



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP**

*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br*

**DELINEAMENTO TOXICOLÓGICO E NEUROFARMACOLÓGICO DO EPOXIDE-LIMONENO
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PSICOFÁRMACO**

*Pauline Sousa dos Santos (Bolsista do PIBIC/CNPq), Antonia Amanda Cardoso de Almeida
(Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Rivellison Mendes
de Freitas (Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia)*

INTRODUÇÃO

Inúmeras atividades biológicas são atribuídas aos monoterpenos, constituintes ativos presentes em plantas aromáticas. O epoxide-limoneno (Figura 1) é um constituinte derivado de óleos essenciais, obtido por meio da epoxidação do (+)-limoneno que é o componente majoritário dos óleos das cascas e folhas de *Citrus limon* Burm (Campêlo et al., 2011). Esse composto foi explorado em estudos pré-clínicos visando obter dados toxicológicos e o esclarecimento de suas possíveis atividades psicofarmacológicas.

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto com esse monoterpeno foram publicados na revista *Brain Research* no ano de 2012 com o título: *Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action*. Além disso, um depósito de pedido de patente foi submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob o número do processo BR10 20120063360, intitulada “Composições à base de epoxi-limoneno para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central”. Dessa forma, o objetivo principal do projeto foi o delineamento toxicológico do epoxide-limoneno, a avaliação de sua atividade farmacológica ansiolítica e sedativa e sua caracterização como fitofármaco para o tratamento de transtornos mentais.

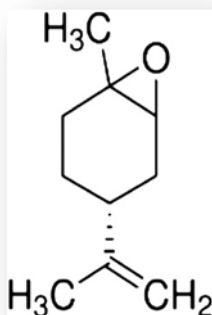


Figura 1: Estrutura química do epoxide-limoneno.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção do epóxido-limoneno, o mesmo foi preparado através da epoxidação do (+)-limoneno. Para os estudos toxicológicos foram utilizados camundongos *Swiss* adultos de 25-30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), tratados e tratados por via oral com epóxido-limoneno nas doses de 25 mg/kg (Grupo EL 25), 50 mg/kg (Grupo EL 50) e 75 mg/kg (Grupo EL 75), Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, (Grupo Tween) ou solução salina 0.9% (Grupo controle), observados durante 14 dias. Para a determinação da DL₅₀ os animais foram submetidos ao tratamento com doses crescentes (1, 2, 3 e 4 g/kg) do epóxido-limoneno por via oral. Além disso, para a avaliação dos efeitos ansiolíticos deste composto foram realizados os testes labirinto em cruz elevado, rota-rod e campo-aberto, que são modelos animais clássicos para a identificação de atividade relacionada ao sistema nervoso central (Santos et al., 2012; Han et al., 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 14 dias de tratamento com o epóxido-limoneno não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda e foi detectada uma baixa taxa de mortalidade entre os grupos tratados com as doses que variaram de 1000 a 4000 mg/kg. Por meio desses estudos foi possível calcular a DL₅₀ que corresponde a 4000 mg/kg, denotando uma baixa toxicidade. Nesses grupos também não foi detectada alteração na produção de excretas, no consumo de água e ração, bem como na massa corpórea dos animais (Tabela 1).

TABELA 1: Efeitos agudos da administração do epóxido-limoneno sobre a mortalidade e/ou sinais de toxicidade.

Dose EL (mg/kg)	D / N	Sintomas de toxicidade
25	0/10	Nenhum
50	0/10	Nenhum
75	0/10	Nenhum
1000	0/10	Nenhum
2000	2/10	Diminuição da atividade espontânea, perda de apetite, piloereção e ptose palpebral
3000	3/10	Diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia e sedação
4000	5/10	Ptose palpebral, ataxia, analgesia, hiperventilação, síncope e sedação

D = número de mortes; N = número de animais tratados.

Continuando a avaliação da toxicidade foram mensurados os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Observou-se que o tratamento agudo com doses repetidas com epóxido-limoneno em camundongos nas doses de 25 e 50 mg/kg, de forma geral, não induziu modificações no perfil bioquímico dos animais. No entanto, para os valores de uréia, ácido úrico, triglicerídeos no grupo tratado com a maior dose (75 mg/kg) houve uma diminuição

significativa em 21, 11 e 8%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle assim como o AST que foi reduzido em 9%, ($p < 0,05$), embora dentro dos valores de referência. De maneira semelhante, observou-se que o tratamento não alterou significativamente o perfil hematológico dos animais.

Tabela 2 - Efeitos do epoxide-limoneno no teste de campo aberto.

Grupos	Número de cruzamentos	Número de rearing	Número de grooming
Veículo	91.38 ± 10.41	38.12 ± 3.59	4.75 ± 0.98
DZP 2	35.20 ± 6.76 ^a	18.20 ± 5.26 ^a	1.60 ± 0.89 ^a
EL 25	17.10 ± 1.73 ^a	12.70 ± 0.69 ^a	2.20 ± 0.15 ^a
EL 50	17.90 ± 1.12 ^a	12.65 ± 0.74 ^a	2.12 ± 0.10 ^a
EL 75	22.60 ± 1.49 ^a	12.30 ± 0.40 ^a	2.00 ± 0.56 ^a
DZP 2 + FLU 25	90.79 ± 4.20	42.09 ± 2.41	4.97 ± 0.88
FLU	91.77 ± 1.71	37.18 ± 3.09	4.67 ± 0.52
EL 75 + FLU 25	91.38 ± 10.41	41.71 ± 3.65	4.57 ± 0.88

^a $p < 0.01$ comparado ao grupo controle.

Tabela 3 - Efeitos do epoxide-limoneno no teste labirinto em cruz elevado.

Grupos	NEBA	TPBA
Veículo	8.71 ± 2.63	116.71 ± 3.54
DZP 2	15.71 ± 0.75	206.86 ± 7.15
EL 25	13.45 ± 1.52 ^a	172.00 ± 25.64 ^a
EL 50	13.60 ± 1.95 ^a	173.00 ± 17.89 ^a
EL 75	16.40 ± 1.34 ^{a,b,c,d}	203.60 ± 4.16 ^{a,b,c,d}
DZP 2 + FLU 25	11.7 ± 0.82	124.09 ± 4.15
FLU 25	9.14 ± 0.43	115.62 ± 1.28
EL 75 + FLU 25	8.89 ± 0.54	117.22 ± 2.69

NEBA: número de entradas nos braços abertos, TPBA: tempo de permanência nos braços abertos. ^a $p < 0.01$ comparado ao grupo controle, ^b $p < 0.01$ comparado ao grupo DZP, ^c $p < 0.01$ comparado ao grupo EL 25, ^d $p < 0.01$ comparado ao grupo EL 50.

Tabela 4 - Efeitos do epoxide-limoneno no teste rota-rod.

Grupos	Número de quedas	Tempo de permanência
Veículo	1.16 ± 0.16	179.40 ± 0.29
DZP	2.28 ± 0.47 ^a	171.40 ± 0.84 ^a
EL 25	1.21 ± 0.12	178.90 ± 1.24
EL 50	1.27 ± 0.14	178.50 ± 1.83
EL 75	2.25 ± 0.28 ^a	172.20 ± 2.09 ^a
DZP 2 + FLU 25	1.35 ± 0.35	174.32 ± 0.67
FLU 25	1.25 ± 0.21	178.51 ± 0.65
EL 75 + FLU 25	1.22 ± 0.18	178.42 ± 0.41

^a $p < 0.01$ comparado ao grupo controle.

Os efeitos do epoxide-limoneno foram avaliados em modelos animais de ansiedade utilizando testes como labirinto em cruz elevado, campo aberto e rota Rod, que são modelos clássicos para a triagem da atividade do sistema nervoso central e fornecem dados sobre ansiedade, sedação e atividade miorelaxante (Santos et al., 2012; Han et al., 2009).

No teste de campo aberto, o epoxide-limoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, promoveu uma diminuição significativamente o número de cruzamentos, *rearing* e *grooming*

($p < 0,001$) (Tabela 2), confirmando sua atividade central, uma vez que se admite que o número de rearing é função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (Almeida et al., 2012).

No labirinto em cruz-elevado, (Tabela 3), o epoxide-limoneno aumentou o tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos, apoiando assim seus efeitos ansiolíticos, já que os camundongos quando submetidos a este teste apresentam um padrão de comportamento caracterizado por evitar os braços abertos e esta tendência é suprimida por drogas ansiolíticas (BOURIN et al., 2007).

Além disso, na dose de 75 mg/kg também inibiu significativa a coordenação motora ($p < 0,01$), no teste rota-rod (Tabela 4). Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil (25 mg/kg, ip), um antagonista dos receptores benzodiazepínicos, de forma semelhante às observadas com o diazepam usado como um padrão positivo, demonstrando assim que seus efeitos podem ser mediados pelos receptores benzodiazepínicos.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos com o epoxide-limoneno, que evidenciaram a sua baixa toxicidade denotando uma grande margem de segurança na sua utilização e seus efeitos sedativos e ansiolíticos, pode ser sugerido a sua utilização como uma nova abordagem para o tratamento de ansiedade. Por meio do pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, buscou-se a caracterização deste monoterpeno como princípio ativo para preparar novos fármacos com atividade farmacológica ansiolítica e sedativa para o tratamento de transtornos mentais.

APOIO FINANCEIRO: CNPq e FAPEPI.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+) limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567-574, 2007.

CAMPÊLO, L.M.L., LIMA, S.G., FEITOSA, C.M., FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.66, p.623-627, 2011.

HAN, H., MA, Y., EUN, J.S., LI, R.H., HONG, J.T., LEE, M.K., OH, K.W. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi* Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 92, p. 206-213, 2009.

SANTOS, F.J.B.; LIMA, S.G.; CERQUEIRA, G.S.; CITÓ, A.M.G.L.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; MARQUES, T.H.C.; FREITAS, R.M. Chemical composition and anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platyptala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 507-516, 2012.

Palavras-chave: Ansiedade. Fitofármaco. Toxicidade aguda.