

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO MONOTERPENO TERPINOLENO NA DOR INFLAMATÓRIA

Lívia Queiroz de Sousa (Bolsista PIBIC/UFPI), Profa. Dra Fernanda Regina de Castro Almeida (Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia/NPPM/CCS/UFPI), Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa (Colaborador/UFS), MSc Joelma Barbosa de Moura (Colaboradora/UFPI)

1. INTRODUÇÃO

O terpinoleno é um monoterpene encontrado na constituição química de óleos essenciais de diversas espécies vegetais nas mais variadas concentrações. Muitos derivados monoterpênicos têm demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo sedativa, antinociceptiva e antidepressiva. Diante da ocorrência do terpinoleno, em espécies vegetais farmacologicamente ativas, como por exemplo, *Protium heptaphyllum*, e da semelhança com monoterpenos que apresentam atividade antinociceptiva comprovada, como o limoneno, justifica-se a realização do presente estudo.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito do terpinoleno em modelo de hipernocicepção inflamatória, induzida pela carragenina e por CFA (Adjuvante Completo de Freund), bem como avaliar o efeito central do mesmo através da atividade motora no campo aberto.

3. METODOLOGIA

Nesta investigação foi utilizada a substância terpinoleno (TPL) fornecida pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, membro do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (LAPROBIO) da Universidade Federal de Sergipe. Os animais utilizados foram fornecidos pelo biotério do NPPM/CCS/UFPI. Utilizaram-se camundongos Swiss machos (20-30 g/ n=6-9) e ratos Wistar (180-220 g/ n= 6-10), machos. Os protocolos deste projeto foram aprovados junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número 010/2008.

Para a realização do protocolo de hipernocicepção induzida por carragenina (Cg), inicialmente ratos machos (n= 6-9) foram tratados com o TPL (12,5; 25 e 50 mg/kg v.o.), veículo (água + Tween 80 a 3%, 0,5 mL/100 g) ou Indometacina (10 mg/kg, v.o.). Uma hora depois os animais receberam uma injeção de Cg 1% (100 µL/pata). Verificou-se a pressão exercida na pata pelo von Frey digital, em diferentes tempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas). O anestesímetro eletrônico utilizado consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). No teste de hipernocicepção induzida por CFA (Adjuvante completo de Freund), ratos Wistar machos foram avaliados quanto às medidas basais referentes à estimulação mecânica, sendo realizada antes da injeção intraplantar (i.pl.) de qualquer agente. Os animais receberam injeção i.pl. de 100 µL de CFA (0,5 mg/ml *Mycobacterium butyricum*) na pata traseira direita. Os animais do grupo controle receberam injeção i.pl. de solução salina contendo o mesmo volume referente ao CFA. 24 horas após a administração i.pl. de CFA e salina, um grupo de animais (n=6) foi tratado com 50 mg/kg de TPL e submetidos ao teste de von Frey digital em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h). Para investigar os efeitos do tratamento crônico frente à hipersensibilidade mecânica, os animais receberam o TPL (50 mg/kg, v.o) uma vez por dia, com intervalo de 48 horas a cada administração, durante um período de 10 dias. O tratamento foi interrompido no 7º dia e retomado no 9º dia, para investigar a possibilidade de desenvolvimento de tolerância. A avaliação das respostas

nociceptivas foi realizada no horário caracterizado pela inibição máxima, observada no tratamento agudo.

No intuito de verificar uma possível atividade depressora, os animais foram tratados com TPL (50 mg/kg, p.o.) e veículo apenas, sem a presença do estímulo e submetidos ao teste de von Frey digital. Para avaliação da atividade motora espontânea utilizou-se o modelo de campo aberto, em que os animais foram tratados com TPL (3,125 e 50 mg/kg, p.o) e veículo 1 hora antes, e diazepam (4 mg/kg, i.p) 30 minutos antes de serem levados individualmente ao campo aberto e observados por um período de 5 minutos. Os resultados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Bonferroni ou por teste de Mann Whitney. A significância considerada foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

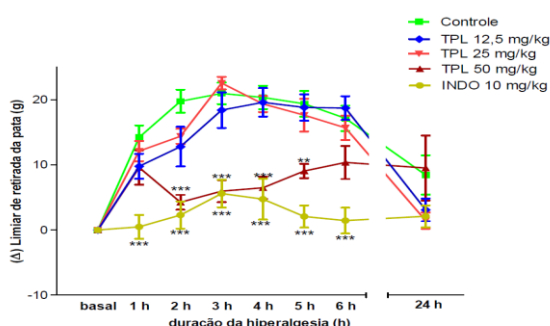


Figura 1. Efeito do terpinoleno (TPL) sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por Cg a 1% (100 µL/pata) no teste do von Frey digital em ratos. Cada hora representa a média ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (g) de 6 a 9 animais tratados com o TPL (12,5; 25 e 50 mg/kg v.o.), (Indometacina – 10mg/kg, v.o.) e Controle, 60 min antes da aplicação de carragenina e leitura após uma hora do estímulo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado ao veículo) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

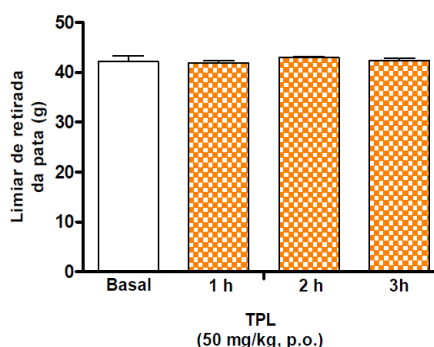


Figura 3. Efeito do terpinoleno (TPL) sobre a alteração do limiar de retirada da pata (g) na ausência de estímulo nociceptivo no teste do von Frey digital em ratos Wistar machos. Cada hora representa a média ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (g) de 6 a 9 animais tratados com o TPL (50 mg/kg, p.o.), 60 minutos antes da leitura. (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

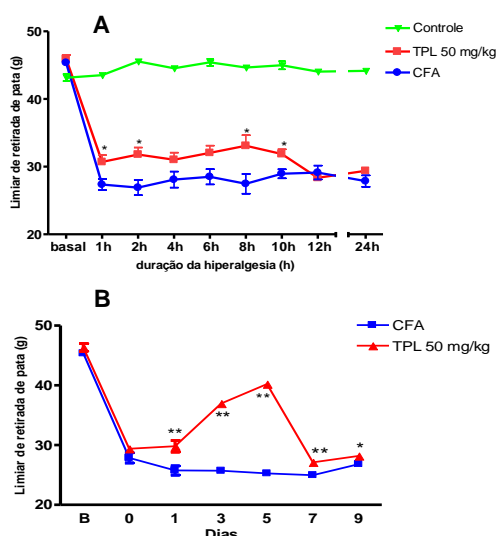


Figura 2. Efeito da administração aguda (A) e crônica (B) de 50 mg/kg de terpinoleno (TPL) sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por injeção de 100 µL de CFA (0,5 mg/ml *Mycobacterium butyricum*) na pata traseira direita de ratos Wistar machos. Cada ponto representa a média ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (g) dos animais (n=6) tratados com o TPL (50 mg/kg v.o.) e salina (A), 24 horas após aplicação de CFA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (A) comparado ao controle; (B) comparado ao grupo CFA (Teste de Mann Whitney).

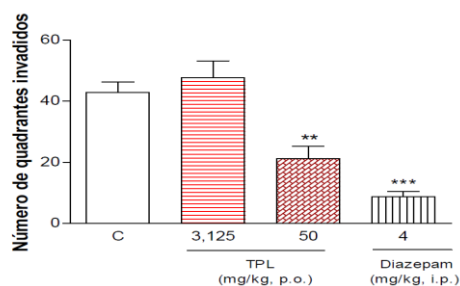


Figura 4. Efeito do terpinoleno (TPL) sobre a frequência de locomoção espontânea de camundongos Swiss machos no teste de campo aberto. Cada grupo representa a média ± E.P.M. do tempo de reação de 6 a 9 animais tratados com o TPL (3,125 e 50 mg/kg p.o.), veículo (C) e diazepam (4 mg/kg s.c.), 60 e 30 minutos antes da avaliação (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, vs (C))(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Foram investigadas baixas doses orais de terpinoleno (12,5, 25 e 50 mg/kg) frente à hipernocicepção induzida por carragenina, utilizando-se o modelo von Frey digital. Na Figura 1, observam-se as curvas correspondentes às variações do limiar de resposta dos ratos tratados com o terpinoleno nas doses citadas, bem como os grupos controles negativo e positivo (indometacina). O TPL na dose de 50 mg/kg reduziu significativamente o índice de hipernocicepção nas 2^a, 3^a, 4^a e 5^a horas após o estímulo, enquanto as menores doses testadas não apresentaram efeito significativo. Dessa forma, pode-se considerar o aumento do limiar de resposta na fase inicial (2h) como resultante de uma possível influência do monoterpene na liberação ou atuação de H, 5-HT e/ou BK, bem como na síntese, liberação ou atuação de prostaglandinas, devido à resposta significativa obtida durante toda a fase tardia (3-5 h) (DI ROSA E WILLOUGHBY, 1971).

O resultado obtido ofereceu subsídios para a investigação da ação do TPL, utilizando mediadores mais específicos. Dados da literatura mostram que a injeção intraplantar de CFA produz hipersensibilidade persistente resultante de uma resposta inflamatória de longa duração que se desenvolve rapidamente, dentro de poucas horas (BATISTA et al., 2010). Dessa forma, utilizou-se a maior dose testada (50 mg/kg) para a investigação do efeito do TPL na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por CFA, no teste de von Frey digital. O efeito antinociceptivo do tratamento agudo com TPL em sensibilidade mecânica mostrou-se significativo nas 1^a, 2^a, 8^a e 10^a hora, após as 24 horas da administração do adjuvante (Fig. 2A). Além disso, o tratamento prolongado por via oral de TPL uma vez ao dia, com intervalo de 48 horas a cada administração, reduziu significativamente a hipersensibilidade testada (Fig. 2B).

Para verificar uma atividade depressora na ação antinociceptiva, os animais foram tratados com TPL e veículo, sob ausência de qualquer estímulo inflamatório ou submetidos ao modelo de campo aberto. O TPL em uma dose de 50 mg/kg não alterou de forma significativa o limiar basal de resposta dos animais, demonstrado no von Frey digital (Fig. 3), sugerindo que a substância testada não promove alterações diretas (na sua função) ou indiretas (via SNC) no neurônio periférico. Por outro lado, os animais submetidos ao teste de campo aberto que receberam o TPL na mesma dose (50 mg/kg) mostraram redução da atividade motora, o que sugere um possível efeito depressor central (Fig. 4).

5. CONCLUSÃO

O terpinoleno exerce efeito na hipernocicepção inflamatória aguda e crônica induzida por CFA e em ambas as fases da inflamação induzida por carragenina. Além disso, pode-se inferir que a ação antinociceptiva ocorrida em doses mais elevadas de TPL, está associada a um efeito depressor central, embora não altere o limiar nociceptivo mecânico das fibras aferentes.

6. APOIO: FINEP/PIBIC/UFPI

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, J.F., et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-()-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p. 1217-1220, 2007.
2. DI ROSA, M.; D. A. WILLOUGHBY. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and pharmacology** 23: 297, 1971.
3. LEITE, M.P., FASSIN JR., J., BAZILONI, E.M.F., ALMEIDA, R.N., MATTEI, R., LEITE JR., Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18 (Supl.), p. 661-666, 2008.
4. BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F. S.; STORY, G. M.; SANTOS, A. R. S. The antinociceptive effect of (-)- linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **The Journal of Pain**, v.11, p.1222-1229, 2010.

8. PALAVRAS-CHAVE: terpinoleno, monoterpene, dor inflamatória.