

AVALIAÇÃO DO R-(+)-LIMONENO NA CAIXA DE INALAÇÃO DE COMPOSTOS OU MISTURAS VOLÁTEIS UTILIZANDO CG-MS

Cinthia Rodrigues Melo¹; Mateus Feitosa Alves²; Gabriel Chaves Neto³; Socrates Golzio dos Santos⁴; Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz⁵

¹ Universidade Federal da Paraíba – cinthiamelo_rm@hotmail.com

² Universidade Federal da Paraíba - mateusfalves@gmail.com

³ Universidade Federal da Paraíba - gabrielchavesufpb@hotmail.com

⁴ Universidade Federal da Paraíba - socratesgolzio@gmail.com

⁵ Universidade Federal da Paraíba - margarethdiniz.ufpb@gmail.com

RESUMO: As plantas medicinais são largamente utilizadas pelo homem no tratamento dos seus males desde os primórdios da civilização. Entre as mais diversas espécies vegetais algumas têm despertado interesse dos pesquisadores, como é o caso das “Plantas Aromáticas” cuja atividade tem sido atribuída aos óleos essenciais. O R-(+)-limoneno é um monoterpene encontrado em várias espécies de plantas aromáticas e possui diversos efeitos farmacológicos, como ansiolítico e gastroprotetor. A caixa de inalação, sob número de patente BR 10 2013 017201-4 A2, é bastante utilizada para possíveis efeitos farmacológicos de óleos essenciais em animais. Este estudo tem como objetivo encontrar uma atmosfera ideal para o monoterpene R-(+)-limoneno quando utilizados em estudos pré-clínicos farmacológicos. Os resultados mostraram que no tempo de 3 minutos não foi possível haver a identificação deste monoterpene. A partir de 13 minutos (3,77 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) há o aparecimento de um pico cromatográfico característico do R-(+)-limoneno, sendo assim confirmado pelo seu espectro de massas. Em 23 e 33 minutos as concentrações do monoterpene na caixa foram de 5,92 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ e 7,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectivamente. O tempo de 33 minutos foi considerado como o tempo na qual o óleo essencial chega ao ponto de saturação. Porém, segundo a literatura concentrações acima de 5,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ promove um processo de broncoconstrição em animais, dificultando a sua respiração. Portanto, a partir desta avaliação, podem-se determinar concentrações do R-(+)-limoneno para aplicação de estudos pré-clínicos farmacológicos, garantindo a eficácia e efeito desta substância.

PALAVRAS-CHAVES: Caixa de inalação, padronização, R-(+)-limoneno, CG-MS.

INTRODUÇÃO

Os efeitos da terapêutica dos óleos essenciais nas doenças físicas e psicológicas são bem conhecidos. Estudos com aromaterapia têm relatado as propriedades medicinais dos aromas que vem sendo utilizados a milhares de anos por humanos para tratamento de várias doenças (KUTLU et

al., 2008). Os óleos essenciais, administrados por via inalatória, estimulam os nervos olfatórios que exercem um efeito sobre o cérebro, o que resulta em alterações de comportamento em animais e seres humanos (SU et al., 2009; LAWLESS, 2002). A sua utilização pode representar um método alternativo para o tratamento de patologias, tais como a ansiedade (ALMEIDA et al.,

2004), convulsões (SOUSA et al., 2006), dor e inflamação (ALMEIDA et al., 2001).

O monoterpeno R-(+)-limoneno (1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene) (figura 1) está presente em altas proporções em frutas cítricas e é comercializado por muitos fabricantes de óleos essenciais (MALHOTRA et al., 2009). É encontrado em várias plantas, tais como *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (Verbanaceae) (VALE et al., 2002), *Artemisia dracunculul L.* (Asteraceae) (SAYYAH et al., 2004), e em outras espécies de plantas aromáticas. Apresenta atividade antinociceptiva quando administrado intraperitonealmente (AMARAL et al., 2007). Além disso, tem sido relatada a ação deste monoterpeno como modulador do estresse oxidativo e de possuir uma atividade quimiopreventiva (MANUELE et al., 2010), reduzindo tumores induzidos na pele de animais (CHAUDHARY et al., 2012). Estudos anteriores mostraram que a administração do R-(+)-limoneno (0,5% e 1,0%) em camundongos por via inalatória produziu um efeito ansiolítico em um modelo de labirinto em cruz elevado (LIMA et al., 2013).

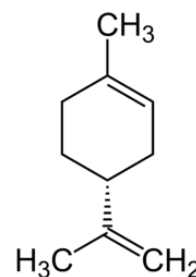


Figura 1: Estrutura química do R-(+)-limoneno.

Pesquisas envolvendo a exposição prolongada do R-(+)-limoneno por via inalatória devem ser mais realizados uma vez que o limoneno possui muitas aplicações comerciais e tem sido apresentado como solventes ambientais (ROLSETH et al., 2002).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é um método analítico que combina as duas técnicas para identificar substâncias diferentes dentro de uma amostra de teste. Aplicações de GC-MS incluem a detecção de drogas, investigação de incêndio, análise ambiental, investigação explosivos e identificação de amostras desconhecidas (DORAMN et al., 2010).

Portanto, este estudo tem como objetivo realizar a avaliação do monoterpeno R-(+)-limoneno na caixa de inalação com o fim de correlacionar a atmosfera ideal para a utilização desta substância em experimentos com animais.

METODOLOGIA

Caixa de inalação

A caixa de inalação de dimensões 36,5 cm X 28,5 cm X 31 cm é constituída de acrílico revestida com o material alumínio. As duas paredes de maior largura contêm quatro furos com 2 cm de diâmetro cada um. Este aparato possui uma tampa também constituída de acrílico e revestida de alumínio. A tampa é toda perfurada com a finalidade de permitir uma entrada dos gases que compõem o ar facilitando a respiração do animal. A caixa de inalação utilizada tem como número de depósito de patente BR 10 2013 017201-4 A2.

Realização dos experimentos

Na caixa de inalação foi injetado com uma microseringa Hamilton 50 µL de R-(+)-limoneno (97%) no orifício localizado no centro da tampa. Em seguida após um período de saturação inicial de 3 minutos, foram retiradas alíquotas de 10 µL da atmosfera do sistema gasoso em estudo utilizando uma microseringa nos intervalos de tempos: 3 min, 13 min, 23 min e 33 min.

Parâmetros cromatográficos

Os cromatogramas foram obtidos de um cromatógrafo a gás diretamente interfaciado com um espectrômetro de massas (Shimadzu

GC-MS-QP5050A). Coluna capilar com fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, fabricada pela J & W Scientific.

A programação de temperatura inicial foi de 70°C a 105 °C (8°C/min) depois segue até 250°C (40°C/min), e temperatura de interfaciamento de 250°C; apresentando tempo de programação de 9,0 min. A temperatura do injetor foi de 250°C, o hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,5 mL/min, com razão de Split de 1:5. O volume de injeção foi de 10 µL.

A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico a 70 eV, com detector de 1,25 Kv. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massas de 45 a 450 u.m.a. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C. A identificação dos compostos foi realizada comparando seus espectros de massas com os espectros existentes no banco de dados do equipamento (biblioteca Willey/NBS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os óleos essenciais, o R-(+)-limoneno é um monoterpene prevalente em vários óleos essenciais que apresenta ações deste em nível de SNC: atividade anticonvulsivante (VIANA et al., 2000),

antinociceptiva (AMARAL et al., 2007) e ansiolítica (LIMA et al., 2013).

Com um método inovador foram realizados a quantificação do R-(+)-limoneno na caixa de inalação a fim de correlacionar a atmosfera ideal para a utilização da substância em experimentos com animais. Os cromatogramas e os espectros de massa obtidos a partir da padronização da caixa de inalação com o R-(+)-limoneno estão representados nas figuras 2 a 6. A partir dos valores das áreas dos picos em função da concentração de limoneno padrão pode-se chegar a equação linear: $y = 144098x - 137498$ com $r^2 = 0.9996$. A partir desta equação as concentrações do limoneno foram calculadas para os tempos 13, 23 e 33 minutos (tabela 1).

O ponto de amostragem inicial (3 minutos) resultou na não identificação do R-(+)-limoneno na atmosfera da caixa (tabela 2 e figura 2). A identificação foi possível após 10 min da aplicação do R-(+)-limoneno obtendo uma concentração de $3,77 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (figura 3). O espectro de massa (figura 6) mostra o pico base evidenciando à molécula do R-(+)-limoneno (MM = 136 g/mol).

Tabela 1: Parâmetros analíticos da cinética de dispersão do limoneno.

Pontos de Amostragem	Parâmetros Analíticos		
	Tempo de	Área	Conc.

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

	Coleta		($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
LT1	3 min	-	-
LT2	13 min	405,586	3,77
LT3	23 min	714,868	5,92
LT4	33 min	952,220	7,56

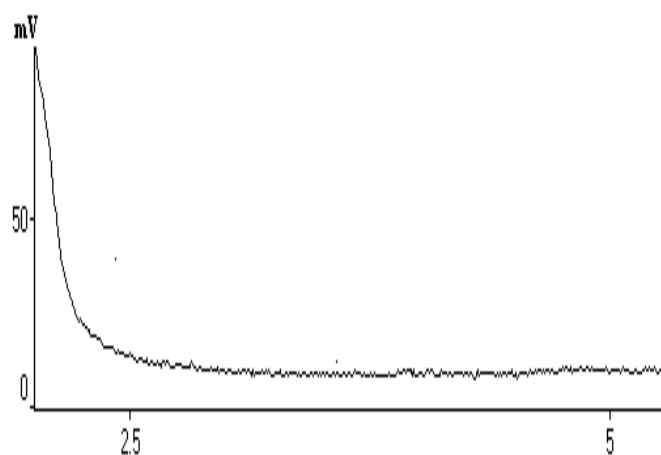


Figura 2: Cromatograma no tempo de 3 min para identificação e quantificação do R-(+)-limoneno.

No tempo de 23 min após a injeção do composto dentro da caixa obteve-se uma concentração de $5,92 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. A concentração de saturação do composto volátil ($7,56 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) ocorreu no ponto 33 min.

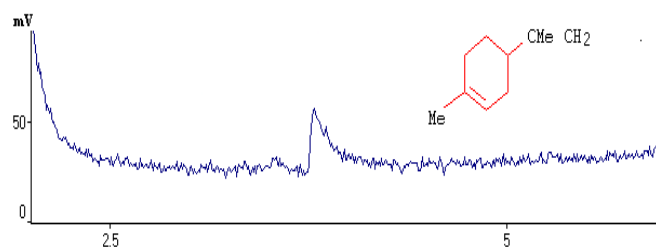


Figura 3: Cromatograma no tempo de 13 min para identificação e quantificação do R-(+)-limoneno.

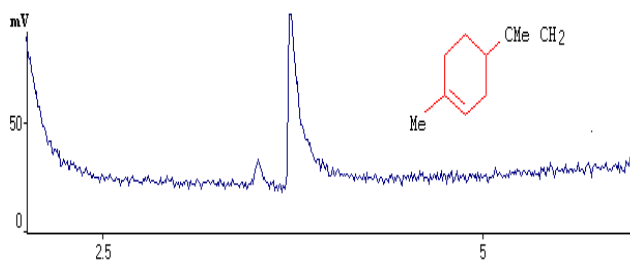


Figura 4: Cromatograma no tempo de 23 min para identificação e quantificação do R-(+)-limoneno.

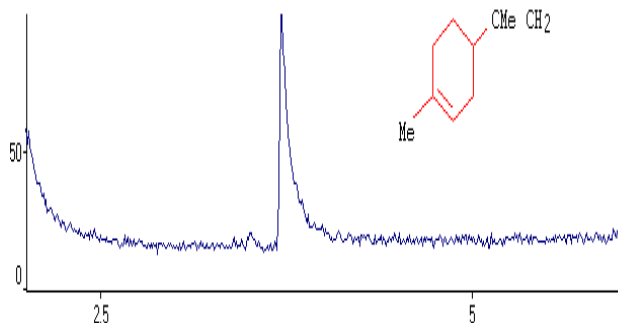


Figura 5: Cromatograma no tempo de 33 min para identificação e quantificação do R-(+)-limoneno.

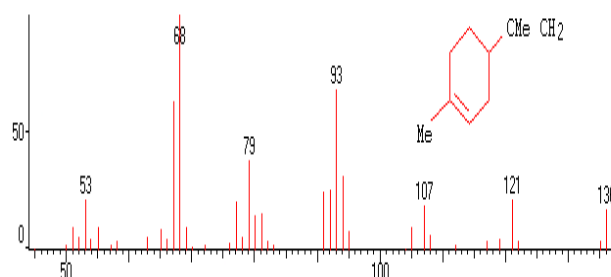


Figura 6: Espectro de massas nos tempos de 13, 23 e 33 min para identificação e quantificação do R-(+)-limoneno.

Larsen et al. (2000) mostraram que exposição de camundongos por 30 minutos ao limoneno causa uma broncoconstrição em concentrações acima de $5,56 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (LARSEN et al., 2000). A broncoconstrição aumenta a resistência ao fluxo do ar e diminui a quantidade de ar fresco que chega aos alvéolos, gerando um quadro de hipóxia (GUYTON & HALL, 2011; SILVERTHURN, 2010). A queda no suprimento de oxigênio à célula cessa a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias gerando uma queda nos níveis celulares de ATP (NELSON & COX, 2002). A ausência de energia levará a uma série de mudanças metabólicas e morfológicas na célula. Inicialmente a atividade ATPase Na^+/K^+ dependente é bloqueada e isso leva à completa perda de homeostasia iônica da célula. A ausência de ATP leva a inatividade da bomba de Ca^{2+} e o aumento na concentração de Na^+ leva a inatividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ocorrendo um aumento na quantidade de Ca^{2+} citoplasmático gerando

contração da musculatura dos brônquios (GOLAN et al., 2009).

CONCLUSÕES

Os dados encontrados a partir da quantificação do monoterpeno R-(+)-limoneno na caixa de inalação de compostos ou misturas voláteis, mostrou-se que foi possível identificar este óleo essencial a partir de 13 minutos após a injeção inicial. Em 33 minutos foi considerado o tempo de saturação do óleo essencial. Portanto, a partir desta avaliação, podem-se determinar concentrações do R-(+)-limoneno para aplicação de estudos pré-clínicos farmacológicos, garantindo a eficácia e efeito desta substância.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, R.N; NAVARRO, D.S; BARBOSA-FILHO, J.M. **Plants with central analgesic activity.** Phytomedicine. vol.8, n.4, pp. 310-322, 2001.
2. ALMEIDA, R.N; MOTTA, S.C; FATURI, C.B; *et al.* **Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats.** Pharmacol Biochem Behav. vol.77, n.2, pp.361-364, 2004.
3. AMARAL, J.F; SILVA, M.I; NETO, M.R; *et al.* 2007. **Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in**

Mice. Biol. Pharm. Bull. vol.30, n.7, pp.1217-1220, 2007.

4. CHAUDHARY, S.C; SIDDIQUI, M.S; ATHAR, M; *et al.* **D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis.** Hum. Exp. Toxicol. vol.31, n.8, pp.798-811, 2012.
5. DORMAN, F.L; WHITING, J.J; COCHRAN, J.W; *et al.* **Gas Chromatography.** Anal. Chem. vol.82, n.12, pp.4775-4785, 2010.
6. GOLAN, D. E; TASHJIAN, A. H; ARMSTRONG, E.J. *et al.* **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
7. GUYTON, A. C; Hall, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
8. KUTLU, A.K; YILMAZ, E; ÇEÇEN, D. **Effects of aroma inhalation on examination anxiety.** Teaching and Learning in Nursing. vol.3, n.4, pp.125-130, 2008.
9. LAWLESS, J. **The encyclopedia of essential oils.** London, Thorsons, pp. 226, 2002.
10. LIMA, N.P.G.B; SOUSA, D.P; PIMENTA, F.C.F; *et al.* **Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants.** Pharmacol. Biochem. and Behav. vol.103, n.3, 450-454, 2013.
11. MALHOTRA, S; SURI, S; TULI R. **Antioxidant activity of citrus**

- cultivars and chemical composition of Citrus karna essential oil.** *Planta Med.* vol.75 n.1, pp.62–64, 2009.
12. MANUELE, M.G; ARCOS, M.L.B; DAVICINO, R. *et al.* **Limonene exerts antiproliferative effects and increases nitric oxide levels on a lymphoma cell line by dual mechanism of the ERK pathway: relationship with oxidative stress.** *Cancer Invest.* vol.28, n.2, pp.135-145, 2010.
13. ROLSETH, V; DJURHUUS, R; SVARDAL, A.M. **Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells.** *Toxicology.* vol.170, pp75-88, 2002.
14. SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada.** 5ª ed. Artmed. 2010.
15. SOUSA, D.P; GONÇALVES, J.C.R; QUINTANS-JÚNIOR, L; *et al.* **Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents.** *Neurosci. Lett.* Vol.401, n.3, pp.231-235,2006.
16. SU, C.Y; MENUZ, K; CARLSON, J.R. **Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits.** Elsevier Inc. vol.139, n.1, pp.45-59, 2009.
17. VALE, T.G; FURTADO, E.C; SANTOS, J.G, *et al*; **Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown.** *Phytomedicine.* vol.9, n.8, pp.709–714, 2002.
18. VIANA, G.S.D; VALE, T.G; SILVA, C.M.M.; *et al.* **Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of Lippia alba (MILL.) N.E. Brown.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* v.23, n.11, p.1314-1317, 2000.