



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ARATÃ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
ENANTIÔMEROS DE CITRONELAL: UMA ABORDAGEM *in silico* E *in vivo***

JOÃO PESSOA-PB

2023

ARATÃ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
ENANTIÔMEROS DE CITRONELAL: UMA ABORDAGEM *in silico* E *in vivo***

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde e Universidade Federal da Paraíba, para fins de obtenção do título de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacologia

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ricardo Dias Castro

COORIENTADOR

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA-PB

2023

Ficha catalográfica

Catalogação na publicação Seção de Catalogação e Classificação

C837a Costa, Aratã Oliveira Cortez.

Avaliação comparativa da atividade antinociceptiva de enantiômeros de citronelal : uma abordagem in silico e in vivo / Aratã Oliveira Cortez Costa. - João Pessoa, 2023.

106 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias Castro.

Coorientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Monoterpenos. 3. Citronelal. 4. Nocicepção. 5. Docking molecular. I. Castro, Ricardo Dias. II. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9 (043)

ARATÃ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
ENANTIÔMEROS DE CITRONELAL: UMA ABORDAGEM *in silico* E *in vivo***

Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
RICARDO DIAS DE CASTRO
Data: 07/11/2023 11:03:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Presidente
(Orientador)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba
(Coorientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br
DIOGO VILAR DA FONSECA
Data: 08/11/2023 15:21:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira
Universidade Estadual da Paraíba
(Examinador Externo Titular)



Documento assinado digitalmente
CICERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE
Data: 22/11/2023 09:14:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br
FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA
Data: 09/11/2023 18:49:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno Titular)

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno Titular)

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande
(Examinador Externo Suplente)

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Universidade Federal da Paraíba
(Examinadora Interna Suplente)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me foram exemplos, nunca deixaram de acreditar em mim e por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família e amigos por todo suporte, apoio e paciência em tempos difíceis, pois quando precisei estavam sempre lá e nunca deixaram de acreditar na minha capacidade e certeza de que tudo daria certo. Especialmente à minha tia Jussara e meu primo Pedro, que foram como mãe e irmão pra mim por esse tempo e serão por todo sempre.

À Dayane e Beatriz, que me incentivaram a acreditar em mim mesmo e estiveram ao meu lado por algum momento deste percurso, por algumas vezes que pensei que não conseguiria e que não teria mais como prosseguir, via em vocês a imagem de todos que acreditavam em mim e me davam forças para continuar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro, um exemplo de pessoa e profissional, que me possibilitou adicionar este degrau de conhecimento e estudo na minha vida. Por sempre estar disponível e por toda paciência que teve ao lidar com minhas faltas de prazo e indisciplina, serei sempre grato pela sua humanidade e empatia e por me mostrar como age um profissional bem realizado e ciente de suas capacidades, sem abandonar o lado humano, social e amigo que este papel lhe traz.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, hoje na função de meu co-orientador, que me cedeu espaço para a realização do doutorado bem como me incentivou e me trouxe vários ensinamentos na vida acadêmica.

Tenho imensa gratidão à minha primeira orientadora Prof. Edeltrudes, por me introduzir no mundo da pesquisa e por todos esses ensinamentos durante todo esse tempo que sou seu orientando e aluno, foram diversos aprendizados na área científica e na vida.

A todos do Laboratório de PsicoFarmacologia da UFPB, e demais orientandos dos professores Reinaldo e Ricardo, pela ajuda nos experimentos e adicional de conhecimento que trouxeram na minha vida. Em especial ao Humberto Hugo que agiu sempre como um capitão nos meus experimentos, e quem me acompanhou na maioria deles, bem como Tereza, Renaly, Ana Karoline, Gleyce, Paloma, Paula e todos os demais que me auxiliaram nos experimentos, saibam que sem vocês este trabalho não seria possível e tem minha plena gratidão.

À pessoa de Natália e aos professores Luciana Scotti e Marcus Tullius Scotti, pela possibilidade de realização dos estudos de *Docking* molecular e por todo o conhecimento proveniente deste.

A todos os professores, servidores e secretárias do Programa PgPNSB, pela honra de nos disponibilizar seus conhecimentos e pelo tempo e esforço gasto com nosso aprendizado e concretização deste sonho.

**“Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes.”**

Isaac Newton

RESUMO

Devido à complexidade da dor, que abrange aspectos físicos, cognitivos, psicológicos e comportamentais, o manejo da dor envolve diversas abordagens, em especial em países em desenvolvimento, onde a busca por novas opções de tratamento para doenças emergentes ou debilitantes é significativa, o uso de plantas medicinais é uma prática relevante. Estudos recentes têm se concentrado na atividade dos monoterpenos nos receptores relacionados à nociceção, e a identificação das interações específicas dos monoterpenos promete abrir portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no controle da dor. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar comparativamente os efeitos do monoterpeno citronelal, distinguindo suas atividades para os isômeros (R)-(+) e (S)-(-) citronelal e determinar o possível mecanismo de ação pelo qual essa atividade é realizada. Como forma de estudo inicial foi realizada um analise computacional de *docking* molecular onde os compostos (R)-Citronelal e (S)-Citronelal apresentaram afinidade nos receptores glutamatérgicos e TRPA1, indicando seu potencial como agentes ativos nessas vias e abrindo prerrogativa para os estudos *in vivo*. Para isso foram utilizadas metodologias relacionadas ao estudo da coordenação motora (Rota-rod), bem como avaliação da nociceção em parâmetros físicos (Placa quente) e químicos (Formalina, glutamato e capsaicina), para confirmação de sua atividade e possível detecção de mecanismo de ação. Ambos os isômeros não demonstraram efeitos significativos na coordenação motora dos animais testados. O isômero (S)-(-) citronelal apresentou melhores resultados em relação ao seu homólogo estrutural, mostrando efeito antinociceptivo nos testes de formalina e placa quente, mesmo em menor concentração (100 mg/kg), e com menos efeitos colaterais. No entanto, o estudo não conseguiu elucidar completamente o mecanismo de ação desse isômero, por sua atividade não ser revertida com a utilização de antagonistas para as vias relacionadas à nociceção. Por outro lado, o isômero (R)-(+) citronelal demonstrou atividade somente na concentração de 150 mg/kg e teve seu mecanismo de ação relacionado à via opioide, uma via já correlacionada com tratamentos de controle da nociceção, embora também associada a efeitos colaterais indesejados. Destacando a importância de futuras pesquisas para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da dor e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o manejo da dor. Portanto, os monoterpenos, mostram-se promissores como agonistas ou moduladores potenciais dos receptores do controle da dor.

Palavras-chave: monoterpenos; citronelal; nociceção; *docking*;.; enantiomeros.

ABSTRACT

Due to the complexity of pain, encompassing physical, cognitive, psychological, and behavioral aspects, the management of pain involves various approaches, especially in developing countries, where the search for new treatment options for emerging or debilitating diseases is significant; the use of medicinal plants is a relevant practice. Recent studies have focused on the activity of monoterpenes on nociception-related receptors, and the identification of specific interactions of monoterpenes promises to pave the way for the development of new therapeutic strategies in pain control. In this context, the present study aimed to comparatively evaluate the effects of the monoterpene citronellal, distinguishing its activities for the isomers (R)-(+) and (S)-(-) citronellal and determining the possible mechanism of action by which this activity is performed. As an initial study, a computational molecular *docking* analysis was performed, where the compounds (R)-Citronellal and (S)-Citronellal showed affinity for glutamatergic receptors and TRPA1 receptors, indicating their potential as active agents in these pathways and opening the way for *in vivo* studies. Methodologies related to the study of motor coordination (Rotarod), as well as the evaluation of nociception in physical (Hot plate) and chemical (Formalin, glutamate, and capsaicin) parameters, were used to confirm their activity and possible detection of the mechanism of action. Both isomers did not demonstrate significant effects on the motor coordination of the tested animals. The isomer (S)-(-) citronellal showed better results compared to its structural homologue, exhibiting antinociceptive effects in the formalin and hot plate tests, even at a lower concentration (100 mg/kg), and with fewer side effects. However, the study did not fully elucidate the mechanism of action of this isomer, as its activity was not reversed with the use of antagonists for nociception-related pathways. On the other hand, the isomer (R)-(+) citronellal demonstrated activity only at a concentration of 150 mg/kg and had its mechanism of action related to the opioid pathway, a pathway already correlated with nociception control treatments, although also associated with unwanted side effects. This underscores the importance of future research to elucidate the molecular mechanisms involved in pain modulation and the development of more effective therapeutic strategies for pain management. Therefore, monoterpenes show promise as agonists or potential modulators of pain control receptors.

Keywords: monoterpenes; citronellal; nociception; *docking*; enantiomers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central. Fibras aferentes primárias A β , A δ e C cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) que transmitem impulsos da periferia ao corno dorsal da medula. Os neurônios de segunda ordem transmitem o impulso ao sistema nervoso central.....22
- Figura 2-** Estruturas químicas do (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal.....33
- Figura 3-** Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **mGluR6**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A**) Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B**) (R)-(+) citronelal; e **C**) (S)-(-) citronelal.....56
- Figura 4-** Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **NMDA**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A**) Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B**) (R)-(+) citronelal; e **C**) (S)-(-) citronelal.....57
- Figura 5-** Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **AMPA**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A**) Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B**) (R)-(+) citronelal; e **C**) (S)-(-) citronelal.....58
- Figura 6 -** Interações 2D e 3D entre o Controle positivo 3-cloro-N-(piridin-3-ilmetil)-1-benzotiofeno-2-carboxamida e o receptor de Glutamato 6. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, azul e em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.....59
- Figura 7-** Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Perampanel e o receptor de Glutamato AMPA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.....59
- Figura 8 -** Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Dizocilpine e o receptor de Glutamato NMDA. As ligações de hidrogênio são

destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.....**59**

Figura 9- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **kappa opióide**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do JDTic, como ligante padrão; **B)** (R)-(+) citronelal; e **C)** (S)-(-) citronelal.....**63**

Figura 10- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **delta opióide**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do naltrindol, como ligante padrão; **B)** (R)-(+) citronelal; e **C)** (S)-(-) citronelal.....**64**

Figura 11- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **mü opióide**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do JDTic, como ligante padrão; **B)** (R)-(+) citronelal; e **C)** (S)-(-) citronelal.....**65**

Figura 12- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **TRPV1**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do Capsaicina, como ligante padrão; **B)** (R)-(+) citronelal; e **C)** (S)-(-) citronelal.....**68**

Figura 13- Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Capsazepina e o receptor Transient TRPM-8. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.....**69**

Figura 14 - Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Borneol e o receptor Transient TRPA1. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa.....**70**

Figura 15 - Efeito dos isômeros do citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de permanência (s) dos animais na rota rod. A coluna representa a média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal vs. controle e Diazepam vs. controle.....**73**

Figura 16 - Efeito do (S)-(-)-citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de latência (s) dos animais na placa quente. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: (S)-(-)-citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.....75

Figura 17 - Efeito do (R)-(+)-citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de latência (s) dos animais na placa quente. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: (R)-(+)-citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.....75

Figura 18 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambida (s) dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra a primeira fase (Fase neurogênica) do teste da formalina, 0 - 5 min. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.....77

Figura 19 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambida (s) dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra a segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, 15 - 30 min. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.....78

Figura 20 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambida (s) dos animais no teste da formalina, com ou sem presença de naloxona (Nal). O gráfico mostra (A) a primeira fase (Fase neurogênica), pelo tempo decorrido de 0-5 min, e (B) segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, entre 15 - 30 min. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal com e sem naloxona vs. controle e Morfina com ou sem naloxona vs. controle.....79

Figura 21 - Efeito do (S)-(-)-citronelal (100 mg/kg, i.p.) (Citro) no tempo de lambida (s) dos animais nos testes específicos de alvo nociceptivo. Teste de Glutamato (A) e Teste de Capsaicina (B). A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: (S)-(-)-citronelal vs. Glutamato; MK vs. Glutamato; (S)-(-)-citronelal vs. Capsaicina e Morfina vs. Capsaicina....82

Figura 22 - Efeito do (S)-(-) citronelal (CT) (100 mg/kg, i.p.), no tempo de lambida dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra (A) a primeira fase (Fase neurogênica), pelo tempo decorrido de 0-5 min, e (B) segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, compreendido entre 15 - 30 min do teste. A coluna representa a média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: (S)-(-) citronelal vs. controle; (S)-(-) citronelal + antagonistas vs. controle e Morfina vs. controle.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tipos de fibras axoniais aferentes primárias.....	23
Tabela 2 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.....	40
Tabela 3 – Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.....	51
Tabela 4- <i>Docking</i> realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores Glutamatérgicos, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.....	53
Tabela 5- <i>Docking</i> realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores opióides, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.....	61
Tabela 6- <i>Docking</i> realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores de potencial transitório, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala - Alanina

Arg – Arginina

Asp - Aspartato

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

COX - Cicloxygenase

CT, CTL- Citronelal

DL50 - Dose letal média

E.P.M. - Erro padrão da média

GABAa -Receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A

GABAb -Receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo B

GLU - Glutamato

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

Ile - Isoleucina

Leu - Leucina

Met- Metionina

MGluR6 – Receptor metabotrópico do glutamato tipo 6

MK 801 – Dizocilpine

Nal - Naloxona

NMDA - N-metil D-Aspartato

PDB – Protein Data Bank

PG's – Prostaglandina

Phe – Fenilalanina

Pro - Prolina

Ser - Serina

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

TWEEN 80 - Polioxetileno sorbitano monoleato 80

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

Thr- Treonina

Trp – Triptofano

Tyr - Tirosina

Val - Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 DOR E NOCICEPÇÃO	21
2.2 DOCKING E ESTUDOS <i>in silico</i>	28
2.3 TESTES <i>in vivo</i> PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	30
2.4 PRODUTOS NATURAIS.....	3031
3. OBJETIVOS	366
3.1 OBJETIVO GERAL	366
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Erro! Indicador não definido. 6
4. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido. 7
4.1 MATERIAIS E INFRAESTRUTURA.....	37
4.2 ENSAIOS <i>in silico</i>	39
4.2.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0.....	42
4.3 ENSAIOS <i>in vivo</i>	44
4.3.1 Triagem Farmacológica.....	44
4.3.2 Avaliação da coordenação motora (teste do rota-rod).....	44
4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	45
4.3.4 Análise pela via opióide.....	47
4.3.5 Avaliação antinociceptiva com alvos específicos.....	47
4.3.6 Avaliação de mecanismo de ação utilizando antagonistas específicos....	48
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1 DOCKING MOLECULAR.....	51
5.1.2 Receptores glutamatérgicos.....	52
5.1.3 Receptores opioides.....	60
5.1.3 Receptores de potencial transitório.....	66

5.2	TESTES <i>in vivo</i>	72
5.2.1	Triagem Farmacológica.....	72
5.2.2	Avaliação da coordenação motora (teste do rota-rod).....	73
5.2.3	Avaliação da atividade antinociceptiva.....	76
5.2.4	Análise pela via opioide.....	79
5.2.5	Avaliação antinociceptiva com alvos específicos.....	81
5.2.6	Avaliação de mecanismo de ação utilizando antagonistas específicos.....	85
6.	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

No século passado, a dor era considerada uma resposta sensorial inevitável à lesão tecidual. As outras dimensões da experiência dolorosa, como componente afetivo, cognitivo, diferenças genéticas, ansiedade e expectativa, eram pouco valorizadas. Na última década grandes avanços foram feitos na compreensão dos mecanismos que são subjacentes à dor e no seu tratamento (GOZZANI, 2003; NICHILATTI, et al., 2020). A dor pode apresentar diferentes características e interpretações, como intensidade, localização, duração e frequência. Com isso a sua subjetividade sempre foi importante e sua definição sempre passou por formações de estigmatizações e relativismos, assim ela sempre acompanhou o ser humano no seu processo evolutivo, afetando desde as antigas civilizações até a atualidade (GOLDBERG, 2017).

A dor é um problema de saúde com implicações socioeconômicas. Nos Estados Unidos, estima-se que a prevalência de dor crônica seja de 30%, gerando um custo de 650 bilhões de dólares por ano. Além disso, devido à natureza complexa da dor com a participação de aspectos físicos, cognitivos, psicológicos e comportamentais, o tratamento da dor apresenta várias abordagens, envolvendo reabilitação física e psicológica, tratamento farmacológico, mudanças no estilo de vida e intervenções cirúrgicas (DALE & STACEY, 2016; SIQUEIRA-CAMPOS et al., 2022).

Apesar de atualmente existirem formas de inibição ou mascaramento da nociceção, o tratamento farmacológico da dor ainda vem sendo investigado amplamente, a fim de descobrir novos fármacos que possuam mais especificidade e menos efeitos adversos que as drogas já existentes e que já fazem parte da farmacoterapia da dor. Além do desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento da dor e a inflamação tem sido um processo desafiador. Esses tratamentos têm limitações diferentes devido ao número de efeitos colaterais e é comum em pacientes com intoxicação aguda por essas drogas (SIMON et al., 2017)

Com isso, o objetivo de explorar analgésicos potentes, eficazes e com poucos efeitos colaterais, tornou-se óbvio. Neste sentido, tem sido demonstrado que muitos produtos naturais, em especial os derivados de plantas, podem ter a capacidade de desempenhar um papel relevante no processo de desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de patologias associadas à dor ou nociceção (ADEOLUWA, 2014; ZVEJNIECE, L. et al., 2020)

Muitas classes de compostos orgânicos ou derivados de plantas têm demonstrado efeitos biológicos promissores, sendo que muitos deles encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados, mas os conhecimentos acerca de muitas moléculas permanecem pormenorizados. O uso de plantas medicinais em países em desenvolvimento é bastante expressivo. Como resultado, tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, o que pode resultar na descoberta de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2020). Nessa linha de pensamento e com o advento da tecnologia, abordagens computacionais como o *docking* molecular vem sendo utilizada para elucidar a ação de compostos biologicamente ativos. O *docking* é uma técnica computacional utilizada para prever a orientação mais favorável de um ligante flexível ligado a um receptor rígido (CHEN, 2014)

Vários estudos farmacológicos de compostos naturais documentaram a atividade como o anticancerígeno, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, propriedades anti-inflamatórias e antiparasitárias, a maioria delas por metabólitos secundários, especialmente a classe dos terpenos (GUIMARÃES et al. 2014; WESTON-GREEN, CLUNAS, JIMENEZ NARANJO, 2021).

Dentre estudos realizados com monoterpenos, compostos majoritários de óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas, os quais apresentam boa atividade e estão sempre presentes em inovações não clínicas, alguns apresentam-se em formas isoméricas e outros em formas absolutas, podendo estas formas influenciarem ou não no seu mecanismo. Citamos em especial o composto citronelal, que apresenta já na literatura um embasamento da sua atividade

antinociceptiva, dentre outras atividades, como antioxidante e antimicrobiana (MELO et al., 2010; QUINTANS-JUNIOR et.al, 2011; DE SANTANA et al., 2013).

Esses resultados sustentam a hipótese de que os isômeros (R)-(+)- e (S)-(-) citronelal apresentam uma atividade antinociceptiva podendo seu posicionamento espacial como enantiomeros, influenciar na sua atividade. Dessa forma, a atual pesquisa, tem por finalidade avaliar e comparar o efeito biológico dos monoterpenos isômeros (R)-(+)- e (S)-(-) citronelal, sobre a atividade antinociceptiva, bem como elucidar os possíveis mecanismos pelos quais estes compostos são capazes de influenciar a nociceção pela mudança espacial da sua molécula, ou seja, avaliar se há uma relação estrutura-atividade, o que poderá conduzir à descoberta de uma nova molécula e ao desenvolvimento de um analgésico inovador e de maior espectro de ação. Além disso, contribuir para a obtenção de maiores informações sobre o potencial farmacológico desses fitoconstituíntes e assim colaborar numa maior caracterização das propriedades farmacológicas que envolvem a classe de compostos químicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma sensação desagradável, a qual é um componente essencial do sistema de defesa do organismo, tanto humano quanto animal em geral. Fornece um rápido aviso ao sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico (FEIN, 2011). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor está definida como uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial e descrita em termos dessa lesão (RAJA, et al., 2020).

Os fisiologistas distinguem a dor propriamente dita de nocicepção, onde a nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC) resultante da ativação dos receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores, que fornecem informações sobre a lesão tecidual (FEIN, 2011). A percepção dolorosa é frequentemente desencadeada por estímulo nocivo, seja uma lesão ou uma doença em tecido somático ou tecido nervoso, periférico ou central. O sofrimento é uma resposta negativa induzida por inúmeros fatores, entre os quais estão a dor, o medo, estresse, doenças degenerativas e perdas. O comportamento doloroso resulta de dor e sofrimento, como posturas ou atitudes que visam diminuir o desconforto (LEMONICA, 1997).

A dor pode ser classificada segundo o tempo de duração em aguda (inferior a 30 dias) e crônica (superior a 30 dias), bem como segundo seu mecanismo fisiopatológico em dor nociceptiva através da ativação fisiológica dos nociceptores, dor neuropática que ocorre como consequência direta de uma lesão ou de doenças que afetam o sistema somatossensitivo (HAANPAA et al., 2011) e dor mista que envolve ambos os processos da fisiopatologia da dor nociceptiva e neuropática (BRASIL, 2012).

O mecanismo da nocicepção (**Figura 1**), refere-se aos meios pelos quais a dor é codificada, consistindo dessa forma os processos de transdução, transmissão e modulação. De forma simplificada, pode ser considerada como uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem (como fibras dos nervos periféricos do tipo A β , A δ e C) originado na periferia e projetando-se para a medula espinal; o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinal e o neurônio de terceira ordem projetando-se para o córtex cerebral (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

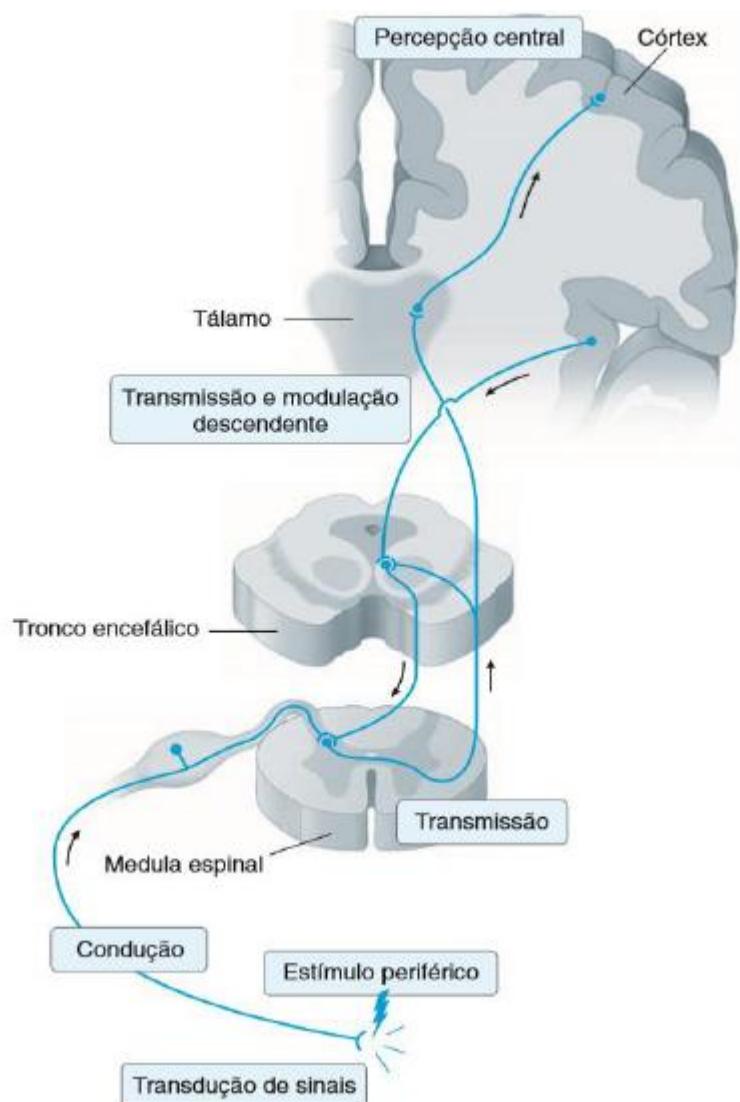
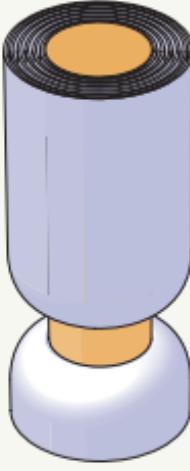
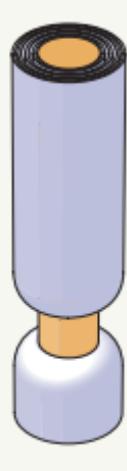
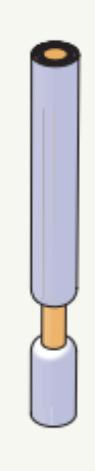


Figura 1. Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central. Fibras aferentes primárias cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) que transmitem impulsos da periferia ao corno dorsal da medula. Os neurônios de segunda ordem transmitem o impulso ao sistema nervoso central. Fonte: Griffin; Woolf (2009).

Na **Tabela 1** é possível observar um resumo comparativo das fibras aferentes primárias, trazendo suas principais diferenças estruturais e funcionais. Nela podem ser observadas as fibras A δ são responsáveis pela primeira fase da dor, de maior velocidade de transmissão e intensidade, e são sensíveis a estímulos mecânicos intensos. As fibras C produzem uma segunda fase de dor que se descreve como difusa e persistente e formam, na periferia, receptores de alto limiar para estímulos mecânicos e térmicos. Após lesão tecidual, fibras A β , normalmente não associadas a processos nociceptivos, mas apenas à estímulos inócuos, também podem sofrer alterações celulares e, após a sensibilização na periferia, transmitir a informação nociceptiva (MATHEWS et al., 2014).

Tabela 1- Tipos de fibras axoniais aferentes primárias.

Axônios cutâneos	A α	A β	A δ	C
Axônios musculares	Grupo I 	II 	III 	IV 
Diâmetro (μm)	13–20	6–12	1–5	0,2–1,5
Velocidade (m/s)	80–120	35–75	5–30	0,5–2
Receptores sensoriais	Proprioceptores do músculo esquelético	Mecanorreceptores cutâneos	Dor, temperatura	Temperatura, dor, prurido

Fonte: Adaptado de Bear et al. 4^a edição. Artmed, 2017

A outra via de transmissão da dor ao encéfalo, se dá a partir da via trigeminal, onde os estímulos vindos da área do rosto são enviados nas fibras nervosas das células do gânglio trigêmio e nos núcleos dos pares de nervos cranianos VII, IX e X. As fibras nervosas percorrem o tronco cerebral e descem até o bulbo raquidiano, onde inervam sua subdivisão do complexo trigeminal. Na sequência, as fibras nervosas que surgem destas células passam a linha média neural e ascendente para então inervar as células nervosas talâmicas no lado contralateral (PATEL, 2010).

Diversos receptores participam da transmissão nociceptiva na medula espinhal. Em geral, são observados em posição pré-sinaptica receptores opióides mu/delta e kappa, receptores GABA, alfa2-adrenérgicos, neurocinina 1 e serotoninérgicos (5HT2). Em contraste, os sítios pós-sinápticos são dotados de receptores GABA a e b, AMPA, NMDA, mu, mu/delta, alfa2-adrenérgicos, serotoninérgicos (5HT1b) e de adenosina. A transmissão excitatória na medula espinhal é feita principalmente pelo glutamato e secundariamente pelo aspartato e em muitas sinapses a liberação de glutamato é conjunta à liberação de substância P e neurocininas, que são designadas como neuromoduladores (GOZANNI, 2003).

A modulação inibitória ocorre no corno dorsal da medula e pode ser mediada por estímulos periféricos não nociceptivos, por interneurônios inibitórios GABAérgicos e glicinérgicos locais e por projeções descendentes bulboespinhais. Estes mecanismos inibitórios são ativados de maneira endógena com o objetivo de reduzir as respostas excitatórias à atividade prolongada de fibras C através de neurotransmissores como endorfinas, encefalinas, noradrenalina e serotonina. Por este motivo são também alvo de ação de diversos agentes analgésicos exógenos. Em outras palavras, a modulação é um fenômeno complexo que modifica a qualidade, a severidade e a duração da percepção dolorosa (NAIDU; PHAM, 2015).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica (BRASIL, 2012), o tratamento medicamentoso da dor nociceptiva e mista devem seguir os degraus de escala da

dor. O tratamento é iniciado pelo primeiro degrau, com a utilização de analgésicos, anti-inflamatórios e fármacos adjuvantes até dose máxima preconizada. Caso não ocorra atenuação dos sintomas após uma semana, haverá passagem para o degrau seguinte e iniciará a terapia com opioides de diversas doses ou podendo chegar até a intervenção cirúrgica.

O tratamento da dor ainda permanece um desafio na medicina moderna, com opioides, anticonvulsantes e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) continuando como as principais opções farmacológicas para aliviar tanto dores agudas quanto crônicas (KOLLER et al., 2019; WERTLI & STEURER, 2018). No entanto, o uso indiscriminado e excessivo desses analgésicos, que são os medicamentos mais vendidos no Brasil, expõe a população a efeitos colaterais graves e interações medicamentosas perigosas (YAN et al., 2016). Exemplos comuns de analgésicos incluem o paracetamol e a dipirona, juntamente com anti-inflamatórios como ibuprofeno e naproxeno. Além disso, opioides como tramadol e codeína, bem como antidepressivos como a duloxetina, são utilizados no tratamento de dores agudas e crônicas (WILL et al., 2018; DE OLIVEIRA FILHO et al., 2020).

A terapia com os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) consiste em inibir a geração da COX- 1 e COX-2, fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), reduzindo com isso, a vasodilatação e dor gerados pelas prostaglandinas (PGE2) e prostaciclinas (PGI2). Além disso, o tratamento com os AINEs causa efeitos adversos gastrointestinais, renais e cardiovasculares (DWIVEDI et al., 2015).

Apesar de sua ampla prescrição e uso global, o paracetamol, também conhecido como acetaminofeno, está associado a um aumento significativo da hepatotoxicidade ao longo das últimas décadas, sendo a principal causa de Insuficiência Hepática Aguda em vários países, incluindo os Estados Unidos e a Grã-Bretanha (GHANEM et al., 2016). Mesmo em doses terapêuticas, a intoxicação por paracetamol pode ocorrer, especialmente em indivíduos com fatores de risco, como o consumo de álcool, coadministração de medicamentos que afetam a

enzima citocromo P450 (CYP 450) e a desnutrição. Apesar desses riscos, o paracetamol é considerado um dos analgésicos mais seguros quando comparado a outras opções comuns, como AINEs e opioides (SARAGIOTTO et al., 2016).

Outro exemplo são os agonistas dos receptores opioides exercem seus efeitos analgésicos diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), através da ativação dos receptores opioides μ a nível pré e pós-sináptico, impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (ROCHA; LEMONICA; BARROS, 2002).

Os principais efeitos adversos do uso de opioides incluem depressão respiratória, bradicardia e redução na motilidade intestinal. Além do que o seu uso prolongado provoca inúmeras alterações celulares responsáveis pelo desenvolvimento de tolerância, síndrome de abstinência e dependência (NASCIMENTO; SAKATA, 2011).

A dependência dos opioides é uma preocupação significativa na área da saúde, e a problemática em torno do seu uso tornou-se especialmente evidente em países como os Estados Unidos. Nas últimas décadas, os Estados Unidos enfrentaram uma crise de dependência de opioides, resultando em um aumento alarmante de overdoses e mortes relacionadas a essas substâncias. A disseminação generalizada de opioides prescritos para o tratamento da dor crônica levou a um aumento no número de pessoas que desenvolvem uma dependência desses analgésicos potentes. O vício em opioides é uma doença crônica e complexa, caracterizada por recaídas e remissões. A epidemia de opioides nos Estados Unidos tem aumentado a conscientização pública sobre esse problema. Metadona, buprenorfina e naloxona têm se mostrado eficazes no tratamento de indivíduos viciados em opioides (WANG et al., 2019).

Outras opções terapêuticas para o tratamento da dor incluem o efeito analgésico de antidepressivos tricíclicos, efeitos inibitórios por meio GABAérgicos dos anticonvulsivantes, uso de antagonistas de receptores NMDA pela via de sinalização do glutamato e utilização de agonistas α_2 adrenérgicos. Porém por se tratarem de vias de sinalização comuns com outras

diversas atividades fisiológicas, estas farmacoterapias incidem num grande rol de efeitos colaterais e adversos ao seu uso. Os efeitos colaterais mais importantes e perigosos dos antidepressivos tricíclicos incluem problemas cardíacos, como arritmias, e alta toxicidade em casos de overdose. Nos anticonvulsivantes, destaca-se o risco da síndrome de Stevens-Johnson e aumento de comportamentos suicidas. Já nos antagonistas de receptores NMDA, são preocupantes as alucinações e delírios, além de disfunção cognitiva e amnésia. Quanto aos agonistas α_2 adrenérgicos, são relevantes a ocorrência de hipotensão severa e intensa sedação. Tais efeitos exigem atenção na prescrição e monitoramento dos pacientes (SAKATA, 2010; MIKA et al., 2013; PHANG & TAN, 2013; JOHSON; GLASGOW; POVYSHEVA, 2015).

Além da busca por novos compostos derivados de produtos naturais, a utilização de modelos *in silico* e *in vivo* desempenha um papel fundamental na determinação da eficácia e segurança desses potenciais analgésicos. Os modelos *in silico*, que envolvem simulações computacionais, permitem prever as interações moleculares e avaliar a atividade dos compostos em diferentes alvos biológicos, agilizando o processo de triagem de candidatos promissores antes dos ensaios *in vivo* (ASSIS et al., 2020). Já os ensaios *in vivo*, realizados em organismos vivos, permitem investigar a biodisponibilidade, farmacocinética e toxicidade dos compostos em um contexto mais próximo da realidade fisiológica, fornecendo informações essenciais para a seleção de candidatos que apresentam maior potencial terapêutico e menor risco de efeitos colaterais. A combinação dessas abordagens complementares torna-se imprescindível para avançar no desenvolvimento de novos analgésicos eficazes e seguros, abrindo caminho para terapias mais precisas e individualizadas no tratamento da dor.

2.2 DOCKING E ESTUDOS *in silico*

O avanço na capacidade de processamento dos computadores coloca em ênfase a área da bioinformática, que fornece valiosas contribuições para a investigação de novas moléculas com atividades biológicas. O *docking* molecular, uma técnica amplamente utilizada nessa área, tem ganhado destaque devido ao progresso biotecnológico dos métodos de purificação de proteínas, cristalografia de raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esses avanços permitem a identificação detalhada de estruturas proteicas, além do depósito dessas estruturas cristalográficas em bancos de dados públicos, ampliando a diversidade na avaliação de possíveis interações. Essas informações também favorecem a eficiência do acoplamento, uma vez que o conhecimento prévio do sítio de ligação é essencial para o sucesso do processo (MENG et al., 2011).

O *docking* molecular é uma ferramenta que permite prever geometricamente e energeticamente a formação de um complexo de interação físico-química entre moléculas, chamadas de ligantes, e macromoléculas tridimensionais presentes no organismo, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Essas informações são essenciais para o planejamento racional de fármacos e têm se mostrado especialmente relevantes na investigação de produtos naturais com potencial terapêutico (PINZI & RASTELLI, 2019). Ao explorar a riqueza de compostos encontrados na natureza, os estudos de farmacologia de produtos naturais buscam identificar moléculas bioativas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, a diversidade química e a complexidade estrutural desses produtos podem representar um desafio na busca por moléculas com atividade farmacológica específica e seletiva (ATANASOV et al., 2021).

Nesse contexto, o *docking* molecular desempenha um papel crucial, permitindo a avaliação computacional das interações entre as moléculas bioativas presentes nos produtos

naturais e seus alvos moleculares no organismo (SLIWOSKI et al., 2013). A técnica utiliza modelos matemáticos e algoritmos para simular o encaixe das moléculas e prever a afinidade de ligação, além de fornecer informações sobre a estabilidade e as forças intermoleculares envolvidas na interação. A importância do *docking* molecular nos estudos de farmacologia de produtos naturais reside na sua capacidade de acelerar e direcionar o processo de descoberta de fármacos a partir de fontes naturais. Tradicionalmente, a triagem de compostos naturais era realizada por meio de ensaios biológicos laboriosos e demorados, que demandavam recursos significativos. Com o uso do *docking* molecular, é possível realizar uma triagem virtual inicial, selecionando os compostos mais promissores para experimentos posteriores, o que otimiza o tempo e os recursos envolvidos na pesquisa (REHMAN et al., 2023).

Além disso, o *docking* molecular permite o estudo das interações moleculares em detalhes, revelando os sítios de ligação e as características estruturais necessárias para uma interação efetiva entre o composto natural e o alvo molecular. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de modificação estrutural dos compostos naturais, visando aumentar sua afinidade e seletividade, bem como reduzir efeitos adversos. Ao explorar diferentes conformações e modificações químicas, é possível otimizar as propriedades farmacocinéticas dos compostos naturais, aprimorando sua atividade e potencial terapêutico (ZHAO; HUANG; CAFLISCH, 2012).

É importante ressaltar que o *docking* molecular é uma ferramenta complementar aos estudos experimentais, sendo fundamental para direcionar as etapas subsequentes da pesquisa. A combinação de abordagens *in silico* e *in vitro/in vivo* permite uma investigação mais abrangente e integrada, validando os resultados obtidos computacionalmente e fornecendo uma base sólida para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais (PINZI & RASTELLI, 2019).

Em conclusão, o *docking* molecular desempenha um papel crucial nos estudos de farmacologia de produtos naturais, permitindo a predição e avaliação das interações entre compostos bioativos e alvos moleculares (SLIWOSKI et al., 2013). Essa técnica contribui para o planejamento racional de fármacos, acelerando o processo de descoberta e direcionando a modificação estrutural dos compostos naturais. Ao combinar abordagens *in silico* e experimentais, os estudos de *docking* molecular fortalecem a pesquisa de produtos naturais como uma fonte valiosa de novos medicamentos. (REHMAN et al., 2023).

2.3 TESTES *in vivo* PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Os testes *in vivo* são etapas fundamentais no processo de desenvolvimento de novos fármacos, permitindo uma avaliação mais abrangente e realista dos efeitos dos compostos em organismos vivos. Esses ensaios são essenciais para validar a eficácia terapêutica, a farmacocinética, a toxicidade e a segurança dos candidatos a medicamentos. Além disso, possibilitam a compreensão dos mecanismos de ação e interação do fármaco com o sistema biológico, garantindo maior confiabilidade na transição do laboratório para a aplicação clínica (HUGHES et al., 2011). Os testes *in vivo* fornecem informações sobre a biodisponibilidade do fármaco, a sua distribuição nos tecidos-alvo e a sua metabolização, aspectos cruciais para determinar a dosagem adequada e a frequência de administração. Esses ensaios também permitem identificar possíveis efeitos adversos e toxicidades que podem surgir em um ambiente biológico complexo, ajudando a minimizar os riscos associados ao uso do medicamento em seres humanos (JONES., et al., 2015).

Apesar dos avanços em tecnologias de teste *in vitro* e modelos computacionais, os testes *in vivo* continuam sendo imprescindíveis para a validação dos resultados pré-clínicos,

fornecendo dados mais completos e relevantes para embasar a decisão de avançar com o candidato a medicamento para ensaios clínicos (TRAN et al., 2020; JONES et al., 2015).

Em suma, os testes *in vivo* são uma etapa crucial no desenvolvimento de novos fármacos, oferecendo informações fundamentais para garantir a eficácia e segurança desses medicamentos em seres humanos. A realização cuidadosa desses ensaios é fundamental para a identificação de potenciais candidatos a medicamentos com o melhor perfil terapêutico e a minimização de possíveis efeitos adversos.

2.4 PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos fármacos por diversas razões. Primeiramente, a natureza é uma fonte rica em compostos químicos que exibem uma ampla gama de propriedades biológicas. Muitas plantas e produtos naturais têm sido tradicionalmente utilizados na medicina popular de várias culturas ao redor do mundo, o que sugere que podem conter substâncias com potencial terapêutico. Como consequência, a prática médica beneficiou-se com um novo arsenal terapêutico, como por exemplo, o fármaco ácido acetilsalicílico (AAS), originado da salicina da espécie *Salix alba*. Parte dos medicamentos encontrados atualmente são derivados de vegetais, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres, o que demonstra a importância destas fontes na busca de novos tratamentos para diversas doenças. Percebe-se a necessidade maior de estudos ao notar que o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos étnicos (DE SOUSA et al., 2007; HOEFFEL et al., 2011).

Apesar da sua importância, o potencial que o Brasil possui para a descoberta de novos fármacos derivados de produtos naturais ainda era pouco explorado, diferente do que ocorre em

países como Alemanha, Canadá e Estados Unidos que possuem um alto investimento financeiro em pesquisas na área das plantas medicinais, porém em um panorama mais recente a química de produtos naturais do Brasil cresceu e se diversificou de maneira notável no século XXI. O amadurecimento dessa ciência no contexto nacional trouxe várias descobertas principalmente no âmbito das plantas medicinais e seus derivados, como fibras corantes e óleos essenciais (DE SOUSA et al., 2007; BORGES et al., 2017).

Dentre os produtos extraídas das plantas, os óleos essenciais representam importante fonte de novos compostos bioativos. Eles são complexos aromáticos que contêm uma mistura de diversos fitoconstituíntes químicos oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Esses compostos têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades biológicas exercidas sobre animais, plantas e seres humanos. Sua rica composição química é responsável por esse perfil diversificado, destacando-se dois grupos principais de estruturas de baixo peso molecular: os terpenos e terpenoides e os compostos aromáticos alifáticos. Os terpenos são considerados o grupo mais importante na composição dos óleos essenciais. Eles são formados pela combinação de unidades de isopreno (C5) e geram moléculas com estruturas e funções distintas. Essas moléculas terpênicas são classificadas de acordo com a quantidade de unidades de isopreno presentes em seu esqueleto carbônico. Os terpenos mais comuns encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20). Quando essas moléculas terpênicas apresentam átomos de oxigênio em sua estrutura, elas são denominadas de terpenoides. Essa presença de oxigênio confere propriedades adicionais aos terpenoides, ampliando sua diversidade estrutural e potencial biológico (BAKALLI et al., 2008; BASER & BUCHBAUER, 2010; SHARIFI-RAD et al., 2017).

O citronelal, também conhecido como rhodinal, é um monoterpeno biologicamente ativo naturalmente encontrado nos óleos essenciais de *Eucaliptus citriodora* (60-80 %), *Cymbopogon winterianus* (capim-citronela) (35 %), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (<

5%), dentre outros. Ligeiramente solúvel em água, trata-se de um líquido incolor bastante instável que apresenta um agradável odor de limão, porém menos doce e frutado que o citral. Possui ponto de ebulição em 201-207°C, densidade de 0,855 g/cm³, massa molar de 154,25 g/mol e um centro estereogênico, que permite a existência das formas dextrogira (R)-(+) e levogira (S)-(-). É largamente utilizado na fabricação de fragrâncias e perfumes, repelentes e de outros químicos aromáticos. Além disso, o citronelal possui atividades antimicrobianas constatadas, sobre bactérias e fungos do gênero *Fusarium* e *Candida* (OLIVEIRA et al., 2006).

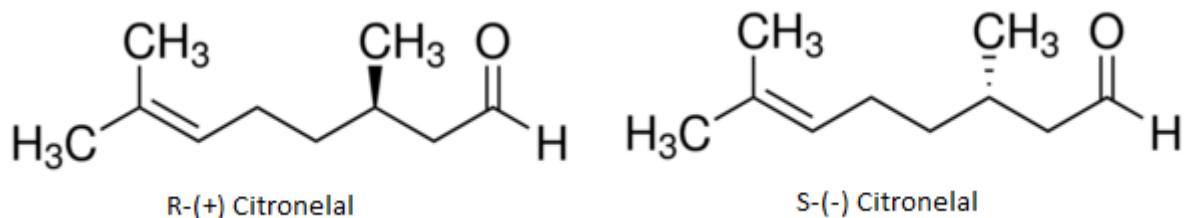


Figura 2- Estruturas químicas do (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal

São várias as atividades biológicas descritas para o citronelal (mistura racêmica), entre as quais se destaca seu uso como repelente, de forma tópica sendo capaz de repelir insetos durante 4 horas seguidas (MAIA & MOORE, 2011). Além disso este monoterpeno já revelou ação antimicrobiana (SEIXAS et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2011), alelopática, antioxidante (ANDRADE et al., 2012) e herbicida (BRITO et al., 2012a). Diversas plantas que produzem o citronelal em mistura racêmica são utilizadas em todo mundo, principalmente na América do Sul, no tratamento de diversas doenças, em especial para o tratamento da dor (LU et al., 2006).

Quando testado seu efeito de antinociceção, o citronelal apresentou resultados interessantes e um mecanismo de ação similar à morfina, caracterizando assim um efeito nos receptores opióides (QUINTANS-JUNIOR et al., 2010). Além de uma atividade

antinociceptiva sobre modelos de testes orofaciais induzidos pela formalina e diminuição da nocicepção utilizando modelos com glutamato e capsaicina. Apresentou também uma atividade antioxidante em baixas doses como 0,1 e 1 mg/mL em estudos *in vitro* demonstrando alta capacidade redox e possibilidade de utilização em outros modelos de pesquisa relacionados (QUINTANS-JUNIOR et al., 2011).

Melo et al. (2010) demonstraram a atividade do citronelal em modelos de hipnose sedação e nocicepção, avaliando que em doses a partir de 50 mg/kg o fitoconstituinte garantiu um aumento do tempo de sono dos animais e diminuiu o efeito nociceptivo induzido por um modelo de estudo utilizando o ácido acético. Mais recentemente, Santos et. al. (2016) realizaram testes com o citronelal associado a β -ciclodextrina, tendo um efeito anti-hiperalgésico na dor muscular não inflamatória crônica em camundongos, este efeito maior do que a forma sem associação, e neste mesmo estudo foi mostrado a interação *in silico* do composto citronelal com receptores do tipo glutamatérgicos, concluindo que é um possível mecanismo de ação a ser estudado para esta inibição de nocicepção (ASSIS, et al., 2020).

Ao ser testado nas duas formas enantiomericas, foi percebido uma alta atividade inibitória, sobre microorganismos, do isômero (R)-(+) citronelal e uma atividade pouco menor do isômero (S)-(-) citronelal, caracterizando assim uma estereo seletividade em sua atividade, além de que outros estudos demonstraram uma toxicidade baixa sobre hemácias em um modelo de hemólise (OLIVEIRA, 2016; COSTA, 2017). O citronelal demonstra ser seguro para estudos em farmacologia, uma vez que as doses letais (DL_{50}) dos óleos essenciais contendo esse monoterpeno e do próprio citronelal foram consideravelmente altas em testes com camundongos. Os valores de DL_{50} para o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* foram de 5.000 mg/kg, enquanto para o citronelal isolado foram de 2.609 mg/kg. Além disso, estudos realizados com o óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.), que também apresenta o citronelal em sua composição, revelaram um valor de DL_{50} em camundongos BALB/c de 2,57

g/kg. Esses resultados indicam uma margem de segurança significativa para a utilização do citronelal em pesquisas farmacológicas, mesmo que possam haver variações de acordo com o método utilizado (Via oral), estes resultados o tornam uma opção promissora para investigações futuras com potencial terapêutico (ARAÚJO-FILHO et al., 2019; STOJANOVIĆ et al., 2019).

A abordagem diferenciada de estudos com compostos derivados de produtos naturais é de extrema importância na farmacologia, pois essas substâncias oferecem uma vasta diversidade de estruturas químicas e propriedades biológicas potenciais. Ao pesquisar e compreender as ações do citronelal, abre-se caminho para a descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico, o que é de grande relevância para a busca de alternativas eficazes no tratamento da dor e outras condições de saúde. A investigação desses compostos naturais amplia as possibilidades de encontrar novas moléculas com atividade farmacológica, contribuindo para o avanço da ciência e aprimorando as opções terapêuticas disponíveis. Dito isto este estudo busca trazer à tona e investigar os efeitos dos enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-) do citronelal em relação à atividade antinociceptiva, além de explorar seus posicionamentos espaciais almejando assim determinar uma melhor atividade destes compostos, visando a possibilidade de conhecimento que será extraída desta avaliação.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar comparativamente a atividade antinociceptiva decorrentes da administração de isômeros (R)-(+) e (S)-(-) citronelal, em modelos *in vivo* e *in silico*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por modelo *in silico* as formas de docagem molecular dos isômeros, (R)-(+) e (S)-(-) citronelal, com proteínas relacionadas à cascata de nocicepção;
- Caracterizar os efeitos sobre o SNC de (R)-(+) e (S)-(-) citronelal;
- Comparar a atividade sobre o SNC de (R)-(+) e (S)-(-) citronelal;
- Avaliar comparativamente a coordenação motora dos animais adiministrados com (R)- (+) e (S)-(-) citronelal;
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos enantiômeros em modelos de nocicepção química e térmica;
- Propor de acordo com avaliação comparativa destes monoterpenos, seu possível mecanismo de ação e sua variação de acordo com posicionamento espacial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E INFRAESTRUTURA

4.1.1 Local de trabalho

Os estudos *in silico*, foram desempenhados em parceria com o Laboratório de Quimioinformática da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os testes *in vivo* foram realizada no Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob responsabilidade do Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida.

4.1.2 Substâncias

Todas as substâncias utilizadas neste estudo, incluindo os fármacos padrão, agonistas, antagonistas e os isômeros de citronelal, foram adquirido da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção da morfina e naloxona que foram doados pelo laboratório farmacêutico brasileiro, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, LTDA (Itapira, SP, BR). Todas as substâncias utilizadas no estudo, e em posse do laboratório, foram armazenadas em local e temperatura apropriadas no almoxarifado do Laboratório de Psicofarmacologia/ UFPB. Todas as substâncias foram diluídas em solução salina e administrado por via intraperitoneal (i.p.) em um volume total de 0,1 mL/10 g. Os isomeros de citronellal foram inicialmente emulsificado com Tween 80 (0,5%) em soro fisiológico 0,9%. O grupo controle recebeu o veículo (Tween 80-0,5% em solução salina a 0,9%).

4.1.3 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, adultos, saudáveis, pesando entre 25 e 35 gramas, com seis semanas de

vida, disponibilizados pelo Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba, sob protocolo CEUA nº 9586090819 (**Anexo I**).

O presente estudo caracterizou-se como um ensaio não-clínico, randomizado, controlado e duplo-cedo, estando de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental utilizou-se ferramentas *in silico* para obtenção de dados preliminares e prevenção da extração de número de animais a serem utilizados. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório, bem como diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais (Damy, et al, 2010)

Os animais foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 12 horas (claro 6-18h), com água e dieta balanceadas ad libitum. Todos os experimentos foram executados sempre utilizando os mesmos observadores, previamente calibrados, no turno da tarde. As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que possam interferir no comportamento dos animais. Para a avaliação, foram utilizadas caixas de madeira em formato triangular, com duas paredes de 25cm de altura e largura, formadas por espelho e vidro transparente. O pesquisador, previamente treinado, realizou a observação direta intensiva do comportamento do camundongo.

Para o cálculo amostral, foram utilizados os resultados obtidos a partir das investigações de La Rocca et al. (2017). Assim, adotou-se um estudo como bicaudal, com nível de significância de 5%, $r = -0,878$ (magnitude do efeito) e poder estatístico de 80%, resultando em 6 animais por grupo. Ao final dos experimentos, o quantitativo de 336 animais fora utilizado, e sua participação no estudo descrita no relatório final ao CEUA (**Anexo II**).

4.1.3.1 Eutanásia

Para diminuir ou evitar o sofrimento dos animais foram respeitados os tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes, a fim de evitar lesão tecidual e estresse desnecessário. Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (4 mg/kg), e anestesiados com uma mistura de cloridrato de quetamina (300 mg/kg) por via intramuscular e cloridrato de xilazina (30 mg/kg) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, administra-se 2 mmol/kg de cloreto de potássio e os camundongos são eutanasiados por deslocamento cervical (Association American Veterinary Medical – AVMA, 2020; BRASIL, 2019). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

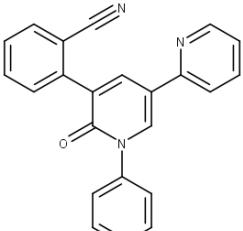
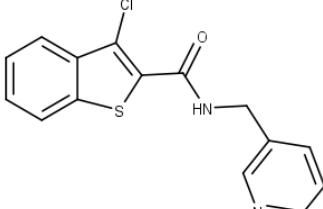
4.2 ENSAIOS *in silico*

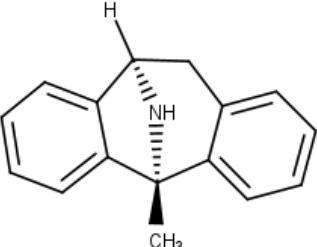
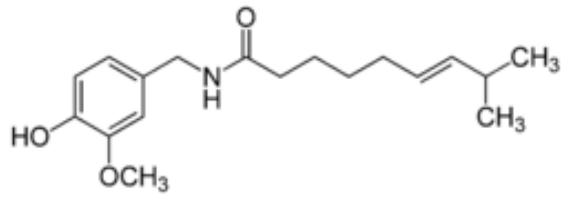
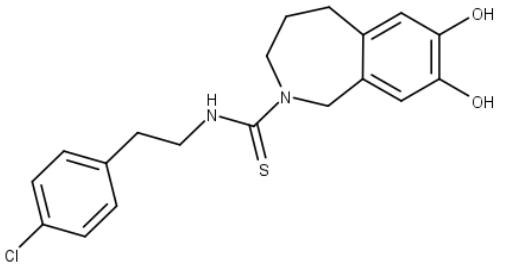
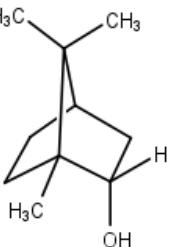
As simulações de *Docking* molecular foram utilizadas para investigar o mecanismo de ação dos monoterpenos (R)-Citronelal e (S)-Citronelal, através da afinidade de ligação dos compostos e as enzimas selecionadas no estudo, para que contribua com o efeito nos receptores que, uma vez ativados, iniciam uma cascata de eventos bioquímicos que culminam com a nociceção.

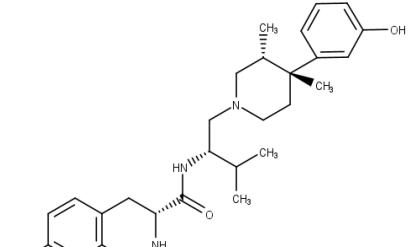
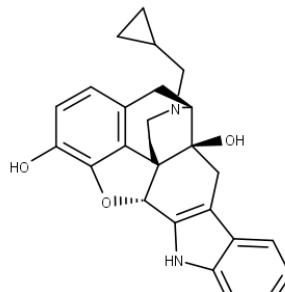
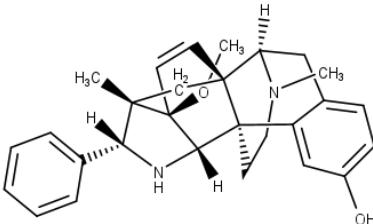
Para isso foi realizado um rastreio com diversas proteínas envolvidas para esses efeitos. Para utilização como compostos testes as estruturas do (R)-(+) e (S)-(-) citronelal foram obtidas através do PubChem (respectivamente “<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/75427>” e “<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443157>”). As estruturas 3D das enzimas referentes aos receptores de Glutamato foram obtidas do Protein Data Bank (PDB)

(<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1977). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser visualizados na **Tabela 2**. Inicialmente, todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das poses, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

Tabela 2 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	PDB ID	Controle Positivo	Resolução
Receptor de Glutamato AMPA	3DLN	 Perampanel	1.91 Å
Receptor de Glutamato 6	1S50	 3-cloro-N-(piridin-3-ilmetil)-1-benzotiofeno-2-carboxamida	1.65 Å

Receptor de Glutamato NMDA	2A5S	 <p>Dizocilpine</p>	1.70 Å
Receptor Transient - TRPV1	5IRZ	 <p>Capsaicin</p>	3.28 Å
Receptor Transient - TRPM8	7WRE	 <p>Capsazepina</p>	2.52 Å
Receptor Transient - TRPA1	7JUP	 <p>Borneol</p>	2.64 Å

Receptor Opioide kappa	4DJH	 <p>JDTic</p>	2.90 Å
Receptor Opioide Delta	4EJ4	 <p>Naltrindol</p>	3.40 Å
Receptor Opioide Mu	5CM1	 <p>BU72</p>	2.07 Å

4.2.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0

O software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) foi utilizado com os parâmetros predefinidos no mesmo software. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (AZEVEDO & WALTER, 2010). O algoritmo MolDock SE

(Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp₂-sp₂ (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

Os resultados para cada cálculo foram analisados para obter os valores de energia de afinidade (Kcal/mol) para cada conformação do ligante em seu respectivo complexo, e imprecisões estruturais prováveis foram ignoradas nos cálculos.

4.3 ENSAIOS *in vivo*

4.3.1 Triagem Farmacológica

A triagem farmacológica experimental é uma metodologia simples que possibilita verificar o potencial terapêutico que o agente testado possui e, em caso negativo, descartá-lo, evitando desperdício de tempo, droga e animais. Para avaliar o possível efeito de uma droga no Sistema Nervoso Central (SNC), são tomados como parâmetros o aparecimento de alguns sinais ou mesmo alteração do comportamento de camundongos (ALMEIDA et al., 2006).

Os animais foram divididos em grupos e tratados com as duas substâncias teste, (R)-(+) e (S)-(-) citronelal, por via intraperitoneal, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg cada, doses estas baseadas em resultados de estudos preliminares realizados por Melo et al. (2010) e as alterações decorrentes da administração das drogas-teste foram comparadas ao grupo que receberá somente o veículo. Foram feitas anotações dos parâmetros comportamentais (**Anexo III**) em intervalos compreendidos entre 0-30; 31-60; 61-120 e 121-240 minutos após o tratamento. (ALMEIDA et al., 2006).

4.3.2 Avaliação da coordenação motora (teste do rota-rod)

Este teste, descrito por Dunham e Miya (1957), avalia uma possível propriedade miorelaxante ou neurotóxica de algumas drogas com perfil depressor no SNC (DE SOUSA et al., 2007). Nessa metodologia, a coordenação motora é verificada por meio da capacidade do animal em permanecer sobre uma barra giratória em intervalos de tempo pré-estabelecidos (MATTEI & FRANÇA, 2006).

Foi realizado uma pré-seleção dos animais 24 horas antes do experimento (não haverá administração das drogas). Nesta pré-seleção foram excluídos os animais que não conseguirem permanecer sobre a barra giratória (7 rotações por minuto) por, pelo menos, um minuto em três tentativas.

No dia do experimento, os camundongos foram colocados na barra giratória e foi cronometrado o tempo de permanência, em até 3 minutos, sendo estabelecido um limite máximo de três quedas para cada animal (DUNHAM e MIYA, 1957). A avaliação da coordenação motora foi avaliada após 30, 60 e 120 minutos da administração da droga. A cada grupo de animais ($n=6$), foram administradas doses do (R)- $(+)$ e (S)- $(-)$ citronelal na concentração de 50, 100 e 150 mg/kg cada e como grupo controle positivo foi utilizado o Diazepam (4mg/kg).

4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.3.3.1 Teste da placa quente

Este teste, descrito por Eddy e Leimback (1953), representa uma modificação do modelo original de Woolfe e MacDonalds (1944). Consiste em quantificar o tempo que o animal permanece sobre uma superfície metálica previamente aquecida a $56 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo em segundos que o animal leva para lamber, levantar ou morder uma das patas é cronometrado e considerado como um indicativo de dor, já que são respostas nociceptivas integradas supraspinhalmente (YAMAMOTO et al., 2002).

Os animais foram pré-selecionados, sem a administração de nenhuma substância, e foram considerados aptos os que obtiverem um tempo de resposta a dor inferior a 10 segundos quando colocados sobre a placa quente aquecida. Os camundongos foram individualmente

colocados sobre a placa aquecida após 30, 60 e 120 minutos dos tratamentos com veículo, com as substâncias teste (R)-(+) e (S)-(-) citronelal na concentração de 50, 100 e 150 mg/kg cada, ou morfina (10 mg/kg, i.p.) como controle positivo. O tempo máximo foi definido como 15 segundos para evitar lesão tecidual.

4.3.3.2 Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado como descrito por Hunskaar e Hole (1985) em camundongos. Nesta metodologia, foi realizada uma administração de 20 µl de formalina a 2% na região subplantar da pata traseira direita do animal, o que induz à estimulação dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata considerado indicativo de resposta nociceptiva (SOUZA et al., 2000). É um modelo bifásico de comportamento de dor, onde se observa a fase neurogênica, que ocorre após cerca de 5 minutos onde a inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam a nível central; após um período de 10 minutos (interfase), é contabilizado o tempo de lambida da pata por um período de 15 minutos, onde se observa a fase inflamatória, que é gerada pela ativação dos nociceptores e também pela liberação de mediadores químicos da inflamação.

A formalina foi administrada por via subplantar na pata posterior direita após 30 minutos dos tratamentos com veículo, com as substâncias teste (R)-(+) e (S)-(-) citronelal na concentração de 50, 100 e 150 mg/kg cada, ou morfina (10 mg/kg, i.p.) como controle positivo. O tempo total de lambida da pata foi registrado nas duas fases descritas após a injeção da formalina.

4.3.4 Análise pela via opióide

A via opióide apresenta uma das mais utilizadas no tratamento da dor atualmente e uma das drogas de primeira escolha como padrão ouro de utilização nos estudos de nociceção. Para a investigação de um possível envolvimento e suas modificações nos receptores opioides bem como na resposta antinociceptiva do (R)-(+) e (S)-(-) citronelal, foi utilizado a naloxona, que é um antagonista não seletivo dos receptores opioides (BODNAR et al., 2009).

O grupo controle foi tratado com veículo. Outros grupos contendo 6 camundongos cada foram tratados com doses de (R)-(+) e (S)-(-) citronelal, e o controle positivo morfina 10 mg/kg, i.p., respectivamente. Mais grupos receberão um pré-tratamento com naloxone (5 mg/kg, s.c.), 15 minutos antes da administração de (R)-(+) ou (S)-(-) citronelal, ou morfina. Após 30 minutos da administração de morfina e (R)-(+) ou (S)-(-) citronelal, os camundongos foram submetidos ao teste da formalina.

4.3.5 Avaliação antinociceptiva com alvos específicos

Para os estudos subsequentes, foi selecionado o isômero com maior atividade em sua concentração mais efetiva que foi observado em todos os estudos e não foi determinado ainda seu mecanismo de ação, chegando ao resultado do isômero (S)-(-) citronelal (100 mg/kg).

4.3.5.1 Via Glutamatérgica

Inicialmente, o teste de indução de nociceção por glutamato foi realizado. Esse experimento foi descrito por Beirith, Santos e Calixto (2002), com modificações. Os animais foram submetidos à administração intraperitoneal (S)-(-) citronelal (100 mg/kg), veículo

(controle) e MK-801 (Dizocilpina) (10 mg/kg), (um inibidor específico do receptor de glutamato), 30 minutos antes da injeção de glutamato. Foi utilizado um volume de 20 µL de solução de glutamato (30 µM/pata), que foi injetado intraplantarmente na superfície ventral da pata traseira direita do camundongo. Em seguida, os animais foram observados por 15 minutos após a aplicação do glutamato.

4.3.5.2 Via do receptor transitório

A nocicepção induzida pela capsaicina foi realizada por injeção subcutânea de 20 µL (2,5 µg) de capsaicina, dissolvida em etanol, dimetil sulfóxido e água destilada (1:1:8), por via intraplantar na superfície ventral do camundongo pata traseira direita. Os animais foram submetidos à administração intraperitoneal (S)-(-) citronelal (100 mg/kg), veículo (controle) morfina (10 mg/kg), 30 min antes do injeção de capsaicina. O comportamento nociceptivo de lamber a pata foi observado por 20 minutos (TAMADDONFARD et al., 2015).

4.3.6 Avaliação de mecanismo de ação utilizando antagonistas específicos

Os seguintes testes foram realizados para tentar determinar um possível mecanismo de ação do composto estudado, para isso, foram utilizados antagonistas conhecidos de cada via envolvida, direta ou indiretamente, com a nocicepção, para descobrir se a inibição dessa via seria capaz de reverter a atividade do (S)-(-) citronelal. Para definir o efeito nociceptivo, foi utilizado o teste da formalina descrito acima, com um pré-tratamento dos antagonistas.

Cada grupo recebeu pré-tratamento com o antagonista da via 15 minutos antes da administração de (S)-(-) citronelal, sendo eles: glibenclamida (10 mg/kg, s.c.) para avaliar a

ação nos canais K⁺ATP, ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) para avaliar a ação nos receptores α2-adrenérgicos, sulpirida (20 mg/kg s.c.) para a via dopaminérgica, ou cafeína (10 mg/kg s.c.) como antagonista do receptor adenosinérgico. Após 15 minutos de pré-tratamento, eles foram tratados intra-peritonealmente com (S)-(-) citronelal (100 mg/kg) ou veículo (controle). Após 30 minutos, o teste da formalina foi realizado (LOPES, et.al. 2012).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Gerenciamento dos dados e cegamento

O gerenciamento dos dados e métodos de cegamento foram realizados objetivando reduzir possíveis vieses no método de coleta e análise dos dados. A pesquisa teve o sequenciamento de testes randomizados, com alocação aleatória dos animais, utilizando o software Random Allocation 2.0.

O cegamento dos experimentos irá ocorrer da seguinte forma: o pesquisador A realizou a preparação dos materiais necessários para a execução dos testes e codificação dos animais e fez aplicação das substâncias; o pesquisador B, que estava cego para as substâncias e doses recebidas pelo animal fez a observação direta intensiva do comportamento nociceptivo do animal, de acordo com o tempo de cada substância indutora. A seguir, a análise estatística dos dados foi realizada pelo pesquisador C, também cego. Por fim, o pesquisador A fez a recodificação dos dados analisados pelo pesquisador C.

4.4.2 Análise de resultados

Para a análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA one-way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi realizado usando GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, “www.graphpad.com”). Os dados obtidos foram expressos como média \pm e.p.m. (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DOCKING MOLECULAR

Os compostos (R)-Citronelal e (S)-Citronelal foram submetidos ao rastreio por meio de *Docking* molecular em 9 proteínas referentes aos receptores de Glutamato do tipo AMPA, NMDA e GLU-R3, aos receptores opioides do tipo kappa, Delta e Mu., e receptores transientes: TRPV1, TRPM8 e TRPA1. Os resultados de *docking* foram gerados utilizando a função de pontuação MolDock Score. Valores mais negativos indicaram melhores previsões para a função de pontuação em estudo. A proteína em que o composto obteve valores de energia de ligação menor ou próximo ao controle positivo foi considerada ativa.

Tabela 3 – Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína (PDB)	Ligante PDB	RMSD
Receptor de Glutamato AMPA (PDB: 3DLN)	GLU	0.16
Receptor de Glutamato 3 (PDB: 1S50)	GLU	0.20
Receptor de Glutamato NMDA (PDB: 2A5S)	GLU	0.13
Receptor Opioide kappa (PDB: 4DJH)	JDC	0.22
Receptor Opioide Delta (PDB: 4EJ4)	EJ4	0.19
Receptor Opioide Mu (PDB: 5C1M)	VF1	0.29

Os resultados de *docking* gerados pelo algoritmo MolDock Score foram validados pelo *redocking* do ligante cristalográfico com todas as proteínas investigadas. Os desvios da raiz quadrada média (RMSDs) das poses de ajuste obtidas foram calculados em comparação com a estrutura cristalina. Os valores RMSD inferiores a 2 Å indicam um grau ideal de confiabilidade de triagem (Hung et al., 2011). As informações sobre as estruturas de partida e os resultados da validação de *redocking* são mostradas na **Tabela 3**. Durante a análise de *redocking*, a maioria

dos valores RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo. Com exceção dos receptores transiente (TRPA1; TRPM8 e TRPV1) que apresentaram valores de RMSD acima do esperado e suas estruturas foram normalizadas por meio de homologia. No geral, os programas forneceram valores considerados satisfatórios para a validação do *docking*.

5.1.1 Receptores glutamatérgicos

A **tabela 4** mostra as energias de ligação e as interações realizadas pelos (R)-(-) e (S)-(-) citronelal com os receptores: receptor metabotrópico para o glutamato seis (mGluR6; PDB ID: 1S50); N-metil-D-aspartato (NMDA; PDB ID: 2A5S); ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropíônico (AMPA; PDB ID: 3DLN). Usando como base o ligante endógeno glutamato e representadas em 2D e 3D as interações realizadas pelas moléculas nas figuras 3, 4 e 5. Os controles positivos, com suas interações 2D e 3D demostrados nas figuras 6, 7 e 8, não apresentaram energia semelhante ao ligante endógeno glutamato e nem se aproximaram dos compostos teste. Sendo excluídos da tabela e discorridos a seguir.

O controle positivo para efeito antagônico no receptor mGluR6, 3-cloro-N-(piridin-3-ilmetil)-1-benzotiofeno-2-carboxamida, demonstrado na **Figura 6**, apresentou um moldock score de -20,95, apresentando interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho), sendo estas situadas nos anéis aromáticos e foram efetuadas pelos resíduos Ala 91 e Met 190. As interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa, lilás e azul) compreenderam os grupamentos apolares e foram formadas por meio dos aminoácidos Ala 142, Tyr 61, Ala 91, Glu 191, Phe 188, Ala 137 (2 interações) e Val 138 (2 interações). As interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) foram estabelecidas pelos resíduos Ala 142 e Thr 143 e foram observadas no átomo de Oxigênio (O) da carbonila.

Tabela 4- Docking realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores Glutamatérgicos, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.

Proteína	Nome	Energia (Kcal/mol)	Interação	
			Tipo	Resíduos
1S50 (mGluR6)	Ligante Glutamato	-89.1086	Lig-H	2-Thr143, 2-Ala142, 2-Arg96, 1-Ala91, 1-GLu191, 1-Pro89
			Eletrostática	2-Arg96, 2-Glu191
			Estérica	1Tyr-61, 1Tyr143
	(R)-(+) citronelal	-78.5104	Lig-H	1-Ala142, 1-Arg96
			Eletrostática	-
			Estérica	1-Val138, 1-Thr142, 2-Ala142, 1-Glu191, 1Pro-89, 1-Tyr61
	(S)-(-) citronelal	-87.3034	Lig-H	1-Ala91, 1-Arg96
			Eletrostática	-
			Estérica	1-Leu189, 1-Arg96, 2-Tyr61, 2-Thr143, 2-Glu191
2A5S (NMDA)	Ligante Glutamato	-101.002	Tipo	Resíduos
			Lig-H	2-Thr147, 1Asp215, 2-Arg121, 1-Thr116, 1-Ser173, 1-Ser114
			Eletrostática	2-Arg121, 1His88, 1-Asp215
	(R)-(+)- citronelal	-90.4425	Estérica	-
			Lig-H	1-Arg121, 1-Thr116
			Eletrostática	-
	(S)-(-) citronelal	-88.1719	Estérica	1-Thr174, 2-Val162, 1-Asp215, 1-Ser173, 1-Ser114
			Lig-H	1-Arg121, 1-Ser173
			Eletrostática	-
3DLN (AMPA)	Ligante Glutamato	-98.9649	Estérica	2-Ser114, 1-Glu16, 1-Arg121, 1-Tyr116, 1-Asp215, 1-His88, 1-Gly-172, 1-Thr174, 1-Val161, 1-Glu175
			Tipo	Resíduos
			Lig-H	2-Arg96, 1-Thr91, 1-Glu193, 1-Pro89, 2-Ser142, 2-Thr143
			Eletrostática	2-Arg96, 1-Glu193
			Estérica	1-Thr143, 1-Ser142
	(R)-(+)- citronelal	-83.673	Lig-H	1-Arg96

			Eletrostática	-
			Estérica	1-Thr220, 2-Thr143, 1-Leu190, 1Gly-141, 1-Arg96, 1-Thr91, 1-Pro89, 1-Met196
(S)-(-) citronelal	-90.2538	Lig-H	1-Ser142, 1-Thr91, 1-Arg96	
			Eletrostática	-
		Estérica	1-Thr143, 1-Leu191, 2-Glu193, 1-Thr61, 1-Pro89, 1-Thr91, 2-Arg96	

Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2020)

O controle positivo com efeito antagônico para receptores AMPA, Perampanel, apresentou um moldock score de -29,68. Este, como visualizado na **Figura 7**, estabeleceu interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho e laranja) por meio dos resíduos Lys 144, Gly 141, Arg 96, Thr 174, Met 196 (4 interações), Glu 193 (3 interações), Thr 143 e Leu 138. As interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) foram visualizadas no grupamento carbonila e nos átomos de Nitrogênio (N), sendo estabelecidas pelos aminoácidos Ser 142, Tyr 61 e Leu 138. A interação hidrofóbica foi o último tipo de interação visualizado, compreendendo os resíduos Leu 90, Tyr 61 (2 interações), Leu 192 e Leu 138 (2 interações).

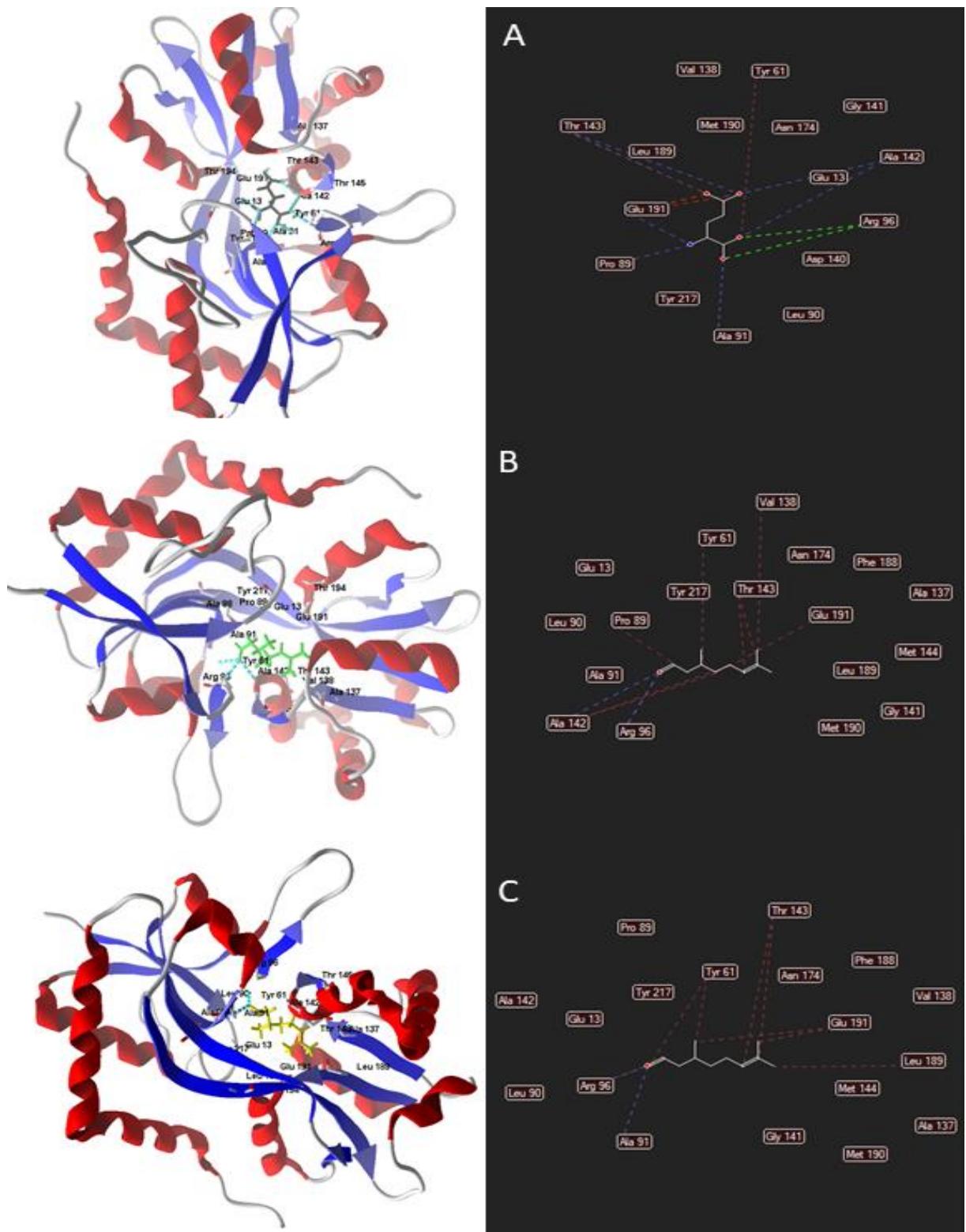
O controle positivo para receptores NMDA, Dizolcilpine apresentou um moldock score de -58,15, e como visto na **Figura 8**, apresentou interações do tipo estéricas (linhas tracejadas em vermelho) que corresponderam aos resíduos Arg 121 e Ser 173 (2 interações). As interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) foram observadas através dos resíduos Glu 16 e Thr 116. Já as interações hidrofóbicas compreenderam os grupos apolares da molécula e se formaram por meio dos aminoácidos Tyr 214 (2 resíduos), Gly 172 e His 88 (2 interações).

As energias de afinidade de ligação do composto (S)-(-) citronelal apresentam valor semelhante ao ligante padrão glutamato para o receptor mGLuR6 (receptor metabotrópico do glutamato do tipo 6). Esta interação pode ser devido ao posicionamento espacial que favoreceu a interação da molécula com os resíduos de forma semelhante ao glutamato, como mostrado na

Figura 3. Nessa figura é possível observar a interação da parte hidrofílica da molécula com o resíduo de arginina 96, esta interação apresenta-se de forma eletrostática na molécula do glutamato e por meio de interações estéricas e de hidrogênio na molécula do (S)-(-) citronelal, para seu isômero, (R)-(+) citronelal, foi possível observar uma interação apenas estérica com este resíduo o que pode ter conferido uma menor energia de afinidade para esta molécula, além do que a mudança no posicionamento espacial parece ter conferido uma maior distância a este resíduo. As interações de hidrogênio que a molécula (S)-(-) citronelal apresentaram, demonstram que talvez o resíduo de alanina91 possa apresentar um maior papel na ativação do receptor ou ao menos conferir uma maior energia de afinidade, enquanto que o isômero (R)-(+) citronelal apresentou uma interação com o resíduo de alanina 142, não tão próximo da molécula o que pode ter garantido uma menor energia de afinidade para este isômero.

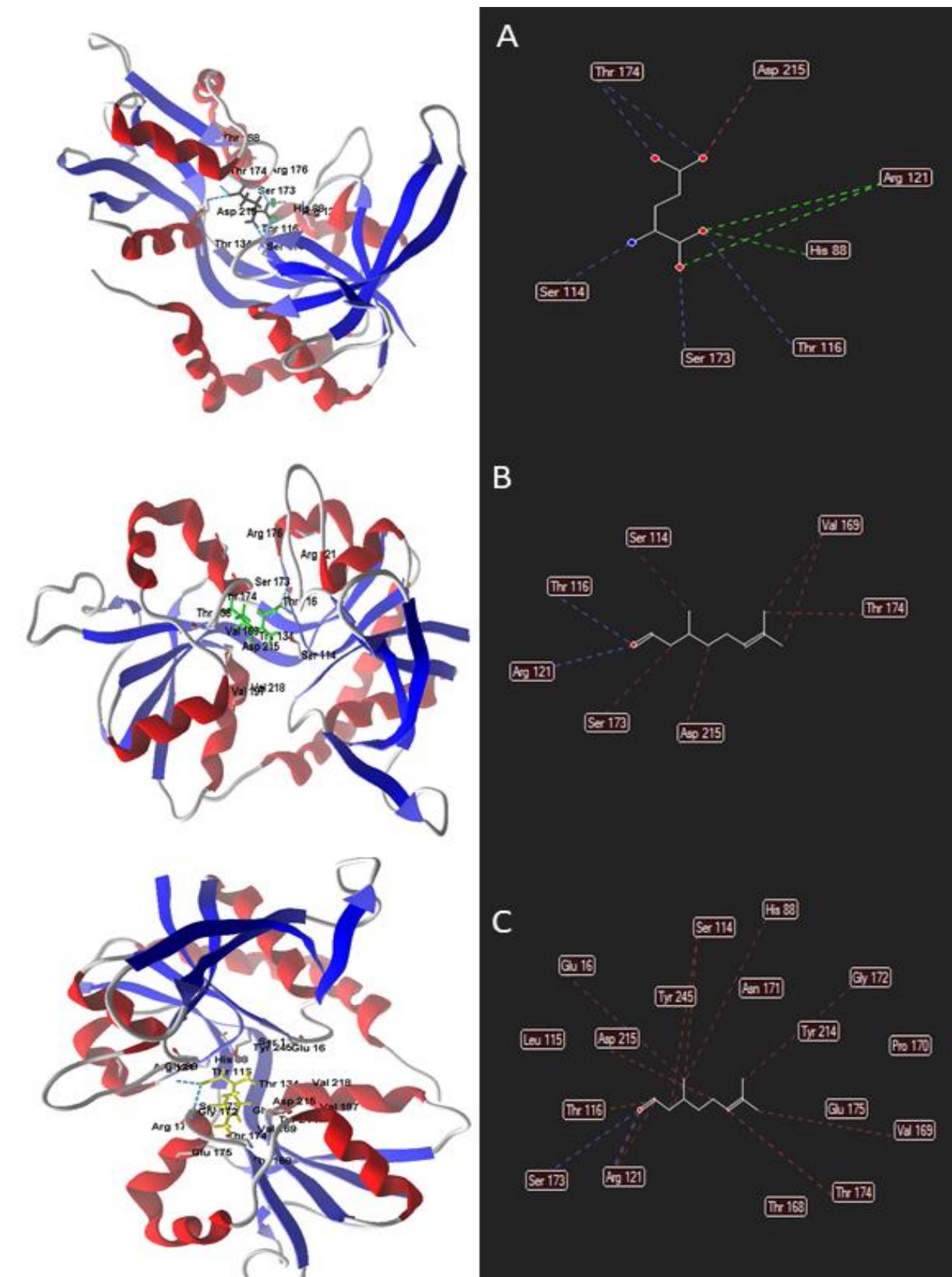
No receptor NMDA as energias não apresentaram grande variação entre os isômeros, ambos apresentando uma proximidade com a energia de ligação da molécula padrão. Porém como visto na **figura 4**, o composto (S)-(-) citronelal apresentou uma maior interação estérica com os resíduos a sua volta, enquanto que o (R)-(+) citronelal não apresentou tantas ligações mas teve uma energia de afinidade ligeiramente maior.

Em relação ao receptor AMPA, foi possível observar uma maior energia de afinidade para o isômero (S)-(-) citronelal, talvez explicada por um maior número de interações de hidrogênio realizadas por sua molécula em comparação ao (R)-(+) citronelal que apresentou apenas uma com o resíduo de arginina 96, visualizado melhor na **figura 5**. Porém com uma interação menor em relação ao ligante padrão, que apresentou mais interações e uma maior energia de afinidade.



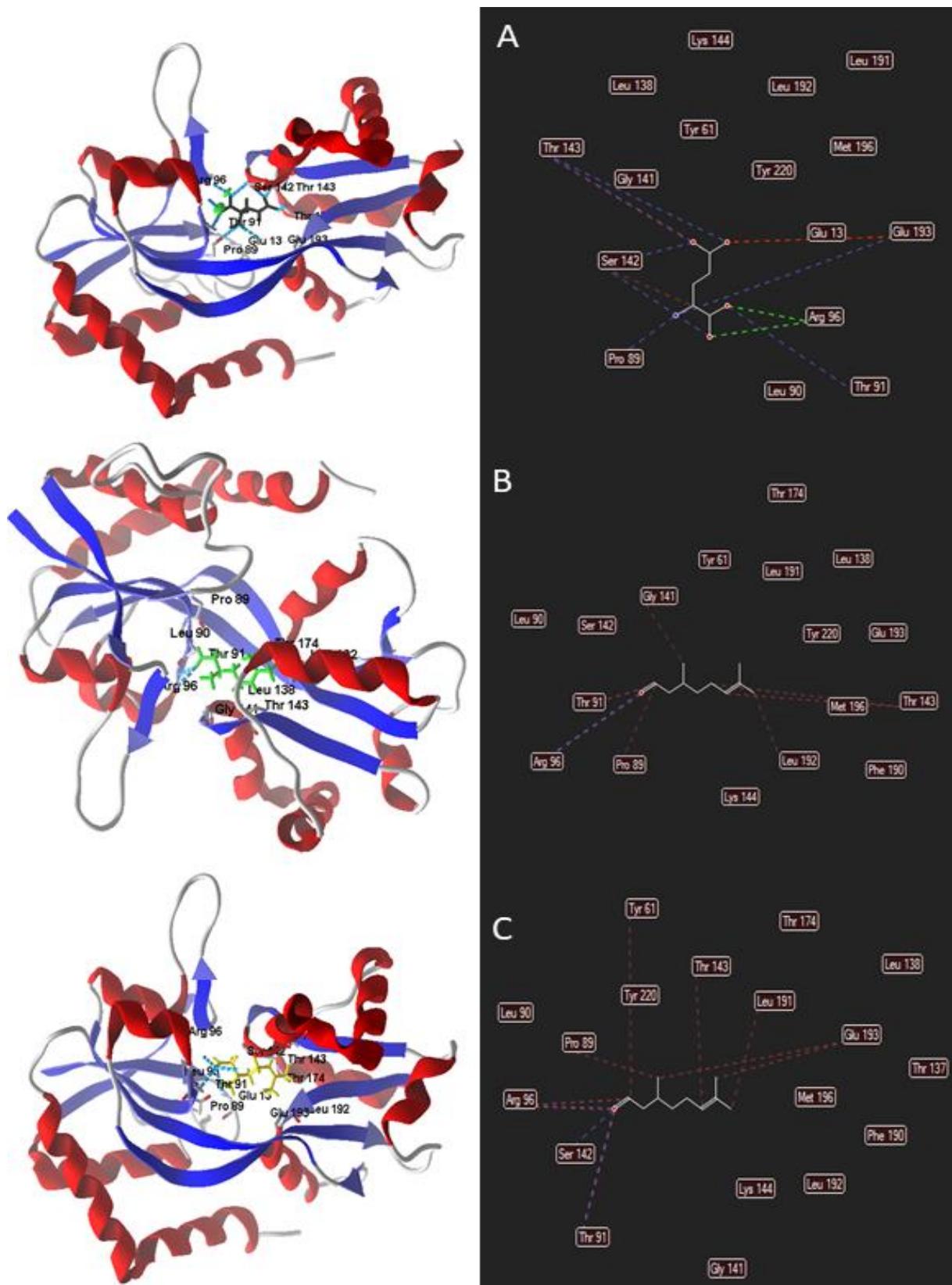
Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2020)

Figura 3- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **mGluR6**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.



Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2020)

Figura 4- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **NMDA**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.



Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2020)

Figura 5- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **AMPA**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do glutamato, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.

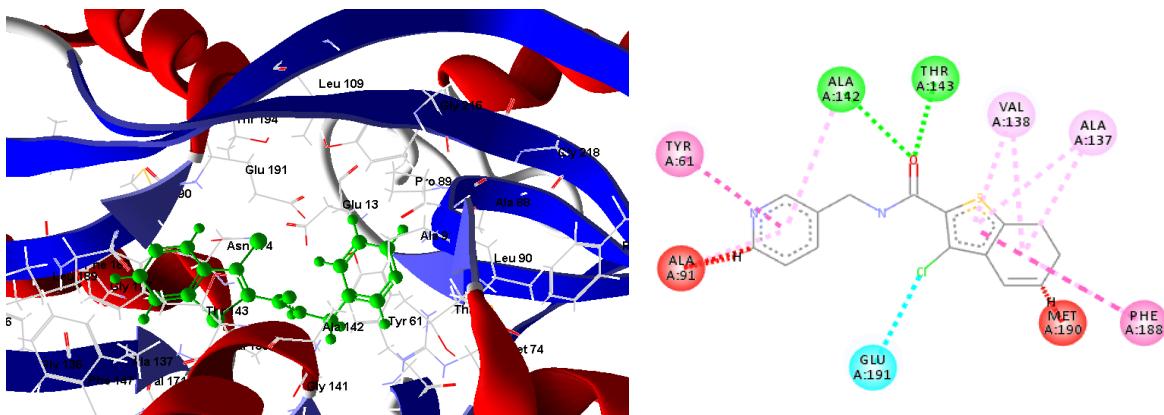


Figura 6 - Interações 2D e 3D entre o Controle positivo 3-cloro-N-(piridin-3-ilmetil)-1-benzotiofeno-2-carboxamida e o receptor de Glutamato 6. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, azul e em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

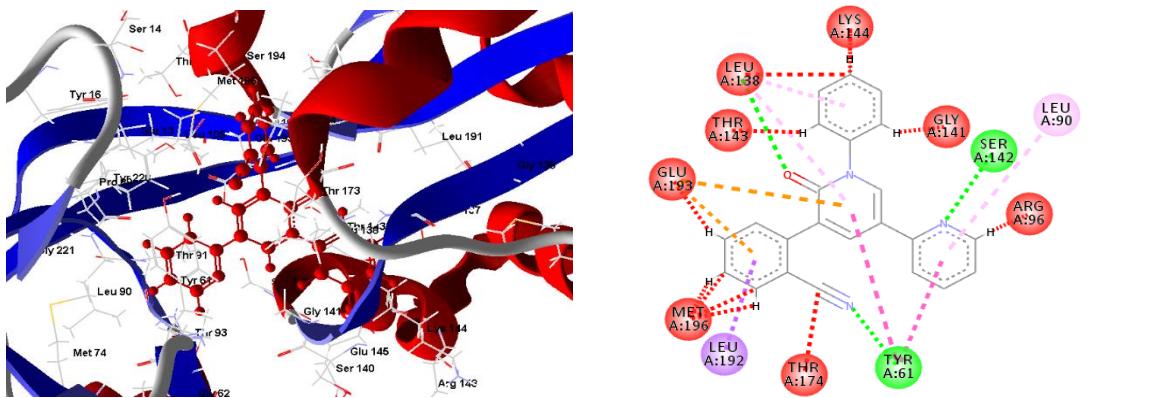


Figura 7- Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Perampanel e o receptor de Glutamato AMPA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

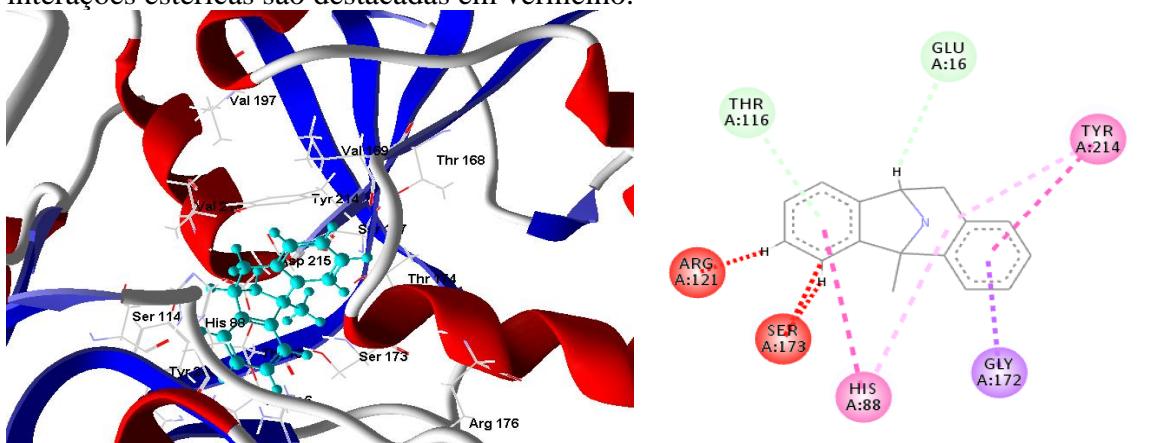


Figura 8 - Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Dizocilpine e o receptor de Glutamato NMDA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

Estudos anteriores demostraram o poder dos receptores glutamatérgicos de mediarem a atividade nociceptiva no organismo, bem como o efeito antiálgico da sua inibição. Desta forma pode-se pensar em que os isômeros (R)-(+) e (S)-(-) citronelal tenham o seu mecanismo de ação relacionados à atuação direta nesses receptores, podendo inibir o efeito nociceptivo da sua ativação ou ativando especificamente alguns de seus subtipos, que são relacionados à modulação e controle da atividade álgica por esta via. Visto que o isômero (S)-(-) citronelal, demonstrou *in silico* uma maior atividade e afinidade por estes receptores, espera-se uma melhor atividade em estudos *in vivo*, ou garantir maior especificidade (NEUGEBAUER, 2002; BLEAKMAN, et al., 2006; PALAZZO, et al., 2017).

Para Santos et al. (2016), a atividade do citronelal está relacionada aos receptores glutamatérgicos, visto que em seus estudos que demonstraram a atividade anti-hiperalgésica do composto frente às metodologias *in vivo* utilizadas, também foi realizada uma atividade *in silico* demonstrando a interação semelhante ao glutamato em receptores do tipo 2 (GluR2). Esta atividade frente aos resultados expostos, concretizam a necessidade de realização de estudos mais completos com a molécula do citronelal e seus isômeros, para elucidação do seu mecanismo de ação e comprovação da sua atividade em receptores glutamatérgicos, bem como participação em outros receptores.

5.1.2 Receptores opioides

A capacidade dos isômeros (R)-(+) e (S)-(-) citronelal de se ligar aos receptores opioides foi demonstrado na **tabela 5**, mostrando as energias de ligação com os receptores: receptor opioide mü (μ ; PDB ID: 5CM1); receptor opioide kappa (κ ; PDB ID: 4DJH); receptor opioide delta (δ ; PDB ID: 4EJ4).

Tabela 5- Docking realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores opióides, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.

Proteína	Nome	Energia (Kcal/mol)	Interação	
4DJH (kappa)	Ligante JDTic	-136.158	Tipo	Resíduos
			Lig-H	-
			Eletrostática	-
	(R)-(+) citronelal		Estérica	5-Asp138, 1-Ile316, 1-Val230, 1-Gln115
4EJ4 (delta)		-70.4943	Lig-H	1-His291
			Eletrostática	-
			Estérica	1-Asp138
(S)-(-) citronelal	-73.1249	Lig-H	-	
		Eletrostática	-	
		Estérica	1-Tyr320	
5C1M (mü)	Ligante naltrindol	-78.3401	Tipo	Resíduos
			Lig-H	1-Tyr129
			Eletrostática	-
			Estérica	2-Asp128
	(R)-(+) citronelal	-67.4009	Lig-H	1-His278
			Eletrostática	-
			Estérica	-
	(S)-(-) citronelal	-67.3551	Lig-H	1-Tyr129
			Eletrostática	-
			Estérica	-

Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2020)

Os compostos (R)-(+) e (S)-(-) citronelal apresentaram uma energia de afinidade com os receptores kappa opioides, porém não tão próximas ao ligante de maior afinidade datado na literatura, JDTic, isto deve ser devido à extensão da molécula para um melhor acoplamento na fenda de sinalização do receptor, como visto no acoplamento da **Figura 9**, além do baixo número de interações realizadas pelo isômero em relação à molécula padrão (WU, et al., 2012).

Para os receptores delta opioides, os isômeros apresentaram energias de afinidade semelhantes porém com diferentes interações, enquanto o (R)-(+) citronelal apresenta interação de hidrogênio com o resíduo de histidina278, o (S)-(-) citronelal apresenta interação de hidrogênio com o resíduo de tirosina129, semelhante ao natrindol, molécula de ação específica para receptores delta opioides, como é possível visualizar na **Figura 10**. O que pode caracterizar uma atuação biológica semelhante da molécula padrão e ativação dos receptores delta opioides pelo isômero (S)-(-) citronelal, podendo apresentar uma atividade distinta do isômero (R)-(+) citronelal no meio *in vivo* apesar das suas energias de afinidade com o receptor serem praticamente idênticas (GRANIER et al., 2012).

Já em relação ao receptor μ opióide foi possível observar uma energia de afinidade distinta entre os isômeros e uma distância entre eles e a atividade do padrão BU72, sendo este um composto de muita afinidade ao receptor μ opióide. (HUANG, et al., 2015) Semelhante à atividade com o receptor delta opióide, foi possível visualizar uma interação de hidrogênio semelhante entre a molécula (S)-(-) citronelal e o padrão, sendo esta realizada no resíduo de tirosina326, como mostrado na **Figura 11**, enquanto que o (R)-(+) citronelal não apresenta interação aparente com nenhum resíduo da proteína.

Estudos anteriores derivaram a atividade antinociceptiva do citronelal da sua interação com receptores opioides, o que poderia ser caracterizado como uma via de supressão central para a dor de grande valia para estudos futuros, entretanto não foi realizado a diferenciação isomérica e utilizado somente a mistura racêmica do produto puro. Foi visto por este estudo *in silico* uma maior probabilidade de ação do isômero (S)-(-) citronelal em relação aos receptores opioides, sendo o receptor delta o de interação mais semelhante ao seu ligante de maior afinidade. Dito isto, é valido serem feitos testes *in vivo* com ambos os isômeros para determinação do que apresenta melhor atividade e formulação do seu mecanismo de ação. (QUINTANS-JUNIOR et al., 2010).

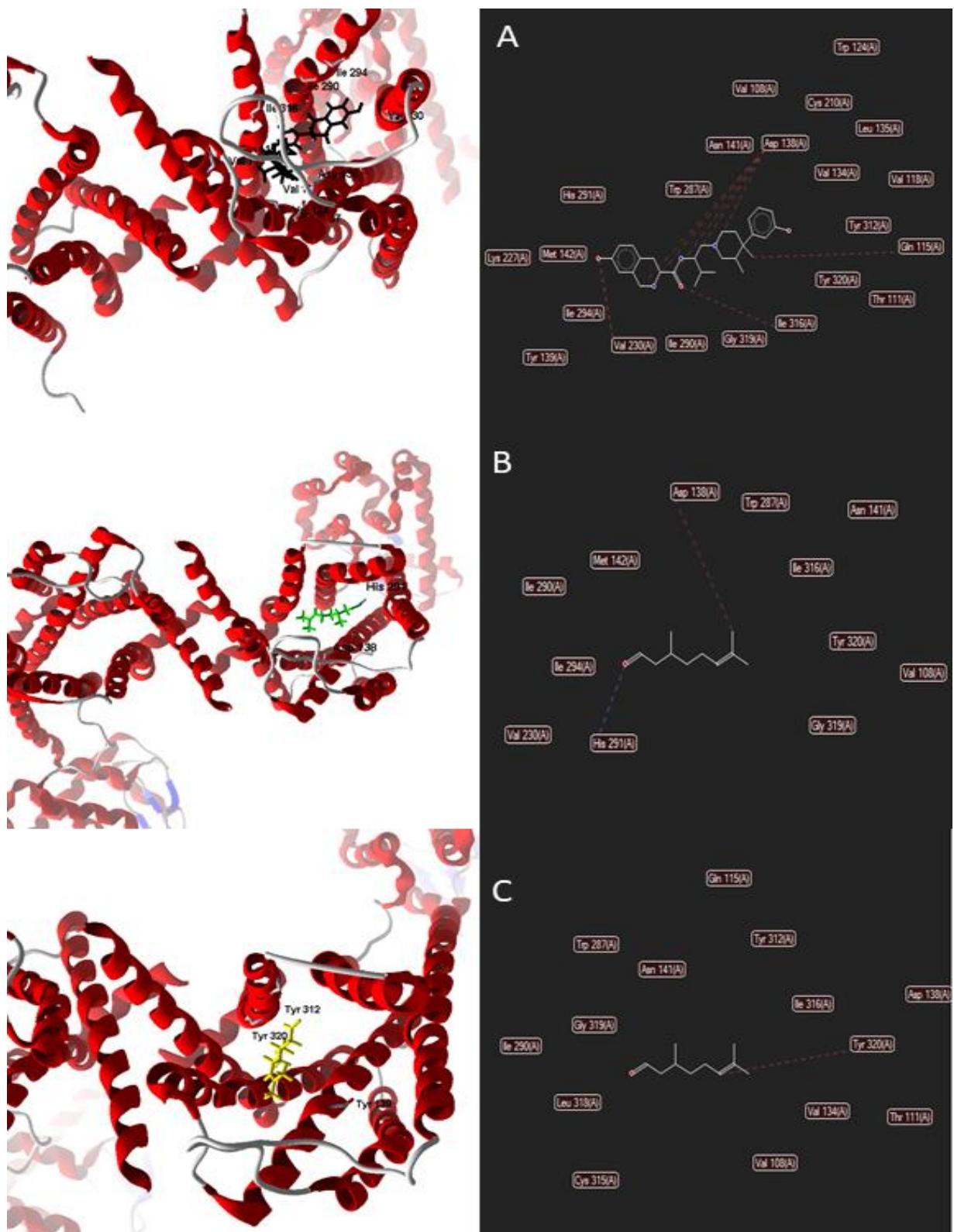


Figura 9- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor kappa opióide. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do JDTic, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.

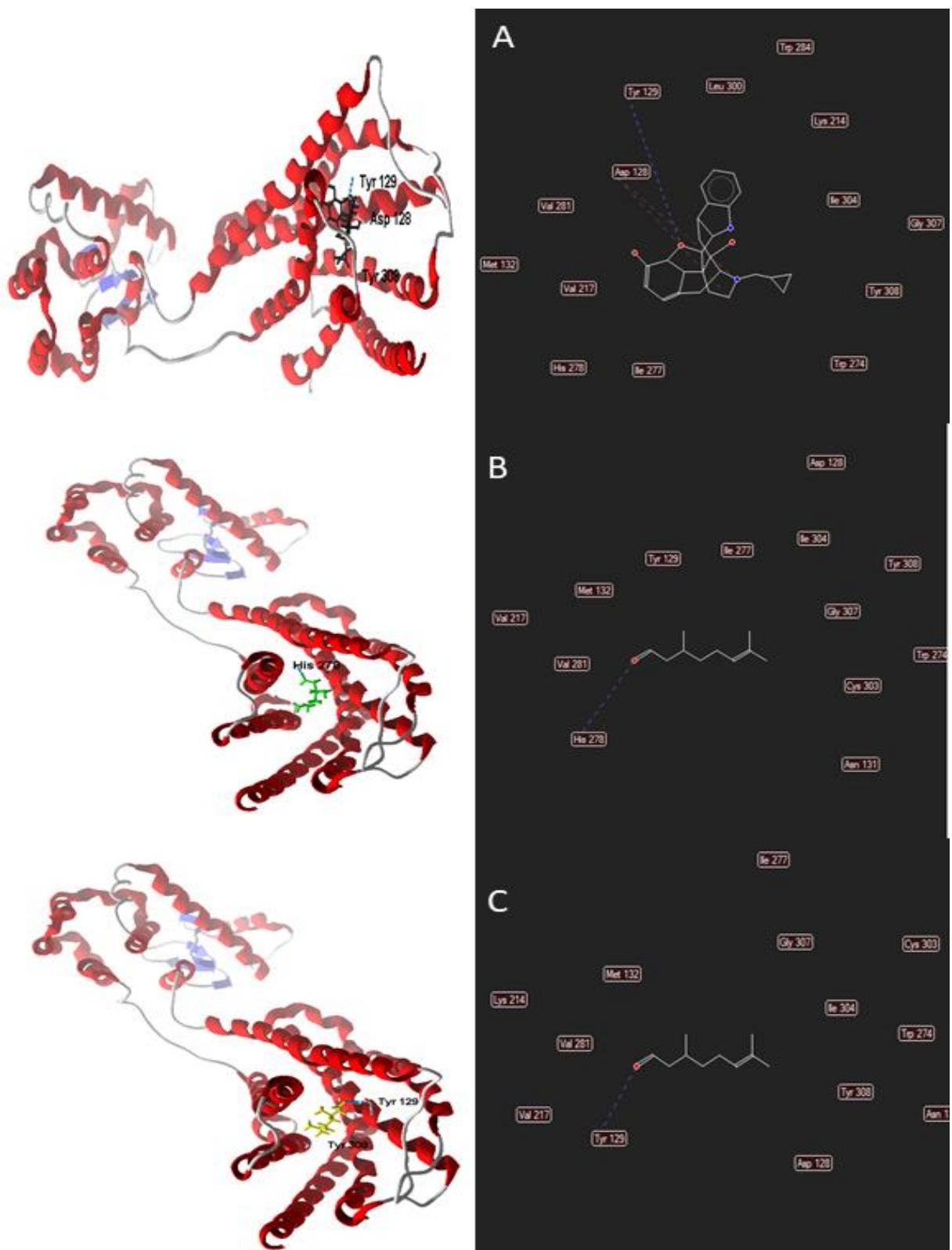


Figura 10- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **delta opióide**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do naltrindol, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.

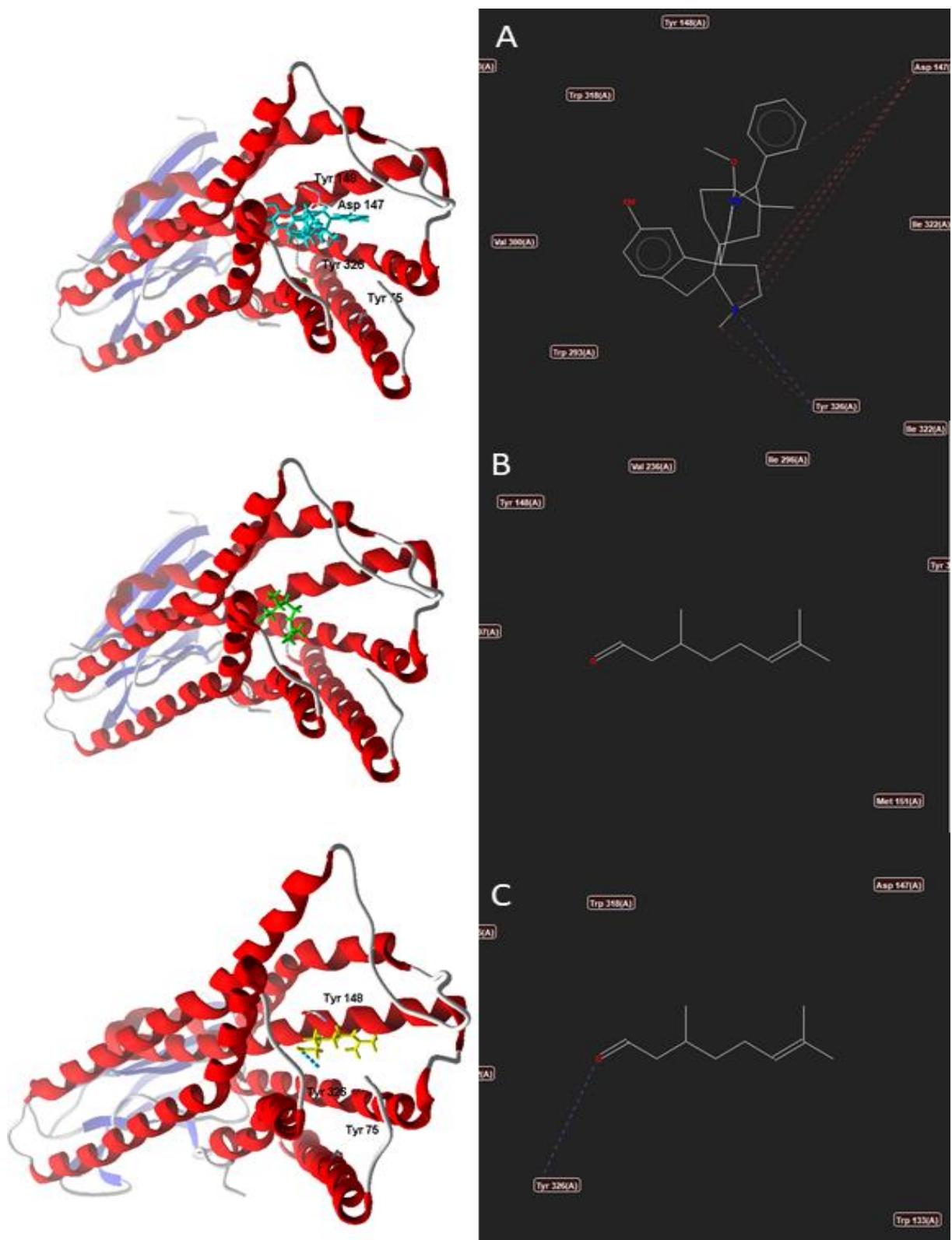


Figura 11- Interação das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor **m μ opióide**. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A**) Molécula do JDTic, como ligante padrão; **B**) (R)-(+)-citronelal; e **C**) (S)-(-)-citronelal.

5.1.3 Receptores de potencial transitório

Os isômeros (R)-(+) e (S)-(-) citronelal não apresentaram grande capacidade de se ligar aos receptores de potencial transitório TRPV1 e TRPM8, como demostrado na **tabela 6**, especificando as energias de ligação com os receptores de potencial transitório. Tanto em energia de afinidade como em interações com resíduos de aminoácidos, os isômeros testados apresentaram uma atividade largamente menor que o ligante padrão. Já para os receptores TRPA1, os compostos testados apresentaram uma interação de maior energia que o seu ligante mais conhecido, o borneol

Tabela 6- Docking realizado com os ligantes (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em receptores de potencial transitório, exibindo os valores da energia de interação, e os resíduos dos quais são feitos essa ligação, dos compostos e do ligante padrão dos receptores.

Proteína	Nome	Energia (Kcal/mol)	Interação	
			Tipo	Resíduos
5IRZ (TRPV1)	Ligante capsaicina	-95.34	Lig-H	1-Arg557, 1-Asp509, 2-Ser512, 2-Glu570
			Eletrostática	1-Arg557
			Estérica	4-Tyr551, 1-Asp509, 5-Ser512, 4-Arg409
			Lig-H	-
	(R)-(+) citronelal	-63.0612	Eletrostática	-
			Estérica	-
			Lig-H	-
TRPM8	Ligante capsazepina	-108.84	Eletrostática	-
			Estérica	1-Val 193, 1-Ala 298
			Lig-H	1-Asn 196, 1-Asn 294
			Eletrostática	-
	(R)-(+) citronelal	-73.78	Estérica	-
			Lig-H	1-Asn 196, 1-Asp 295
			Eletrostática	-
TRPA1	Ligante Borneol	-71.92	Estérica	-
			Lig-H	1-Pro 1034
			Eletrostática	-
			Tipo	Resíduos

			Hidrofóbica	2-Lys 1038, 1-Pro 1034, 1-Met 1042
(R)-(+) citronelal	-76.87	Lig-H	-	
		Eletrostática	-	
		Hidrofóbica	1-Phe 1017, 2-Leu 1023, 1-Ile 976, 2-Phe 1024, 2-His 1018, 1-Lys 704 e 1-Leu 707.	
(S)-(-) citronelal	-74.94	Lig-H	-	
		Eletrostática	-	
		Hidrofóbica	1-Leu 708, 1-Leu 707, 2-Lys 704, 3-Leu 1023, 2-His 1018, 1-Ile 976, 2-Phe 1024	

Fonte: Pesquisa direta com dados do programa Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (2022)

Os receptores de potencial transiente (TRP's) representados neste estudo pelos TRPA1, TRPM8 e TRPV1, apresentaram atividade inferior à substância controle nos casos dos receptores TRPM8 e TRPV1. Enquanto que nos receptores TRPA1 os compostos teste apresentaram uma energia de ligação superior ao composto teste, no caso o borneol, composto de já conhecida atividade sobre essa subfamília de receptores. (TAKAISHI et al., 2014).

Alguns estudos indicaram que certos monoterpenos, como o cinnamaldehyde e o carvacrol, podem interagir com o receptor TRPA1. Por exemplo, um estudo realizado por Alpizar et al. (2013) mostrou que o cinnamaldehyde ativou seletivamente o receptor TRPA1 em neurônios sensoriais, resultando em uma resposta neuronal e na percepção de sensações térmicas e dolorosas. Além disso, o carvacrol, encontrado em óleos essenciais de orégano e tomilho, também foi demonstrado como um agonista do TRPA1 (XU et al., 2006). De acordo com o estudo realizado por Takaishi et al. (2014), foram avaliados diversos monoterpenos para identificar antagonistas mais eficazes do receptor TRPA1. Os resultados revelaram que o borneol, o 2-metilisoborneol e o álcool fenchílico apresentaram efeitos inibitórios mais fortes sobre o receptor TRPA1 humano em comparação com a cânfora e o 1,8-cineol.

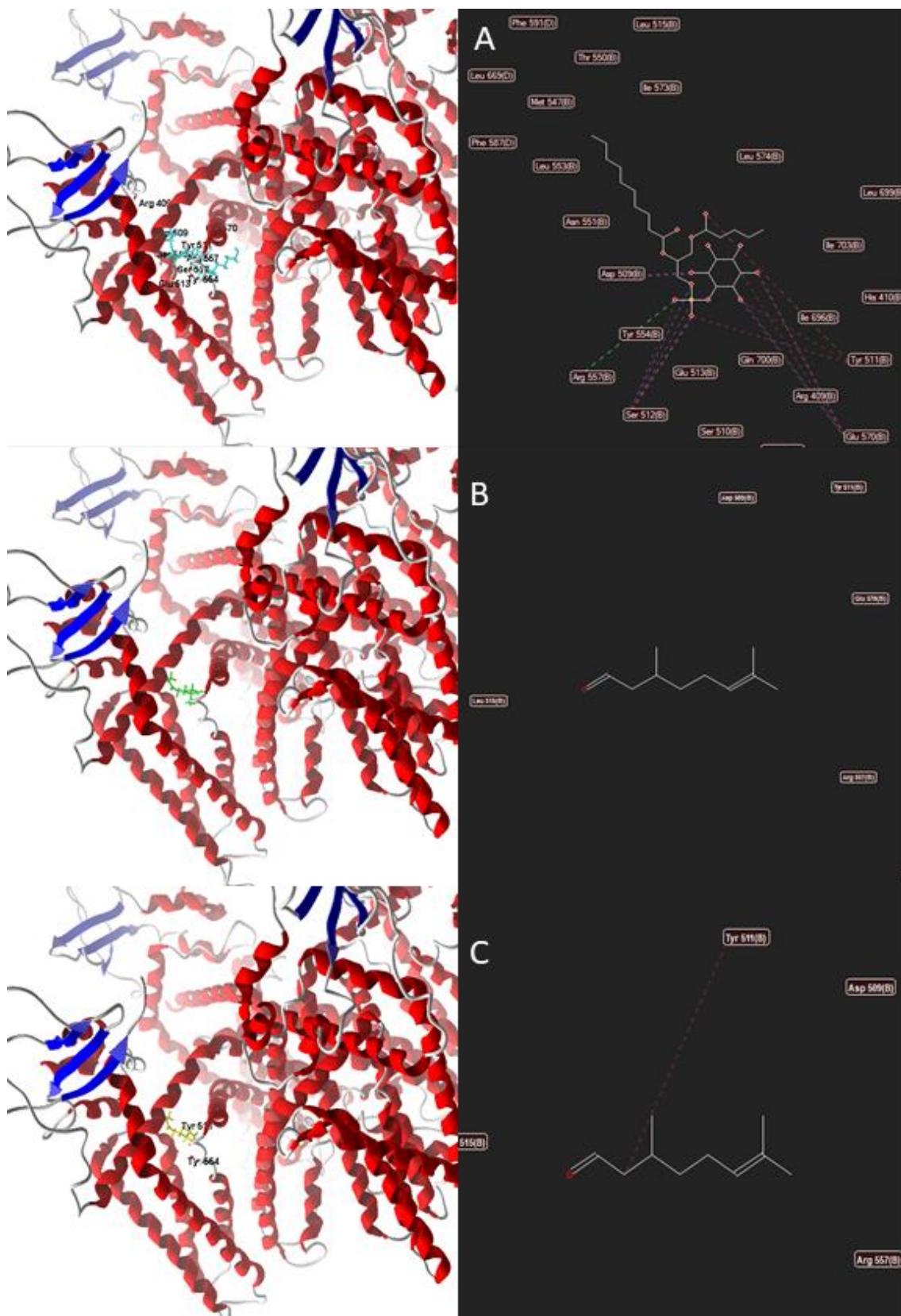


Figura 12- Intereração das moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor TRPV1. Apresentando três tipos de interações, elétrica (pontilhado verde), estérica (pontilhado vermelho) e interações de hidrogênio (pontilhado azul). **A)** Molécula do Capsaicina, como ligante padrão; **B)** (R)-(+)-citronelal; e **C)** (S)-(-)-citronelal.

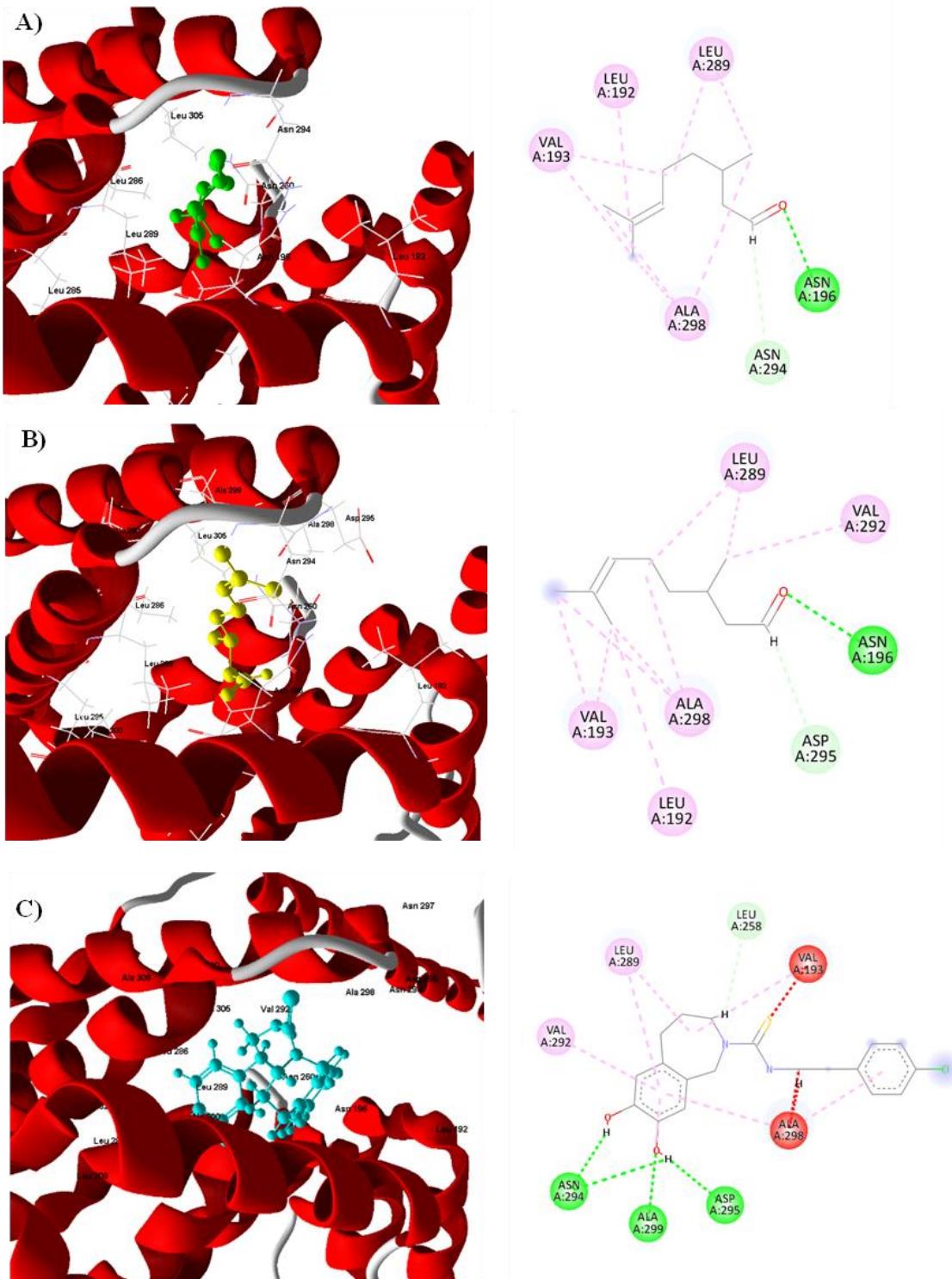


Figura 13- Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Capsazepina e o receptor Transient TRPM-8. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

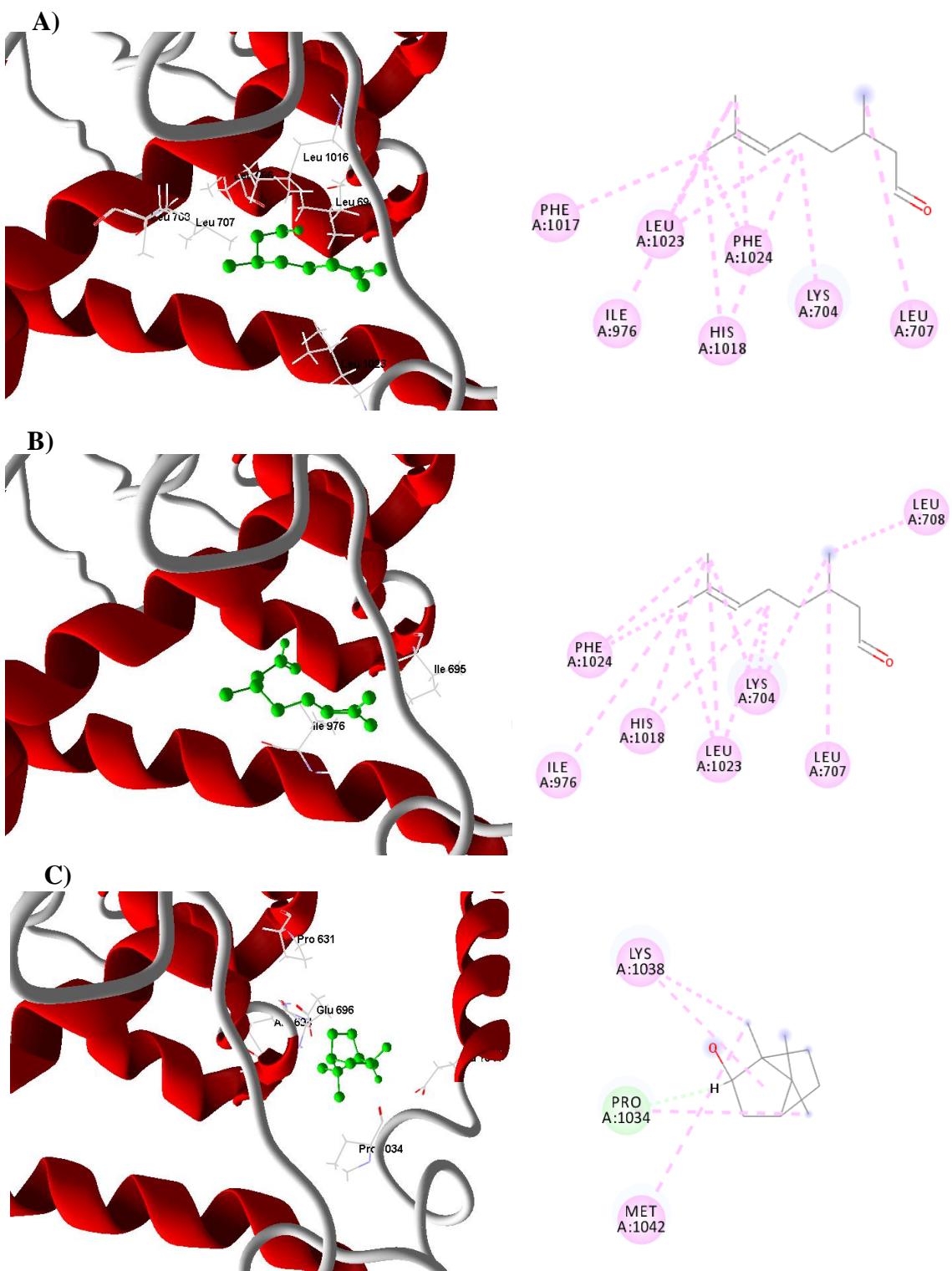


Figura 14 - Interações 2D e 3D entre o (R)-Citronelal (A), o (S)-Citronelal (B) o Controle positivo Borneol e o receptor Transient TRPA1. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa.

Embora os resultados sejam promissores, são necessárias pesquisas adicionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à atividade no receptor TRPA1. Estudos futuros podem explorar mais detalhadamente esses compostos, investigando suas propriedades farmacológicas, concentrações eficazes e possíveis interações com outros sistemas de sinalização.

Alguns outros monoterpenos, como o myrceno e a carvona, de estrutura semelhante ao citronelal, porém diferentes atividades, apresentaram uma atividade regulatória dos receptores TRPV1, demonstrando que nas mínimas modificações estruturais pode-se ter uma grande modificação no seu perfil de atividade biológica. Mostrando assim a necessidade de estudos mais aprofundados quando o assunto é atividade biológica de monoterpenos ou substâncias que apresentem diferentes atividades devido à sua isomeria espacial ou geométrica (GONÇALVES et al., 2013; JANSEN et al., 2019).

Os compostos (R)-Citronelal e (S)-Citronelal apresentaram afinidade nos receptores glutamatérgicos e TRPA1, indicando seu potencial como agentes ativos nessas vias. No entanto, é importante ressaltar que esses resultados são baseados em simulações computacionais (*in silico*) e, portanto, estudos *in vivo* foram necessários para confirmar e aprofundar nossas descobertas. Além disso, outros receptores e vias de sinalização podem estar envolvidos na atividade do citronellal, e explorar esses mecanismos adicionais é fundamental para uma compreensão mais completa de suas propriedades farmacológicas. Essas investigações contribuíram para o desenrolar da pesquisa e afunilamento do estudo de atividade destes compostos no meio *in vivo* tratados a seguir no decorrer deste estudo de novos agentes terapêuticos com propriedades analgésicas e potencial anti-nociceptivo.

5.2 TESTES *in vivo*

5.2.1 Triagem Farmacológica

O S (-)-citronellal apresentou efeitos de analgesia em todas as doses até 1 hora decorrida o experimento, após 2 horas o efeito foi diminuído. Apresentou também efeitos no reflexo de endireitamento e em relação à força e tônus muscular não modificados em todos os momentos do experimento, sem ataxia e diminuição de reflexos. Estes efeitos foram dose dependente. Os resultados observados corroboram com estudos anteriores relacionados ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*. Espécie com grande quantidade de citronellal como principal fitoconstituente, porém não apresentando o efeito depressor e sedante apresentado pelo óleo. (QUINTANS-JÚNIOR, et al., 2008)

Enquanto que o R (+)-citronelal apesentou um discreto efeito de analgesia, já sem observação em 1 hora, demostrou contorções abdominais em diferentes concentrações ao longo do tempo, apresentou diminuição do reflexo corneal e de endireitamento, e resposta ao toque diminuída. Os animais não apresentaram ataxia e diminuição da força.

Como citado anteriormente, o monoterpeno citronellal, dentre outros componentes são capazes de gerar uma leve sedação e efeito depressivo do sistema nervoso, isso é observado de forma mais incisiva no isômero R (+)-citronellal, devido aos seus resultados pode-se supor que alguns dos efeitos colaterais da utilização deste óleo em mistura racêmica esteja relacionado apenas a uma forma enantiomérica. Houve também o fato de apresentar irritação ao trato gástrico do animal, gerando contrações abdominais. Isto também é observado em estudos anteriores e visto que sua atividade antinociceptiva era maior do que este efeito. (QUINTANS-JÚNIOR, et al., 2008; Melo et al., 2010)

5.2.1 Teste do Rota-rod

Após a administração de (R)-(+) e (S)-(-) citronelal na concentração de 50, 100 e 150 mg/kg cada, os animais foram testados no aparelho rota-rod e os resultados são expressos na **Figura 15**, mostrando que não há interferência das substâncias testadas no controle motor dos animais, em comparação ao diazepam na dose de 4 mg/kg, que tem efeito significativo no tempo de permanência dos animais na barra rota rod.

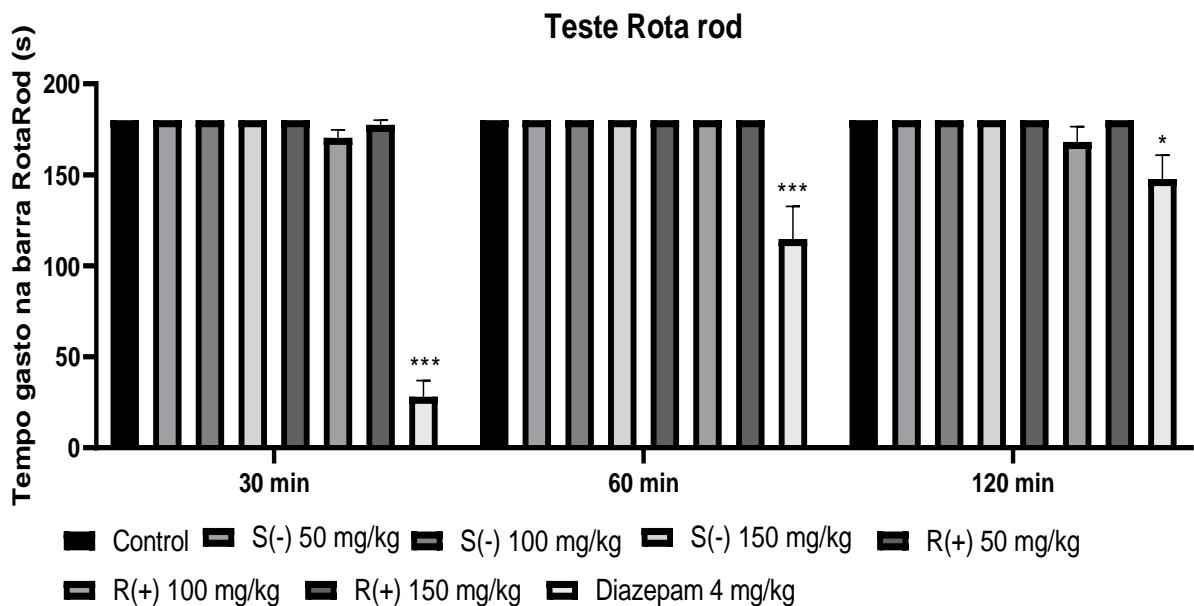


Figura 15 - Efeito dos isômeros do citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de permanência (s) dos animais na rota rod. A coluna representa a média ± E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal vs. controle e Diazepam vs. controle.

O teste Rota-rod é um método amplamente utilizado em pesquisas, pois pode detectar comprometimentos físicos causados por agentes farmacológicos, como relaxantes musculares e depressores do SNC, fortemente relacionados ao comportamento antinociceptivo. No presente estudo, as substâncias não indicaram interferência na coordenação motora desses animais para as concentrações estudadas (50, 100 e 150 mg/kg) de ambos os isômeros citronelal. Como já

visto em estudos anteriores com o citronellal e seguindo a semelhança estrutural, Andrade et al. (2021) estudaram os efeitos do hidroxicitronelal na atividade ansiolítica, chegando a resultado semelhante ao comparar o efeito motor dessa substância. (QUINTANS-JUNIOR et al., 2010)

Conforme observado em outros estudos, os monoterpenos em geral não apresentam efeito negativo no aparelho locomotor, mesmo que tenham efeitos ansiolíticos, isso é importante para a formulação e descoberta de novos compostos, pois seu uso é considerado aceitável em termos de atividade motora e realização de tarefas diárias (SOUTO-MAIOR et al., 2017; MAIA et.al., 2021).

5.2.2 Testes da Placa quente

Os resultados expressos na **Figura 16** demonstram o efeito de acordo com o tempo após a administração dos isômeros (S)-(-) citronelal na concentração de 50, 100 e 150 mg/kg, na permanência dos animais no calor placa. Enquanto a **Figura 17** mostra os resultados do isômero (R)-(+) citronelal nas mesmas concentrações. Em ambos os testes, a morfina na concentração de 10 mg/kg também é utilizada para comparação. O isômero (S)-(-) citronelal a 100 mg/kg (7,6 seg \pm 1,7 seg) apresentou atividade significativa, em relação ao grupo controle ($4,9 \pm 0,1$ seg), e efeito semelhante da morfina ($9,2 \pm 2,0$ seg) a 60 e 120 min após a administração dos compostos.

O isômero (R)-(+) citronelal não pode aumentar significativamente o tempo de latência para os camundongos na placa quente em todas as concentrações testadas. A morfina foi a única capaz de apresentar resultados significativos em todos os tempos do teste.

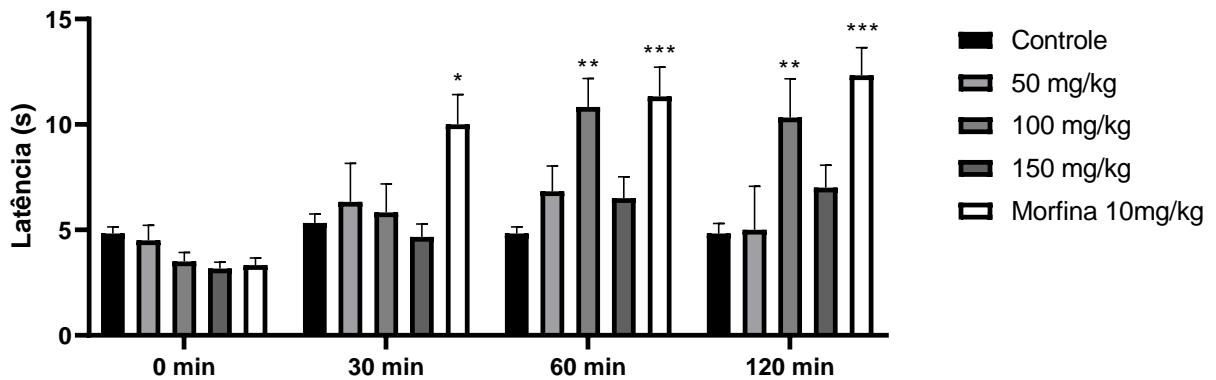
S(-) Citronellal

Figura 16 - Efeito do (S)-(-)-citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de latência (s) dos animais na placa quente. A coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: (S)-(-)-citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.

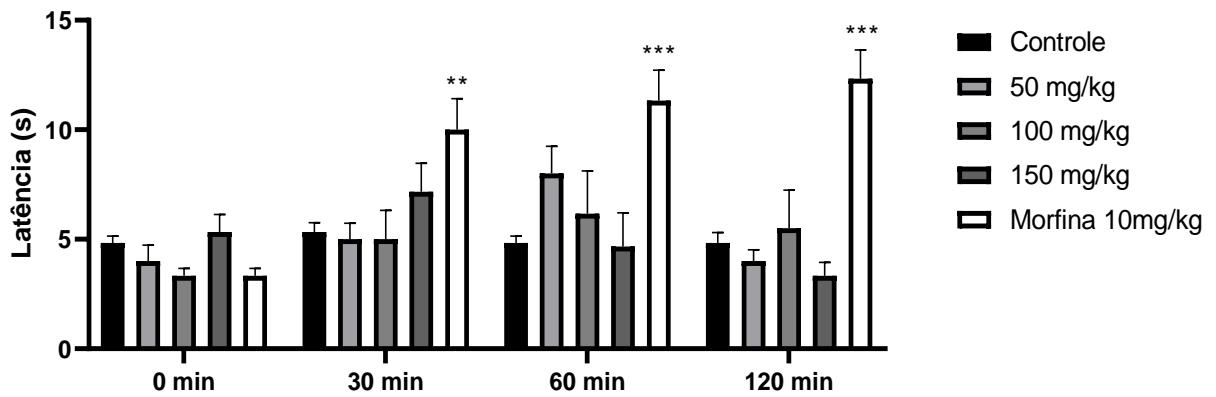
R (+) Citronellal

Figura 17 - Efeito do (R)-(+)-citronelal (mg/kg, i.p.) no tempo de latência (s) dos animais na placa quente. A coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: (R)-(+)-citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.

Para os estudos iniciais de nocicepção foi utilizado o teste da placa quente, que permite avaliar a atividade antinociceptiva do composto quando exposto a um estímulo térmico ao animal. Este estudo apresentou um resultado, por vezes paradoxal, em que apenas uma concentração do isômero (S)-(-) citronelal (100 mg/kg) apresentou efeito significativo, não sendo esta a maior concentração estudada, levando a pensar que a substância pode não seguir o efeito dose-resposta. Estudos anteriores, com citronelal em sua mistura racêmica, mostraram que ele tem efeito antinociceptivo no teste da placa quente, mas não houve o mesmo efeito paradoxal. Enquanto estudos com o composto semelhante, o citronelol, mostraram efeito em concentrações maiores, porém doses menores apresentaram maior significância na resposta em relação a doses maiores, classificando-o como um efeito paradoxal que pode estar relacionado a diversos fatores idiossincráticos da substância ou classe estudada (MELO et. al., 2010; BRITO et. al., 2012b).

5.2.3 Teste da Formalina

Os resultados apresentados a seguir estão relacionados ao teste da formalina, realizado para verificar o tempo de lambedura dos animais em resposta a um estímulo doloroso proveniente da injeção de formalina na planta da pata. O teste compreende duas fases distintas onde a primeira fase denominada fase neurogênica, mede o tempo de lambedura que o animal apresenta nos primeiros 5 minutos de exposição ao estímulo nociceptivo. Enquanto a segunda fase, demonstra a mediação da nocicepção pela sinalização inflamatória gerada pelo animal em resposta ao estímulo da formalina para combater seu efeito (ALMEIDA, 2006).

Na primeira fase (**Figura 18**), os compostos (S)-(-) citronelal nas concentrações de 50 ($42,7 \pm 5,9$ seg) mg/kg e (R)-(+) citronelal nas concentrações de 50 ($46,1 \pm 6,6$ seg) e 100 ($44,3 \pm 9,6$ seg) mg/kg não foram capazes de reverter significativamente o estímulo doloroso

relacionado à exposição à formalina. Enquanto o (S)-(-) citronelal nas concentrações de 100 ($20,3 \pm 3,1$ seg) e 150 ($12,7 \pm 4,8$ seg) mg/kg, (R)-(+) citronelal a 150 ($9,8 \pm 3,9$ seg) mg/kg e morfina a 10 ($5,7 \pm 1,4$ seg) mg/kg tiveram redução significativa no tempo de lambedura dos animais do grupo controle ($58,2 \pm 4,4$ seg).

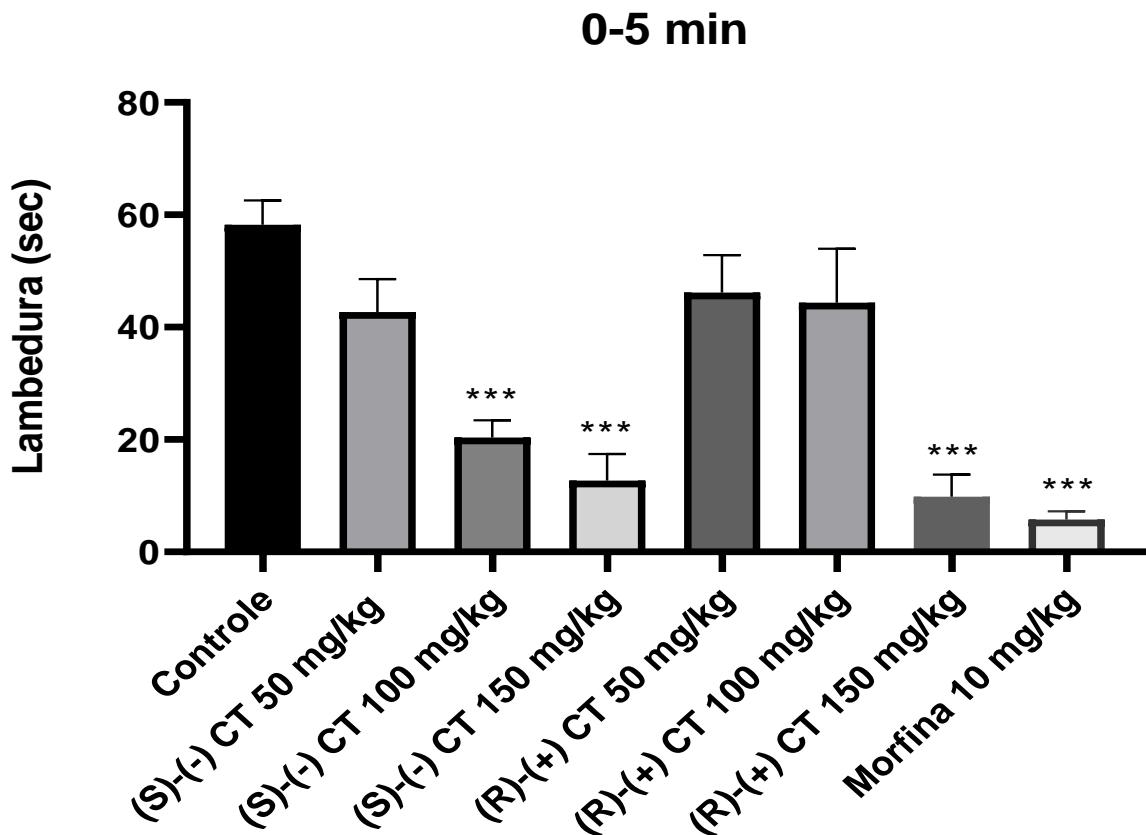


Figura 18 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambida (s) dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra a primeira fase (Fase neurogênica) do teste da formalina, 0 - 5 min. A coluna representa a média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005: Isômeros do citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.

Na **Figura 19** são apresentados os resultados da segunda fase, compreendida a 15 – 30 min de aplicação de formalina, todas as concentrações de isômeros citronelal: (S)-(-) citronelal 50 ($23,7 \pm 20,9$ seg), 100 ($0 \pm 0,0$ seg) e 150 ($1,3 \pm 1,3$ seg) mg/kg, (R)-(+) citronelal 50 (76,3

$\pm 26,3$ seg), 100 ($40,3 \pm 8,2$ seg) e 150 ($4,7 \pm 3,7$ seg) mg/kg e morfina 10 ($4,4 \pm 1,5$ seg) mg/kg; foram capazes de reverter significativamente o efeito inflamatório do grupo controle ($198,6 \pm 15,4$ seg) gerado pelo estímulo da injeção de formalina.

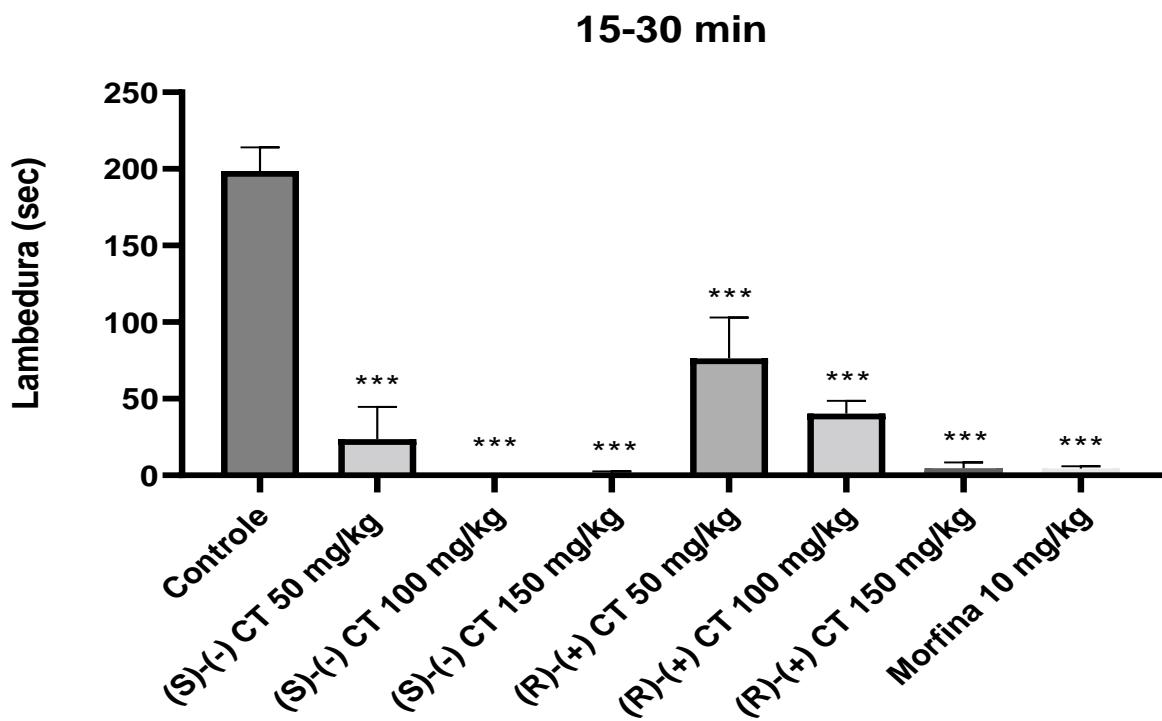


Figura 19 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambida (s) dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra a segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, 15 - 30 min. A coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: Isômeros do citronelal vs. controle e Morfina vs. controle.

Estudos anteriores com citronelal já demonstraram sua atividade e no presente estudo sua atividade foi observada em ambas as fases do teste da formalina, com foco especial na fase inflamatória, onde todas as concentrações foram capazes de inibir significativamente a resposta nociceptiva mediada por fatores inflamatórios gerados por a aplicação de formol. Fica claro o melhor desempenho do isômero (S)-(-) citronelal, que na primeira fase do teste foi capaz de inibir significativamente, em duas concentrações (100 e 150 mg/kg), o estímulo nociceptivo

mediado pela formalina, enquanto o isômero (R)-(+) citronelal, embora também eficaz, só foi capaz de inibir significativamente sua maior concentração (150 mg/kg), bem como seu resultado na fase inflamatória, embora significativo em relação ao grupo controle, apresentou efeito reduzido em duas concentrações (50 e 100 mg/kg), em relação ao uso da morfina ou às concentrações de seu isômero (S)-(-) citronelal (QUINTANS-JUNIOR et.al., 2010).

5.2.4 Análise pela via opióide

Para avaliar se os isômeros de citronelal tinham seu efeito relacionado à via opioide, foi realizado o teste de formalina utilizando naloxona, um conhecido inibidor dessa via. Os resultados estão expressos na **Figura 20**.

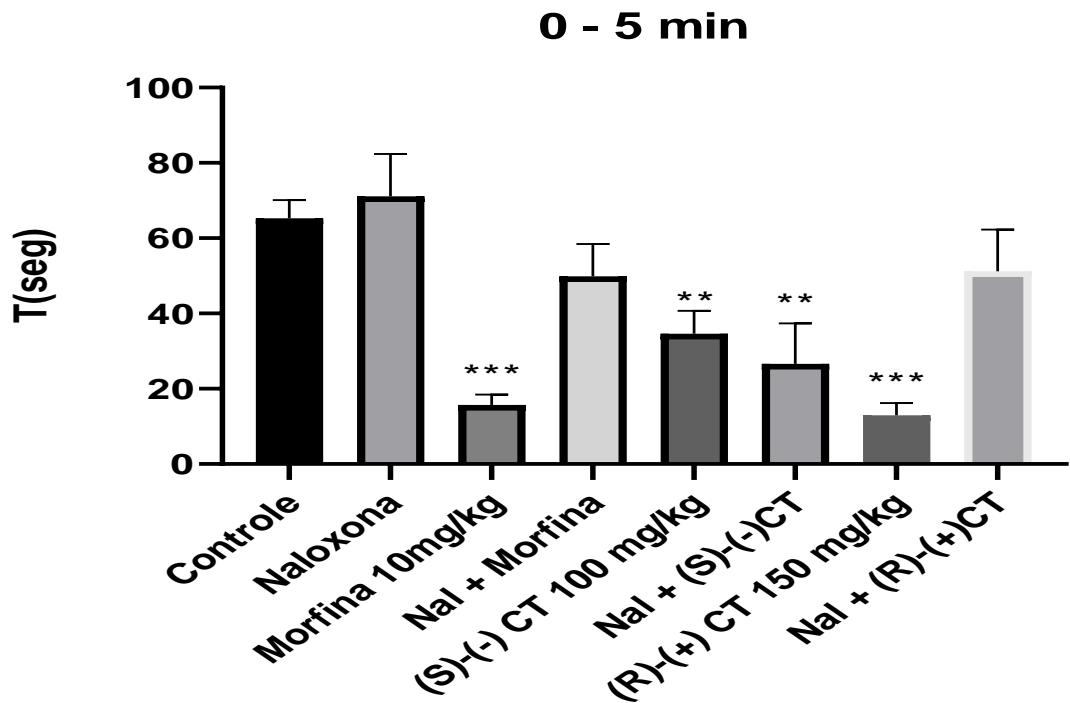


Figura 20 - Efeito dos isômeros do CT (citronelal) (mg/kg, i.p.) no tempo de lambda (s) dos animais no teste da formalina, com ou sem presença de naloxona (Nal). O gráfico mostra (A) a primeira fase (Fase neurogênica), pelo tempo decorrido de 0-5 min, e (B) segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, entre 15 - 30 min. A coluna representa a média ± E.P.M. (n

= 6). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: Isômeros do citronelal com e sem naloxona vs. controle e Morfina com ou sem naloxona vs. controle.

Os animais que foram expostos ao isômero (S)-(-) citronelal, na fase neurogênica, tiveram seus efeitos ($31 \pm 6,7$ seg) mantidos mesmo na presença de naloxona ($26 \pm 10,7$ seg), enquanto o isômero (R)-(+) citronelal teve uma reversão de seu efeito ($12 \pm 3,2$ seg) para um efeito não significativo ($51 \pm 11,1$ seg) em comparação ao controle ($65,3 \pm 4,8$ seg). Isso fica mais evidente na fase inflamatória, onde o isômero (R)-(+) citronelal, na concentração de 150 mg/kg ($6,7 \pm 4$ seg), não foi capaz de inibir o efeito nociceptivo previamente observado em relação ao controle na presença de naloxona (5 mg/kg) ($141,2 \pm 14$ seg). Esse fato foi observado pelo isômero (S)-(-) citronelal, na concentração de 100 mg/kg ($35,7 \pm 15$ seg), que, mesmo na presença de naloxona 5 mg/kg, não teve sua atividade inibida ou revertida (25 ± 24 seg).

Em relação aos estudos da via opióide, e corroborando com os resultados obtidos na analise *in silico*, observou-se que o isômero (R)-(+) citronelal obteve uma reversão de seu efeito pela presença de naloxona, estes resultados apresentam consonância com estudos anteriores que já caracterizavam essa via como a descrita no mecanismo de ação do monoterpeno citronelal. No entanto, em testes realizados com ambos os isômeros, foi possível observar que o isômero (S)-(-) citronelal, mesmo com atividade nociceptiva comprovada em testes anteriores, não teve seu efeito revertido pela presença de naloxona, o que pode sugerir que esse isômero possui um mecanismo de ação diferente de sua contraparte estrutural e não possui os mesmos efeitos colaterais relacionados à via opioide (QUINTANS-JUNIOR et al., 2010).

Alguns autores demonstram o efeito divergente dos isômeros de monoterpeno, que podem atuar em diferentes receptores da mesma família ou mostrar atividade apenas em um dos isômeros, o que pode levar a uma melhora na atividade ao reduzir os efeitos adversos,

demonstrando assim um importante caminho de estudos a serem realizados tanto com produtos naturais quanto com outros de uso geral (KANG et al., 2015).

No estudo de Kang et al. (2015), foi observado que os isômeros de carvona, o (-)-carvona e o (+)-carvona, apresentaram efeitos divergentes. Esses resultados sugerem que os isômeros de monoterpenos podem agir em diferentes subtipos de receptores ou canais, o que pode levar a efeitos biológicos distintos. Essas diferenças podem ser relevantes na busca por compostos terapêuticos mais eficazes e com menor incidência de efeitos colaterais. Sendo vantajoso no desenvolvimento de terapias direcionadas, onde se deseja modular seletivamente um determinado alvo biológico sem afetar outros sistemas ou vias.

Esses estudos fornecem percepções mais atualizadas sobre as interações complexas entre os compostos naturais e os sistemas biológicos, abrindo caminho para a descoberta de novos compostos bioativos e para a otimização de tratamentos existentes.

5.2.5 Avaliação antinociceptiva com alvos específicos

Para os testes subsequentes, o isômero (S)-(-) citronelal, em uma concentração de 100 mg/kg, foi selecionado devido à sua maior eficiência nos resultados anteriores e à sua atividade não detectada pela via opioide. O que, como demonstrado posteriormente, também teve um efeito nos resultados utilizando agentes específicos de mecanismo de dor, como glutamato e capsaicina. Tendo como objetivo avaliar a reação dessa exposição e vislumbrar um possível mecanismo de sua ação antinociceptiva.

O teste do glutamato foi realizado e seus resultados mostrados na **Figura 21 (A)**, demonstrando que (S)-(-) citronelal ($31,8 \pm 10,7$ seg) reduz significativamente o tempo de lambdura aos animais em comparação ao glutamato controle ($62,7 \pm 12,2$ seg), o antagonista

dos receptores NMDA para glutamato, MK ($16,0 \pm 3,3$ seg), mostram como o antagonismo deste receptor é capaz de reduzir significativamente a nocicepção mediada por glutamato. A associação com MK + (S)-(-) citronelal ($3,5 \pm 1,6$ seg) promoveu a redução mais significativa do tempo de lambedura nos animais.

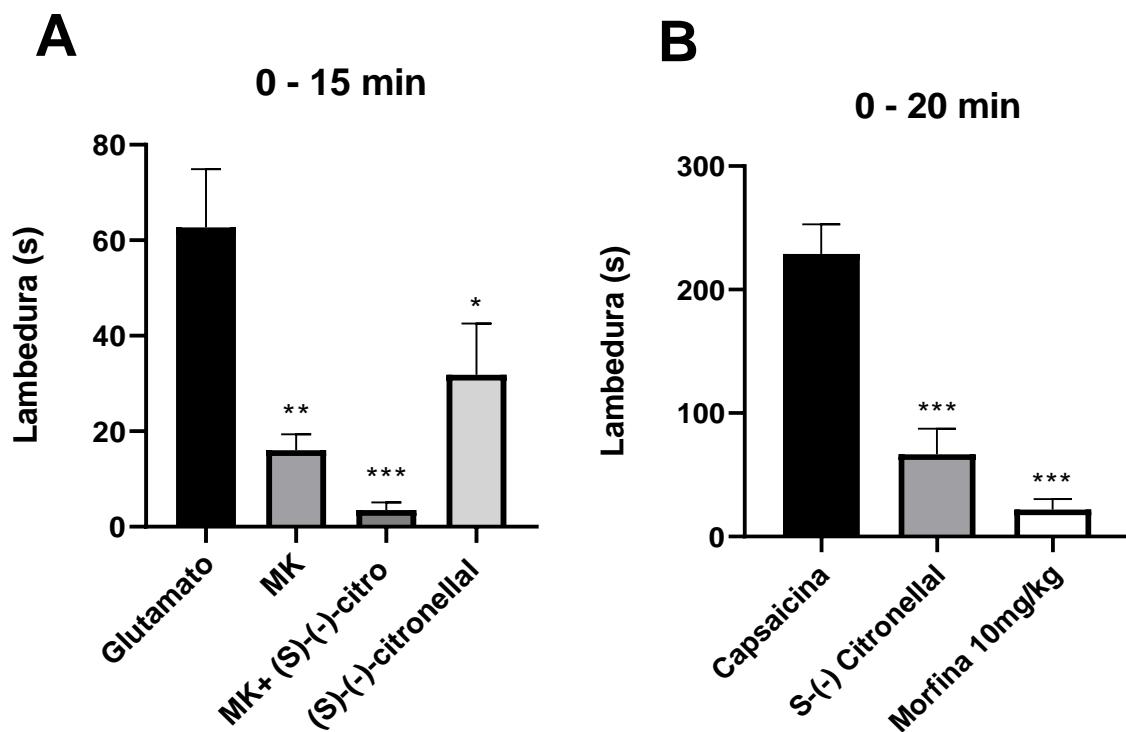


Figura 21 - Efeito do (S)-(-)-citronelal (100 mg/kg, i.p.) (Citro) no tempo de lambida (s) dos animais nos testes específicos de alvo nociceptivo. Teste de Glutamato (A) e Teste de Capsaicina (B). A coluna representa a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: (S)-(-)-citronelal vs. Glutamato; MK vs. Glutamato; (S)-(-)-citronelal vs. Capsaicina e Morfina vs. Capsaicina.

A via glutamatérgica é de grande importância para a transmissão de impulsos nervosos da dor, sendo assim um foco em estudos relacionados à nocicepção. No presente estudo, o composto (S)-(-) citronelal, na concentração de 100 mg/kg, foi capaz de inibir significativamente o efeito nociceptivo desencadeado pela exposição do animal ao glutamato,

mostrando um efeito quase semelhante ao do MK (inibidor dos receptores de glutamato do tipo NMDA), o qual apresenta uma inibição em uma ordem de significância maior em relação ao controle por inibir diretamente o agente algogênico injetado. Mesmo assim, a combinação dos dois compostos (S)-(-) citronelal + MK foi capaz de quase completamente inibir o efeito nociceptivo gerado pelo glutamato, demonstrando que uma ação possivelmente sinérgica dos efeitos pode ocorrer, sinalizando assim um possível mecanismo do (S)-(-) citronelal em um receptor diferente do glutamatérgico NMDA. Alguns estudos prévios mostraram efeitos semelhantes para o citronelal e outros monoterpenos, assim como estudos de *docking* computacional indicam receptores de glutamato como possíveis alvos para o citronelal e monoterpenos em geral, mostrando que são necessários estudos mais específicos para determinar a real interferência do monoterpeno citronelal nesses receptores (ASSIS et al., 2021; SANTOS et al., 2016; COSTA et al., 2020; QUINTANS-JUNIOR et al., 2010).

A **Figura 21 (B)** demonstrou um teste de nociceção mediado pela capsaicina, um agonista do receptor TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid type 1), essa ativação foi significativamente revertida pelo (S)-(-)-citronelal ($66,6 \pm 20,7$ seg) e pela morfina ($21,8 \pm 8,5$ seg), em comparação com o controle de capsaicina ($228,8 \pm 24,1$ seg).

O composto (S)-(-) citronelal, na concentração de 100 mg/kg, foi capaz de inibir o efeito nociceptivo apresentado pela capsaicina. Essa atividade pode ser mediada por receptores do tipo TRPV ou algum mecanismo associado, assim como pela inibição de um receptor da mesma família dos receptores transientes. Atividades semelhantes já foram observadas em estudos prévios e alguns monoterpenos têm sua atividade elucidada intimamente relacionada aos receptores dessa família, como mentol, mirceno, cânfora, eucaliptol, cinamaldeído, entre outros. Ainda assim, são necessários estudos adicionais para determinar um possível mecanismo de ação relacionado aos receptores da família (MELO-JUNIOR et al., 2017; JANSEN et al., 2019; OZ et al., 2015).

A pesquisa sobre os receptores TRP tem uma importância significativa no campo medicinal. Compreender os mecanismos de ativação e modulação desses receptores pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor. Além disso, a identificação de compostos capazes de modular seletivamente os receptores TRP pode ter aplicações clínicas no controle da dor crônica, neuropatias e condições inflamatórias (NILIUS & SZALLASI, 2014). A compreensão mais aprofundada dos receptores TRP e sua função fisiológica pode abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais no tratamento da dor.

Alguns monoterpenos que têm sido investigados em relação à sua atividade nos receptores TRP incluem o mentol, carvacrol, limoneno e linalool, entre outros. Estudos anteriores sugerem que o mentol pode ativar o receptor TRPM8, envolvido na detecção de temperaturas frias e na sensação de frescor. O carvacrol, por sua vez, tem demonstrado potencial para inibir a atividade do receptor TRPA1, que desempenha um papel na detecção de estímulos irritantes e inflamatórios. O limoneno, um monoterpeno cítrico, tem sido objeto de estudos por sua interação com o receptor TRPV3, que está relacionado à regulação da temperatura corporal e da sensação térmica (XU et al., 2006). O linalool, encontrado em plantas como a lavanda e o manjericão, também tem sido investigado por sua capacidade de modular a atividade do receptor TRPA1, envolvido na modulação da dor e da inflamação (LSELVAN et al., 2002).

Diante de tantas atividades é possível também pensar em um efeito indefinido dos monoterpenos, o que também é explicado por semelhanças nas sequências proteicas dos receptores fazendo assim interagirem de forma semelhante com diversos monoterpenos, estes que apresentam uma molécula relativamente pequena e este fato acarreta simultâneas atividades no que é chamado um efeito promiscuo. Porem o paradoxo da diferença de atividade também

é evidenciada em pequenas modificações estruturais, onde até posições estéreo isoméricas são capazes de definir uma atividade diferente para estes compostos (NGUYEN et al., 2021)

5.2.6 Avaliação de mecanismo de ação utilizando antagonistas específicos

Os resultados expressos a seguir são de testes realizados com antagonistas de vias que podem estar relacionadas à nocicepção, levando assim a propor algum mecanismo antinociceptivo para a molécula (S)-(-) citronelal, caso haja reversão de sua atividade.

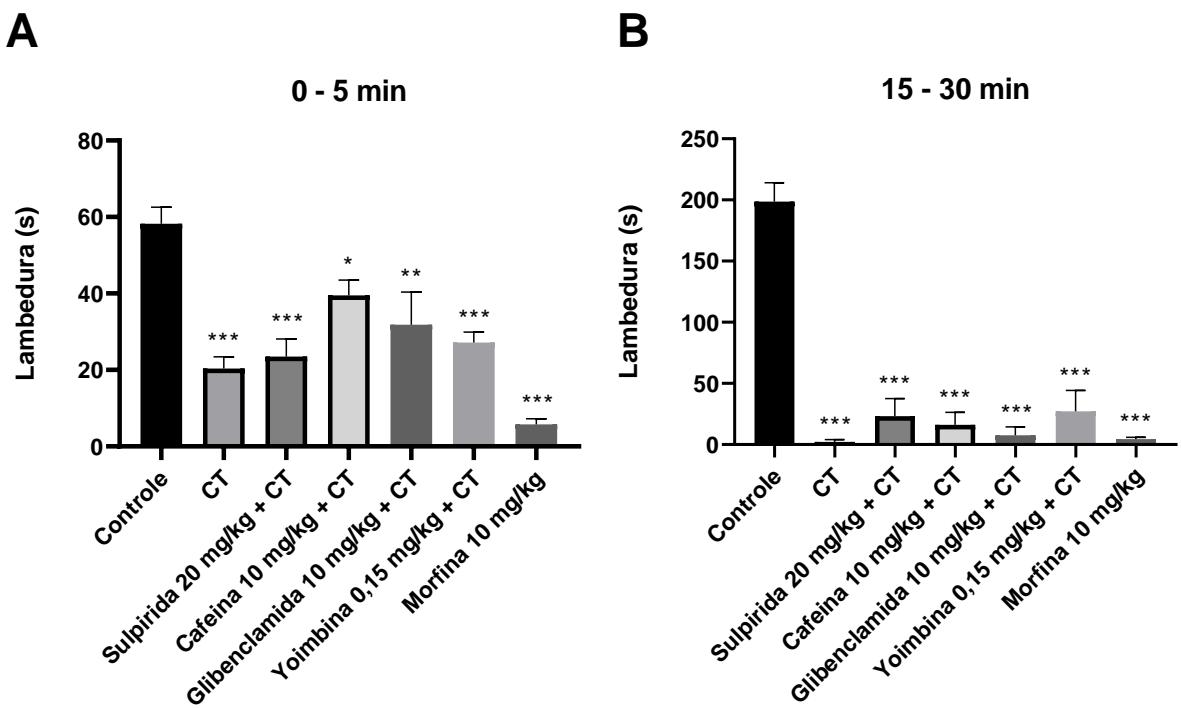


Figura 22 - Efeito do (S)-(-) citronelal (CT) (100 mg/kg, i.p.), no tempo de lambida dos animais no teste da formalina. O gráfico mostra (A) a primeira fase (Fase neurogênica), pelo tempo decorrido de 0-5 min, e (B) segunda fase (Fase inflamatória) do teste da formalina, compreendido entre 15 - 30 min do teste. A coluna representa a média ± E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$: (S)-(-) citronelal vs. controle; (S)-(-) citronelal + antagonistas vs. controle e Morfina vs. controle

A primeira fase do teste (**Figura 22-A**) demonstra o efeito da formalina na fase neurogênica da nociceção, com (S)-(-) citronelal ($20,3 \pm 3,0$ seg) e morfina ($5,7 \pm 1,4$ seg) capazes de revertendo esse efeito no tempo de lambida em relação ao grupo controle ($58,2 \pm 4,3$ seg). Enquanto a associação dos antagonistas com (S)-(-) citronelal não foi capaz de reverter seu efeito de reduzir significativamente o tempo de lambedura do animal, sendo o grupo cafeína + (S)-(-) citronelal ($39,5 \pm 4,0$ seg) que apresentou menor grau de significância em relação ao controle.

Na **Figura 22-B** podemos ver a segunda fase (fase inflamatória) do teste da formalina aplicado a esta metodologia, resultando em uma diminuição significante no tempo de lambedura de todos os grupos em relação ao controle ($198,6 \pm 15,4$ seg), reduzindo mais de 80% do efeito em todos os grupos testados, mostrando que associações com antagonistas não apresentaram reversão de efeito.

Em estudos com antagonistas seletivos para cada via relacionada direta ou indiretamente à nociceção, observou-se que nenhum antagonista foi capaz de inibir completamente o efeito antinociceptivo significativo do (S)-(-) citronelal em relação ao controle. Outros autores determinam o efeito antinociceptivo dos monoterpenos correlacionados com a via opióide, bem como a via glutamatérgica em outros casos, pelo que em qualquer caso é necessário utilizar ferramentas mais aprofundadas para determinar o real mecanismo de ação com que estes monoterpenos são capazes de inibir a nociceção. (LA ROCCA et. al., 2017; PRÓSPERO et. al., 2018; ORTIZ et.al., 2022).

Ainda sobre o efeito dos antagonistas, a cafeína teve um aumento no tempo de lambedura dos animais na fase neurogênica (Fase 1), mas não de forma a reverter significativamente todo o efeito do (S)-(-) citronelal, e esse efeito pode estar relacionado à própria atividade da cafeína, gerando hiperatividade e estado de alerta, que pode ter aumentado levemente a resposta nociceptiva do animal a qualquer estímulo (BARATLOO et.al., 2016).

. Assim, deixando em aberto as possibilidades de estudo para elucidação do mecanismo de ação relacionado ao isômero (S)-(-) citronelal, bem como outras atividades relacionadas a este isômero ou modificações estruturais que possam potencializar seu efeito.

De acordo com estudos anteriores, o monoterpeno citronelal apresentou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, comprovados por modelos de indução de nocicepção orofacial e testes de capacidade antioxidante. No presente estudo, foi possível constatar que o isômero (S)-(-) citronelal apresenta melhores resultados para atividade antinociceptiva em relação ao seu isômero (R)-(+) citronelal. (QUINTANS-JUNIOR et.al., 2011; MELO et.al., 2010).

O isômero (R)-(+) citronelal, embora tenha uma atividade de menor potência, foi possível determinar seu mecanismo de ação relacionado à via opioide. Essa descoberta é importante, pois a via opioide tem sido associada ao controle da nocicepção, embora também esteja relacionada a efeitos colaterais indesejados. Posteriormente os estudos de atividade nociceptiva revelaram que o (S)-(-) citronelal possui uma atividade antinociceptiva significativa. Ele foi capaz de inibir o efeito nociceptivo desencadeado pelo glutamato e pela capsaicina. Esses resultados indicam que o (S)-(-) citronelal pode modular diferentes vias envolvidas na transmissão da dor. No entanto, embora os estudos tenham fornecido insights valiosos, não foi possível elucidar completamente o mecanismo de ação do (S)-(-) citronelal e suas interações com receptores específicos. Há a possibilidade de que esteja correlacionada à via do receptor TRPA1 como indicado pela interação *in silico*. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para compreender melhor esses mecanismos e investigar outras vias de sinalização envolvidas na atividade do citronelal

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a fim de alcançar os objetivos específicos propostos, foram empreendidos os seguintes passos de pesquisa, o que nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- **Modelagem in silico:** Os estudos revelaram a afinidade dos isômeros e interações favoráveis com receptores glutamatérgicos, TRPA1 e receptores opioides, apontando para um potencial promissor como agente ativo nas vias de sinalização
- **Caracterização e comparação dos efeitos no SNC:** Numa compreensão mais abrangente de suas atividades farmacológicas foi possível observar que ambos apresentavam um efeito analgésico de algum grau, porém o isômero (R)-(+) citronelal apresentou bem mais efeitos colaterais relacionados à sua atividade.
- **Avaliação da coordenação motora:** Não foi encontrado nenhum indicio significativo da influencia de ambos os isômeros na atividade motora dos animais, nas doses testadas.
- **Atividade antinociceptiva:** Os isômeros Apresentaram resultados significantes no controle da dor, revelando o potencial do (S)-(-) citronelal como um agente com maior potência.
- **Investigação do mecanismo de ação:** O isômero (R)-(+) citronelal revelou seu mecanismo de ação relacionado à via opioide, relevante para o controle da nocicepção, mas com riscos de efeitos colaterais indesejados. Já o (S)-(-) citronelal, que por sua vez, exibiu atividade antinociceptiva significativa, inibindo o efeito nociceptivo do glutamato e da capsaicina, indicando a modulação de diferentes vias de transmissão da dor. Apesar disso, Não foi possível determinar o seu mecanismo de ação pelos meios utilizados.

REFERÊNCIAS

- ADEOLUWA, O. A.; ADERIBIGLE, A. O.; OLONODE, E. T. Antinociceptive Property Of Olaxsubscorpioidea Oliv (Olacaceae) extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. v. 156, p. 353–357, 2014.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. Triagem farmacológica experimental. v. 10, p. 131–137, 2006.
- ALPIZAR, Y. A. et al. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 465, n. 6, p. 853–864, 2013.
- ANDRADE, J. C. et al. Involvement of GABAA receptors in the anxiolytic-like effect of hydroxycitronellal. **BioMed research international**, v. 2021, p. 9929805, 2021.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de Cymbopogon nardus, Cinnamomum zeylanicum e Zingiber officinale: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Ciencia agronomica**, v. 43, n. 2, p. 399–408, 2012.
- ARAÚJO-FILHO, J. V. DE et al. Anthelmintic activity of Eucalyptus citriodora essential oil and its major component, citronellal, on sheep gastrointestinal nematodes. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria [Brazilian journal of veterinary parasitology]**, v. 28, n. 4, p. 644–651, 2019.
- ARGENTA, S. C. Plantas Medicinais: Cultura popular versus ciência. **Vivências**, p. 51–60, 2011.
- ARULSELVAN, P. et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 1–15, 2016.
- ASSIS, D. B. et al. Antinociceptive activity of chemical components of essential oils that involves docking studies: A review. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 777, 2020.
- ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Disponível em: <<https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>>. Acesso em: 27 out. 2023.

AZEVEDO, J.; WALTER, F. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. **Curr. Drug Targets**, n. 11, p. 327–334, 2010.

BAKKALI, F. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARATLOO, A. et al. The role of caffeine in pain management: A brief literature review. **Anesthesiology and pain medicine**, v. 6, n. 3, 2016.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Nova York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010.

BEAR, M. F.; PARADISO, M. A.; CONNORS, B. W. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4 Porto Alegre: Artmed, 974 p. [s.l: s.n].

BEIRITH, A. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219–228, 2002.

BERNSTEIN, F. C. et al. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of molecular biology**, v. 112, n. 3, p. 535–542, 1977.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E. S. Glutamate receptors and pain. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 17, n. 5, p. 592–604, 2006.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2008. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2432–2479, 2009.

BORGES, W. DE S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química nova**, 2017.

BRASIL. Portaria nº 1083, de 02. de outubro de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília: [s.n.].

BRITO, D. V. et al. Effect of citronella oil, eucalipto and citronellal compound of mycoflora and devolopment of maize plants. **Journal of Biotechonology and Biodiversity**, p. 184–192, 2012a.

BRITO, R. G. et al. Citronellol, a monoterpenic alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of natural medicines**, v. 66, n. 4, p. 637–644, 2012b.

CAVALCANTI, Y. M.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. Screening of essential oils antifungal activity on Candida strains. **Odontologia Clínica-Científica**, p. 243–246, 2011.

CHAPLAN, S.; ECKERT, W., III; CARRUTHERS, N. Drug discovery and development for pain. Em: **Frontiers in Neuroscience**. [s.l.] CRC Press, 2009.

CHEN, Y.-C. Beware of docking! **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 2, p. 78–95, 2015.

COSTA, A. O. C. **Estudo in vitro e in silico da atividade antifúngica dos isômeros R-(+)- e S-(-)citronelal sobre fungos do gênero Cryptococcus**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia de Produtos Naturais). João Pessoa: UFPB, 2017.

COSTA, T. K. V. L. DA et al. Orofacial antinociceptive activity and anchorage molecular mechanism in silico of geraniol. **Brazilian oral research**, v. 34, 2020.

DALE, R.; STACEY, B. Multimodal treatment of chronic pain. **The Medical clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 55–64, 2016.

DAMY, S. B. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. Revista da Associação Médica Brasileira. p. 103–111, 2010.

DE OLIVEIRA FILHO, G. R.; KAMMER, R. S.; DOS SANTOS, H. DE C. Duloxetine for the treatment acute postoperative pain in adult patients: A systematic review with meta-analysis. **Journal of clinical anesthesia**, v. 63, n. 109785, p. 109785, 2020.

DE SANTANA, M. T. et al. Citronellal, a monoterpenic present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 9, p. 1144–1149, 2013.

- DE SOUSA, D. P. Pharmacological effects of the monoterpane alpha, beta-epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170–175, 2007.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.
- DWIVEDI, A. K. et al. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Drug discovery today**, v. 20, n. 7, p. 863–873, 2015.
- EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. J. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 107, p. 385–393, 1953.
- FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. Tradutores: Petrov P., Francisch J. N., Ferreira S. H. Ribeirão Preto - São Paulo, 2011.
- FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. [s.l: s.n.].
- GHANEM, C. I. et al. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 109, p. 119–131, 2016.
- GOLDBERG, D. S. Pain, objectivity and history: understanding pain stigma. **Medical humanities**, v. 43, n. 4, p. 238–243, 2017.
- GONÇALVES, J. C. R. et al. The monoterpane (-)-carvone: a novel agonist of TRPV1 channels. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 2, p. 212–219, 2013.
- GOZZANI, J. L. **Fisiopatologia da Dor**. In: CAVALCANTE, I. L.; MADDALENA, M. L. (Org.). Dor. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p. 13–36, 2003.
- GRANIER, S. et al. Structure of the δ-opioid receptor bound to naltrindole. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. 400–404, 2012.

GRiffin, R. B.; WOOLF, C. J.; GOLAN, D. E. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009.

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica / coordenadora: Luisa Maria Gomes de Macedo Braga. Em: **Tecnologia, Inovações e Comunicações.** Brasília; Tecnologia: Ministério da Ciência, 2019.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

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, 2014.

HAANPÄÄ, M. et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14–27, 2011.

HOEFFEL, J. L. M. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APA's Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, p. 1–25, 2011.

HUANG, W. et al. Structural insights into μ -opioid receptor activation. **Nature**, v. 524, n. 7565, p. 315–321, 2015.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.

HUNG, L.-H.; GUERQUIN, M.; SAMUDRALA, R. GPU-QJ, a Fast Method for Calculating Root Mean Square Deviation (RMSD) after Optimal Superposition. **BMC Res. Notes**, n. 1, 2011.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, p. 769–775, 1985.

- JANSEN, C. et al. Myrcene and terpene regulation of TRPV1. **Channels (Austin, Tex.)**, v. 13, n. 1, p. 344–366, 2019.
- JOHNSON, J. W.; GLASGOW, N. G.; POVYSHEVA, N. V. Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. **Current opinion in pharmacology**, v. 20, p. 54–63, 2015.
- JONES, H. M. et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: A pharmaceutical industry perspective. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 97, n. 3, p. 247–262, 2015.
- KANG, Q. et al. Spontaneous l-glutamate release enhancement in rat substantia gelatinosa neurons by (−)-carvone and (+)-carvone which activate different types of TRP channel. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 459, n. 3, p. 498–503, 2015.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Archives of Veterinary Science, v. 13, n. 1. p. 1–12, 2008.
- KOLLER, G. et al. Pain management in opioid maintenance treatment. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 16, p. 1993–2005, 2019.
- LA ROCCA, V. et al. Geraniol induces antinociceptive effect in mice evaluated in behavioural and electrophysiological models. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 120, n. 1, p. 22–29, 2017.
- LEMONICA, L. Aspectos Psicossociais da Dor. **Âmbito Hospitalar**, p. 27–28, 1997.
- LOPES, L. DA et al. Mechanisms of the antinociceptive action of (−) Epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of Combretum leprosum Mart & Eic in rodents. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 68, 2012.
- LU, Y. et al. Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 61, n. 2, p. 57–65, 2006.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria journal**, v. 10 Suppl 1, n. S1, p. S11, 2011.

MATHEWS, K. et al. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. **The veterinary nurse**, v. 6, n. 3, p. 164–173, 2015.

MATIAS NASCIMENTO MAIA, W. et al. Antidepressant activity of rose oxide essential oil: possible involvement of serotonergic transmission. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06620, 2021.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, v. 12, p. 138–142, 2006.

MELO JÚNIOR, J. DE M. DE A. DE et al. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 247–254, 2017.

MELO, M. S. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, 2010.

MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MIKA, J. Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain - clinical and experimental studies. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1611–1621, 2013.

NAIDU, R. K. et al. Basic Clinical Anesthesia. **Pain management**, p. 265–296, 2015.

NASCIMENTO, D. C. H.; SAKATA, R. K. Dependência de opioide em pacientes com dor crônica. **Revista Dor**, v. 12, n. 2, p. 160–165, 2011.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. p. 123; N.W., Washington, D.C. 20418, USA; 2011.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors - important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**, v. 98, Issue 1. p. 1–8, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

- NGUYEN, T. H. D. et al. Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels. **Communications biology**, v. 4, n. 1, 2021.
- NICHILATTI, L. P.; FERNANDES, J. M. C.; MARQUES, C. P. C. Physiopathology of pain in systemic erythematosus lupus. **Lupus**, v. 29, n. 7, p. 721–726, 2020.
- NILIUS, B.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 3, p. 676–814, 2014.
- OLIVEIRA, H. M. B. F. **Avaliação das atividades antifúngica, antioxidante e citotóxica dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal, (S)-(-)-citronelal, 7-hidroxicitronelal. Tese (Doutorado em Farmacologia de produtos naturais)**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- OLIVEIRA, R. A. G. DE et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77–82, 2006.
- ORTIZ, M. I. et al. Citral inhibits the nociception in the rat formalin test: effect of metformin and blockers of opioid receptor and the NO-cGMP-K⁺ channel pathway. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 100, n. 4, p. 306–313, 2022.
- OZ, M. et al. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 83–97, 2015.
- PALAZZO, E. et al. Nociception modulation by supraspinal group III metabotropic glutamate receptors. **Journal of neurochemistry**, v. 141, n. 4, p. 507–519, 2017.
- PATEL, N. B. Guia para o tratamento da dor em contextos de poucos recursos: Fisiologia da Dor. International Association for Study of Pain. p. 9–13, 2010.
- PHANG, L. K. D.; TAN, K. H. Current pharmacological modalities for control of chronic non-cancer pain. **Trends in anaesthesia and critical care**, v. 3, n. 5, p. 283–288, 2013.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PRÓSPERO, D. F. A. et al. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 293, p. 55–60, 2018.

QUINTANS-JÚNIOR, L. et al. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 6, p. 630–639, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of orofacial pain**, v. 24, n. 3, p. 305–312, Verão 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of Cymbopogon winterianus Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 8, p. 619–624, 2008.

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

REHMAN, A. U. et al. Computational approaches for the design of modulators targeting protein-protein interactions. **Expert opinion on drug discovery**, v. 18, n. 3, p. 315–333, 2023.

SANTOS, P. L. et al. Docking, characterization and investigation of β-cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of Cymbopogon species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 23, n. 9, p. 948–957, 2016.

SARAGIOTTO, B. T. et al. Paracetamol for low back pain. **The Cochrane library**, v. 2019, n. 1, 2016.

SEIXAS, T. L. Chemical Composition and Allelopathic Activity of the Eucalyptus Essential Oil. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 475–483, 2014.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SIMON, J. P.; PRINCE, S. Natural remedies for non-steroidal antiinflammatory drug-induced toxicity. **J Appl Toxicol**, n. 1, p. 71–83, 2017.

SIQUEIRA-CAMPOS, V. M. et al. Current challenges in the management of chronic pelvic pain in women: From bench to bedside. **International journal of women's health**, v. 14, p. 225–244, 2022.

SOUTO-MAIOR, F. N. et al. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpenoid linalool oxide. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 63–67, 2017.

SOUZA, M. M. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85–90, 2000.

STOJANOVIĆ, N. M. et al. Toxic essential oils, part VI: Acute oral toxicity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil in BALB/c mice. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 133, n. 110794, p. 110794, 2019.

TAKAISHI, M. et al. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. **The journal of physiological sciences: JPS**, v. 64, n. 1, p. 47–57, 2014.

TAMADDONFARD, E.; TAMADDONFARD, S.; POURBABA, S. Effects of intra-fourth ventricle injection of crocin on capsaicin-induced orofacial pain in rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 450–457, 2015.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TRAN, N.; PHAM, B.; LE, L. Bioactive compounds in anti-diabetic plants: From herbal medicine to modern drug discovery. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 252, 2020.

WANG, S.-C. et al. Opioid addiction, genetic susceptibility, and medical treatments: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4294, 2019.

WERTLI, M. M.; STEURER, J. Medikamentöse Therapie bei akuten und chronischen lumbalen Rückenschmerzen. **Der Internist**, v. 59, n. 11, p. 1214–1223, 2018.

- WESTON-GREEN, K.; CLUNAS, H.; JIMENEZ NARANJO, C. A review of the potential use of pinene and linalool as terpene-based medicines for brain health: Discovering novel therapeutics in the flavours and fragrances of cannabis. **Frontiers in psychiatry**, v. 12, 2021.
- WILL, J. S.; BURY, D. C.; MILLER, J. A. Mechanical low back pain. **American family physician**, v. 98, n. 7, p. 421–428, 2018.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300–307, 1944.
- WU, H. et al. Structure of the human κ-opioid receptor in complex with JDTic. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. 327–332, 2012.
- XU, H. et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 628–635, 2006.
- YAMAMOTO, T. Analgesic effect of intrathecally administered Teredorexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 170–176, 2002.
- YAN, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel analgesic agents targeting both cyclooxygenase and TRPV1. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 4, p. 849–857, 2016.
- ZHAO, H.; HUANG, D.; CAFLISCH, A. Discovery of tyrosine kinase inhibitors by docking into an inactive kinase conformation generated by molecular dynamics. **ChemMedChem**, v. 7, n. 11, p. 1983–1990, 2012.
- ZVEJNIECE, L. et al. Neuroprotective and anti-inflammatory activity of DAT inhibitor R-phenylpiracetam in experimental models of inflammation in male mice. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 1283–1292, 2020.

ANEXOS

Anexo I- Certificado CEUA



**Universidade
Federal da
Paraíba**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Rectoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE ISOMEROS DE MONOTERPENOS.", protocolada sob o CEUA nº 9586090819 (ID 000829), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; Arata Oliveira Cortez Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 11/10/2019.

We certify that the proposal "COMPARATIVE EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF MONOTERPENE ISOMERS.", utilizing 546 Heterogenics mice (546 males), protocol number CEUA 9586090819 (ID 000829), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; Arata Oliveira Cortez Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 10/11/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 12/2022

Área: Fisiologia E Patologia

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 6 a 7 semanas

N: 546

Linhagem: Mus musculus - Swiss

Peso: 25 a 35 g

Local do experimento: Os testes in vivo serão realizados no Laboratório de Psicofarmacologia/IPeFarM/UFPB, no período compreendido entre as 12:00 e as 17:00 h.

João Pessoa, 16 de agosto de 2021

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO II – PARECER DE RELATÓRIO FINAL CEUA



**Universidade
Federal da
Paraíba**



Universidade Federal da Paraíba

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : RELATÓRIO FINAL v07/03/2023

Certificamos que o RELATÓRIO FINAL (versão de 07/03/2023) da proposta intitulada "AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE ISOMEROS DE MONOTERPENOS.", CEUA nº 9586090819 (ID 057552), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 19/07/2023.

Término previsto: 12/2022

ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Machos	546	336

João Pessoa, 27 de julho de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Universidade Federal da Paraíba



Anexo III – Ficha de triagem Farmacológica

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS				
	até 30'	60'	120'	180'	240'
1. SNC					
a) Estimulante					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Andar em círculos					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Estereotipia					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
b) Depressores					
Abdução das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					

Analgesia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonia					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo de endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2. SNA					
Cianose					
Constipação					
Defecação					
Diarréia					
Força para agarrar					
Lacrimejamento					
Micção					
Piloereção					
Respiração					
Salivação					
Tônus muscular					
3. Mortes					
Obs.:					

Anexo IV- Artigo publicado COVID-19

EXCLI Journal 2021;20:522-536 – ISSN 1611-2156
Received: January 15, 2021, accepted: February 23, 2021, published: March 02, 2021

Review article:

COVID-19: IS REINFECTION POSSIBLE?

Aratã Oliveira Cortez Costa, Humberto de Carvalho Aragão Neto, Ana Paula Lopes Nunes, Ricardo Dias de Castro*, Reinaldo Nóbrega de Almeida

Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research,
 Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

* **Corresponding author:** Ricardo Dias de Castro, Psychopharmacology Laboratory,
 Institute of Drugs and Medicines Research, Health Sciences Center, Federal University
 of Paraíba, Campus I, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil, Phone +55-83-32167742.
 Fax: +55-83-32167175. E-mail: rcastro@ccs.ufpb.br

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2021-3383>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has spread rapidly in many countries, overburdening health systems and causing numerous economic and social impacts. Most studies on the subject have focused on epidemiology, diagnosis, and treatment, however, there remains a scientific gap concerning the possibility of reinfection. The purpose of this bibliographic review is to gather information from studies aimed at this possibility, and to clarify what we know so far. It was found that in many situations cured patients are being released from hospitals, however, in some cases, the discharge criteria are not effective. Patients are presenting positive RT-PCR tests. There are several factors that might interfere so that patients cured of COVID-19 continue to test positive, and this would not necessarily represent a case of recurrence, as the test cannot differentiate the viral RNA from the complete virus, which alone is capable of causing the active infection. This review demonstrates that in order to rule out the possibility of COVID-19 reinfection in cured patients, more robust methods need to be adopted as criteria for both clinical discharge and post-hospital follow-up.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, pandemic, reinfection, recurrence, recover

INTRODUCTION

SARS-CoV-2, the virus responsible for COVID-19, has notably spread to different regions of the world. According to the World Health Organization (WHO), globally, 104,790,123 cases of the disease, and 2,285,048 deaths have been confirmed as of February 6, 2021 (WHO, 2021) and this number is still increasing rapidly. However, the epidemiological characteristics of COVID-19 must also be analyzed from dynamic aspects that consider the prevalence and the rate of asymptomatic contamination (Peirlinck et al., 2020). Underreporting can be seen in data

published by the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University (JHU), which reported 105,504,268 cases of the disease and 2,301,630 deaths (Dong et al., 2020) on February 6, 2021. The data represent a million more cases of the disease. Declared as a pandemic by the WHO, COVID-19 has caused overloading, and in some cases, collapse in the healthcare systems of various countries; severely impacting the global economy, and compromising normally accepted behavioral liberties. The signs and symptoms of COVID-19 are similar to other virus caused respiratory infections, and less than

Original Article

Evaluation of the antinociceptive effect generated by citronellal monoterpene isomers

Avaliação do efeito antinociceptivo gerado por isômeros do monoterpeno citronelal

A. O. C. Costa^a, R. I. A. Rego^a, H. H. N. Andrade^b, T. K. V. L. Costa^c, M. G. S. S. Salvadori^b, R. N. Almeida^b and R. D. Castro^{d*}

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, PB, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Psicofarmacologia, João Pessoa, PB, Brasil

^cUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Odontologia, João Pessoa, PB, Brasil

^dUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica e Odontologia Social, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract

Due to the complex nature of pain and the participation of physical, cognitive, psychological and behavioral aspects, pain management has several approaches. The use of medicinal plants in developing countries is quite expressive. Seeking new options for the treatment of emerging or debilitating diseases. Therefore, the present study seeks to elucidate the effects of the monoterpene, citronellal, differentiating its activity by isomers (R)- (+) and (S)- (-) citronellal. The study used several methods to evaluate the effects of citronellal isomers on motor coordination, nociceptive response, and the involvement of opioid, glutamatergic, and transient receptor pathways. The methods included rota-rod, hot-plate, and formalin tests, as well as the use of specific inhibitors and agonists. Data were analyzed using inferential statistics with a 95% confidence level. Both isomers did not significantly affect the motor coordination of the studied animals. The isomer (S)- (-) citronellal showed better results in relation to its structural counterpart, managing to have an antinociceptive effect in the formalin and hot plate tests with a lower concentration (100 mg/kg) and presenting fewer side effects, however, the this study was not able to elucidate the mechanism of action of this isomer despite having activity in studies with substances that act on specific targets such as glutamate and capsaicin, its activity was not reversed with the use of antagonists for pathways related to nociception. While the (R)- (+) citronellal isomer, despite showing total activity only at a concentration of 150 mg/kg, was able to determine its mechanism of action related to the opioid pathway by reversing its activity by the antagonist naloxone, being this is a pathway already correlated with nociception control treatments, however, it is also related to some unwanted side effects. In this way, new studies are sought to elucidate the mechanism related to the isomer (S)- (-) citronellal and a possibility of use in other areas related to the treatment of pain or inflammation.

Keywords: citronellal, monoterpene, isomer, nociception.

Resumo

Devido à natureza complexa da dor e a sua participação de aspectos físicos, cognitivos, psicológicos e comportamentais, o manejo da dor possui diversas abordagens. O uso de plantas medicinais em países em desenvolvimento é bastante expressivo. Buscando novas opções para o tratamento de doenças emergentes ou debilitantes. Portanto, o presente estudo busca elucidar os efeitos do monoterpeno, citronelal, diferenciando sua atividade pelos isômeros (R)- (+) e (S)- (-) citronelal. O estudo utilizou diversos métodos para avaliar os efeitos dos isômeros de citronelal na coordenação motora, resposta nociceptiva e o envolvimento de vias opioides, glutamatérgicas e de receptores transitórios. Os métodos incluíram testes de rota-rod, placa quente e formalina, além do uso de inibidores e agonistas específicos. Os dados foram analisados estatisticamente com um intervalo de confiança de 95%. Ambos os isômeros não afetaram significativamente a coordenação motora dos animais em estudo. O isômero (S)- (-) citronelal apresentou melhores resultados em relação ao seu homólogo estrutural, conseguindo ter um efeito antinociceptivo nos testes de formalina e placa quente com menor concentração (100 mg/kg) e apresentando menos efeitos colaterais, entretanto, o presente estudo não foi capaz de elucidar o mecanismo de ação deste isômero apesar de ter atividade em estudos com substâncias que agem em alvos específicos como glutamato e capsaicina, sua atividade não foi revertida com a utilização de antagonistas para as vias relacionadas à nociceção. Enquanto o isômero (R)- (+) citronelal, apesar de apresentar de apresentar total atividade somente na concentração de 150 mg/kg, foi capaz de determinar seu mecanismo de ação relacionado à via opióide pela reversão da sua atividade pelo antagonista naloxona, sendo esta uma via já correlacionada com os tratamentos de controle da a nociceção, no entanto, também está relacionada a alguns efeitos colaterais indesejados.

*e-mail: rcastro@ccs.ufpb.br

Received: February 05, 2023 – Accepted: May 04, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anexo VI- Artigo 2

Anais da Academia Brasileira de Ciências



Unlocking the potential of monoterpenes: Understanding the effects on TRP receptors and unveiling the docking of citronellal on nociceptive pathways.

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Costa, Arata; Universidade Federal da Paraíba, Departamento de ciencias farmaceuticas de Sousa, Natália Ferreira; Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas SCOTTI, LUCIANA; Paraiba Federal University Scotti, Marcus; UFPB Almeida, Reinaldo; Universidade Federal da Paraíba, CCS Castro, Ricardo; Paraiba Federal University, Department of Clinical and Social Dentistry
Keyword:	Docking, Isomer, Monoterpene, Nociception, citronellal
Classifications:	Health Sciences

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2 **Unlocking the potential of monoterpenes: Understanding the effects on TRP**
3 **receptors and unveiling the docking of citronellal on nociceptive pathways.**

4
5
6 Aratã Oliveira Cortez Costa¹ <https://orcid.org/0000-0003-0019-0898>; Natália Ferreira
7
8 de Sousa¹ <https://orcid.org/0000-0001-7131-6414>; Luciana Scotti¹
9
10 <https://orcid.org/0000-0003-1866-4107>; Marcus Tullius Scotti <https://orcid.org/0000-0003-4863-8057>; Reinaldo Nóbrega de Almeida² <https://orcid.org/0000-0003-4430-8202>; Ricardo Dias de Castro^{3*} <https://orcid.org/0000-0001-7986-7376>

11
12 ¹Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de
13 Ciências Farmacêuticas, Jardim Universitário, Cidade Universitária, s/n, Campus I,
14 Castelo Branco, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

15
16 ²Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de
17 Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Psicofarmacologia, Campus I,
18 Castelo Branco, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

19
20 ³Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
21 de Clínica e Odontologia Social, Campus I, Castelo Branco, 58051-900 João Pessoa, PB,
22 Brazil

23
24 **Keywords:** Citronellal; Docking; Isomer; Monoterpene; Nociception.

25
26 **Running title:** Monoterpenes & Citronellal: TRP Receptors Insight.

27
28 **Seção dos AABC: HEALTH SCIENCES**

29
30 *Corresponding author: Health Sciences Center, Federal University of Paraiba, Campus
31 I, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil, Phone +55-83-3216-7742. E-mail:
32 rcastro@ccs.ufpb.br