. Conclusão

Conclui-se que, apesar dos efeitos hipnótico/relaxante muscular e analgésico, elevadas doses de mentol são insuficientes para inibir a nocicepção e produzir efeitos compatíveis com um estado ideal de anestesia.

Referências

- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v. 520, p. 734999, 15 abr. 2020.
- BONHOMME, V. et al. General Anesthesia: A Probe to Explore Consciousness. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 13, 2019.
- BOTREL, B. M. C. et al. Development, Optimization, and Validation of the HS-SPME/GC-MS Method for the Residual Determination of Menthol in Fish. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 6, p. 1390–1398, 1 jun. 2019.
- BREUS, D. M. **Terpenes: they are not just in marijuana and they can help with sleep.** Disponível em: <<https://thesleepdoctor.com/2019/12/03/terpenes-they-are-not-just-in-marijuana-and-they-can-help-with-sleep/>>. Acesso em: 21 jun. 2020.
- BROWN, E. N.; PAVONE, K. J.; NARANJO, M. Multimodal General Anesthesia: Theory and Practice. **Anesthesia and Analgesia**, v. 127, n. 5, p. 1246–1258, nov. 2018.
- BURTON, A. R.; FAZALBHOY, A.; MACEFIELD, V. G. Sympathetic Responses to Noxious Stimulation of Muscle and Skin. **Frontiers in Neurology**, v. 7, 30 jun. 2016.
- CALIXTO, J. B.; CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CAN, E. et al. Anesthetic Efficiency of Three Medicinal Plant Oils for Aquatic Species: Coriander *Coriandrum sativum*, Linaloe Tree *Bursera delpechiana*, and Lavender *Lavandula hybrida*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 31, n. 3, p. 266–273, 2019.
- CHENG, G.; KENDIG, J. J. Pre- and postsynaptic volatile anaesthetic actions on glycinergic transmission to spinal cord motor neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 673–684, jul. 2002.
- CORTELLI, P. et al. Nociception and autonomic nervous system. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 41–46, 1 maio 2013.
- CORVALÁN, N. A.; ZYGADLO, J. A.; GARCÍA, D. A. Stereo-selective activity of menthol on GABAA receptor. **Chirality**, v. 21, n. 5, p. 525–530, 2009.
- COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. **Medicinal Plants**, p. 333–359, 12 nov. 2019.
- DE MATOS, S. P. et al. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 138, abr. 2019.
- DEBNATH, B. et al. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 56–72, 1 set. 2018.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2002.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 16 abr. 2012.

- EILERS, H.; YOST, S. General Anesthetics. In: KATZUNG, B. G. (Ed.). . **Basic & Clinical Pharmacology**. 14. ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2017.
- ERRINGTON, A. C.; GIOVANNI, G. D.; CRUNELLI, V. **Extrasynaptic GABAA Receptors**. [s.l.] Springer, 2014.
- FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 607–614, fev. 1994.
- GALEOTTI, N. et al. Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. **Planta Medica**, v. 67, n. 2, p. 174–176, mar. 2001.
- GALEOTTI, N. et al. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, n. 3, p. 145–148, abr. 2002.
- GARCIA, P. S.; KOLESKY, S. E.; JENKINS, A. General Anesthetic Actions on GABAA Receptors. **Current Neuropharmacology**, v. 8, n. 1, p. 2–9, mar. 2010.
- GAUDIOSO, C. et al. Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. **PAIN**, v. 153, n. 2, p. 473–484, 1 fev. 2012.
- GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243–265, mar. 2014.
- HALL, A. C. et al. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n. 1, p. 9–16, dez. 2004.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141–1148, 1 abr. 1983.
- HAWKLEY, T. F.; PRESTON, M.; MAANI, C. V. Isoflurane. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- HOWES, M.-J. R. et al. Role of phytochemicals as nutraceuticals for cognitive functions affected in ageing. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 6, p. 1294–1315, 2020.
- HUANG, H.-L. et al. Effects of essential oils on the formation of formaldehyde and secondary organic aerosols in an aromatherapy environment. **Building and Environment**, v. 57, p. 120–125, 1 nov. 2012.
- IASP Terminology - IASP**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- JIA, F. et al. Isoflurane is a potent modulator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 3, p. 1127–1135, mar. 2008.
- JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 345–358, mar. 2016.

KAMIYA, Y. et al. Inhibitory Effects of Barbiturates on Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Central Nervous System Neurons. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 94, n. 4, p. 694–704, 1 abr. 2001.

KASAI, M.; HOSOSHIMA, S.; YUN-FEI, L. Menthol Induces Surgical Anesthesia and Rapid Movement in Fishes. **The Open Neuroscience Journal**, v. 8, n. 1, 7 fev. 2014.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 155–176, 1 mar. 2016.

KAWASAKI, H. et al. Inhibition by menthol and its related chemicals of compound action potentials in frog sciatic nerves. **Life Sciences**, v. 92, n. 6, p. 359–367, 14 mar. 2013.

KOZYREVA, T.; KOZARUK, V.; MEYTA, E. Effect of the Peripheral Trpm8 Ion Channel Activation on the Cardiovascular Parameters. **International Archives of Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, 6 jul. 2019.

LAU, B. K. et al. Menthol enhances phasic and tonic GABAA receptor-mediated currents in midbrain periaqueductal grey neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 11, p. 2803–2813, jun. 2014.

LEWIS, C. B.; ADAMS, N. Phenobarbital. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

LIM, P. F. C.; LIU, X. Y.; CHAN, S. Y. A Review on Terpenes as Skin Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 5, p. 423–428, 1 set. 2009.

LIU, B. et al. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. **Pain**, v. 154, n. 10, p. 2169–2177, out. 2013.

MANAYI, A. et al. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 671–679, 1 jul. 2016.

OKUGAWA, H. et al. Effect of jinkoh-eremol and agarospirol from agarwood on the central nervous system in mice. **Planta Medica**, v. 62, n. 1, p. 2–6, fev. 1996.

OZ, M. et al. Cellular and Molecular Targets of Menthol Actions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

PAVEL, M. A. et al. Studies on the mechanism of general anesthesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 24, p. 13757–13766, 16 jun. 2020.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 23 maio 2020.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p. 120, 8 fev. 2008.

- SCHRÖR, K. **Acetylsalicylic Acid**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2016.
- SEPULCHRO, L. C. O. 'R et al. Salinity does not alter the effectiveness of menthol as an anesthetic and sedative during the handling and transport of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 3, p. 757–763, set. 2016.
- SHIRAIISHI, M. et al. A Neurosteroid Anesthetic, Alphaxalone, Inhibits Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells: **Anesthesia & Analgesia**, v. 95, n. 4, p. 900–906, out. 2002.
- SILVEIRA, N. S. DA et al. The Aversive, Anxiolytic-Like, and Verapamil-Sensitive Psychostimulant Effects of Pulegone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 771–778, 2014.
- SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613–620, jun. 2009.
- SPANGHERO, D. B. N. et al. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.
- STRUCK, M. B. et al. Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 50, n. 3, p. 344–8, 2011.
- TAKEMOTO, H. et al. Inhalation administration of the sesquiterpenoid aristolen-1(10)-en-9-ol from *Nardostachys chinensis* has a sedative effect via the GABAergic system. **Planta Medica**, v. 81, n. 5, p. 343–347, mar. 2015.
- TAVERNA, F. A. et al. Sensitivity of AMPA receptors to pentobarbital. **European Journal of Pharmacology**, v. 267, n. 3, p. R3-5, 17 maio 1994.
- TETA, C.; KAISER, H. Menthol as an alternative anaesthetic and sedative for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **African Journal of Aquatic Science**, v. 44, n. 1, p. 71–76, 2 maio 2019.
- TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Introduction: Use, Definitions, History, Concepts, Classification, and Considerations for Anesthesia and Analgesia. In: **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 1–10.
- TSUCHIYA, H. Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 8, 18 ago. 2017.
- UEHARA, S. A. et al. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. **Aquaculture**, v. 502, p. 326–331, 15 mar. 2019.
- UMEZU, T.; MORITA, M. Evidence for the Involvement of Dopamine in Ambulation Promoted by Menthol in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 91, n. 2, p. 125–135, 2003.
- VALLEJO, A. G. et al. Propofol-induced deep sedation reduces emotional episodic memory reconsolidation in humans. **Science Advances**, v. 5, n. 3, p. eaav3801, 1 mar. 2019.

WALLACH, O. Zur Kenntniss der Terpene und ätherischen Oele. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 238, n. 1-2, p. 78–89, 1 jan. 1887.

WATT, E. E. et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, n. 1–3, p. 120–126, ago. 2008.

XIAO, J.; BAI, W. Bioactive phytochemicals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 827–829, 26 mar. 2019.

YAMAKURA, T. et al. The sensitivity of AMPA-selective glutamate receptor channels to pentobarbital is determined by a single amino acid residue of the $\alpha 2$ subunit. **FEBS Letters**, v. 374, n. 3, p. 412–414, 6 nov. 1995.

YAMAKURA, T. et al. Anesthetics and Ion Channels: Molecular Models and Sites of Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 23–51, 2001.

YIP, G. M. S. et al. A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 11, p. 715–720, nov. 2013.

ZHANG, X.-B. et al. A-Type GABA Receptor as a Central Target of TRPM8 Agonist Menthol. **PLOS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3386, 13 out. 2008.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
_ Comissão de Ética na Utilização de Animais _



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocolo nº 047/18, sob a responsabilidade de **Luiz Borges Bispo-da-Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 24 de Agosto de 2018.

(We certify that the project entitled “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocol 047/18, under the responsibility of - Luiz Borges Bispo-da-Silva involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of August 24th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 01/10/2018 Término: 31/07/2019
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Wistar
Número de animais	18
Peso/Idade	200 – 250g
Sexo	Machos
Origem/Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) - UFU

Uberlândia, 29 de agosto de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO II



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocolo nº 047/18, sob a responsabilidade de **Luiz Borges Bispo-da-Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 15 de Março de 2019.

(We certify that the project entitled intitulado “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocol 047/18, under the responsibility of - Luiz Borges Bispo-da-Silva involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 15th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 01/10/2018 Término: 31/07/2019
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Wistar
Número de animais	18
Peso/Idade	200 – 250g
Sexo	Machos
Origem/Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

Alteração realizada: Modificação nas doses inoculados nos animais de experimentação: Mentol e Pulegona - de 500 mg/kg para 1000 mg/kg, seguidos de suplementação caso seja necessário (500 mg/kg a cada 30 min, até que o animal perca o reflexo de endireitamento ou até que se atinja a dose total de 3000 mg/kg).

Uberlândia, 18 de Março de 2019

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocolo nº 047/18, sob a responsabilidade de **Luiz Borges Bispoda-Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **07 de Junho de 2019**.

(We certify that the project entitled intitulado “Efeito anestésico do mentol e da pulegona: avaliação da inibição de reflexos autonômicos”, protocol 047/18, under the responsibility of - **Luiz Borges Bispo-da-Silva** involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 07th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 01/10/2018 Término: 30/11/2019
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico Wistar
Número de animais	23
Peso/Idade	200 – 250g
Sexo	Machos
Origem/Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIRUFU).
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIRUFU).

Alteração realizada Solicitação de mais cinco animais para término dos experimentos e alteração da data de finalização do projeto de 31/07/19 para 30/11/19.

Uberlândia, 11 de Junho de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU

Coordenador da CEUA | Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019