



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
***CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA***  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento  
de novos psicofármacos**

**JÉSSICA PEREIRA COSTA**

Teresina – Piauí

2012

**JÉSSICA PEREIRA COSTA**

**Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2012

**JÉSSICA PEREIRA COSTA****Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – CCS/UFPI

---

**Prof. Dr. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (1ª Examinadora)**

Departamento de Química – CCN/UFPI

---

**Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez (Examinador Externo)**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – CCS/UFPI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

**PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

*"Junto ao rio, às ribanceiras, de um e de outro lado, nascerá toda sorte de árvore que dá fruto para se comer; não fenecerá a sua folha, nem faltará o seu fruto; nos seus meses, produzirá novos frutos, porque as suas águas saem do santuário; o seu fruto servirá de alimento, e a sua folha, de remédio"*

 Ezequiel (47:12)



## *Dedicatória*



*A DEUS, "mais importante que o lugar que ocupas em mim, é a intensidade de tua presença em tudo que faço"*

*Aos meus Pais por me ensinarem a viver sempre com dignidade e caráter se tornando os meus maiores exemplos de vida.*

*Ao meu estimado Orientador, que me ensinou o verdadeiro valor do esforço e da pesquisa.*

*Aos meus irmãos que contribuíram com essa conquista, e não me deixaram fraquejar nos momentos de dificuldade.*

*Aos meus amigos e familiares pelo companheirismo, compreensão e amor que nos une.*

*À todas as pessoas que me fizeram acreditar que sempre existe uma maneira de vencer: Pela Fé!*

## *Agradecimentos*

*Todas as pessoas especiais tem um motivo para estar em nossas vidas.....*

*Deus*, pai de infinita bondade e compaixão, por possibilitar mais esta vitória. “O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; tem bom entendimento todos os que cumprem os seus preceitos; o seu louvor subsiste para sempre” (Salmos 111:10).

Aos meus amados pais, *Florinda Pereira Costa e José de Jesus Costa*, por sempre estarem ao meu lado nas horas mais difíceis da minha vida e me mostrarem o caminho certo a ser seguido. Ao meu irmão *Daniel Pereira Costa*, que mesmo distante, se encontra sempre presente na minha vida. Vocês são o sentido da minha existência. "Por seus ensinamentos brilhantes, por seus conselhos nas horas certas, pelo encanto de suas almas" eu os amo.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas*, meu permanente exemplo de amor à pesquisa científica, pelo despertar na motivação, constante incentivo, amizade sincera, suas preciosas sugestões, críticas e seus perspicazes conselhos, sempre oportunos, em todos os momentos desta caminhada. É gratificante ver sua dedicação integral a Universidade Federal do Piauí, dando um verdadeiro sentido à palavra “Professor”. Agradeço a Deus, por ter lhe colocado na minha vida.

Aos professores colaboradores, que me ajudaram a consolidar diversos aspectos práticos relativos a procedimentos experimentais, sendo indispensáveis para a realização desta Dissertação. Ao *Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa*, por fornecer a substância utilizada nesta pesquisa e por seu atencioso acompanhamento em todos os momentos. Ao *Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida*, pela parceria preciosa e por fornecer seu apoio científico. À *Profª. Dra. Adriana da Rocha Tomé* pelas análises histológicas e à *Profª. Geane Félix de Souza* pelas análises hematológicas e bioquímicas e ao *Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira* pelo auxílio no que concerne à língua inglesa.

Às *Profas. Dras. Fernanda Regina de Castro Almeida e Antônia Maria das Graças Lopes Citó* por gentilmente aceitarem o convite para participar da minha banca de qualificação. Aos *Profs. Drs. Stanley Juan Chavez Gutierrez e Antônia Maria das Graças Lopes Citó* por suas inestimáveis contribuições na banca de defesa de dissertação.

Aos Professores do *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas* (PPGCF), que contribuíram para meu crescimento científico, compartilhando seus valiosos conhecimentos técnicos e profissionais. Em especial ao *Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes*, por seu auxílio em momentos essenciais.

Aos meus colegas de Mestrado, pelos momentos de alegria e aprendizado em especial a *Dayane Costa*, por sua solidariedade e disponibilidade em sempre querer ajudar, e, ainda, por fazer parte da minha vida.

Aos meus colegas do Laboratório em Pesquisa Neuroquímica Experimental (LAPNEX), *Amanda, Rusbene, Cássio, Katrícia, Paola, Paula, Pauline, Paulinha, Maria, Guilherme, Eliamara, Thiago Bellis, Iwyson, Josileide e Luana*, como é bom estar com vocês! Em especial ao *Oskar*, sempre disposto a me ajudar em todas as horas, a *Lina Clara*, minha amiga desde o primeiro dia que nos conhecemos, ao *Natan* por me ajudar nos meus experimentos, ao *Flávio*, por sempre me salvar com sua ciência computacional e a *Isabela* minha amiga-irmã por me apoiar nas horas difíceis. Não tenho gratidão suficiente que compense toda a ajuda, sem o esforço e o empenho de vocês esse trabalho não teria sido possível.

À todos os meus queridos amigos e amigas nenhuma grande vitória é possível sem os verdadeiros amigos por perto! Em especial a *Lidianne Mayra*, pela sua amizade, por me ajudar em toda essa jornada, na escolha do programa de pós-graduação, do orientador e dando-me diversos conselhos indispensáveis. Ao *Everton França*, por sua paciência invejável e sua disponibilidade, sempre preparado para me ajudar com seus fundamentais conhecimentos de química.

Ao *Leonardo Gondinho*, agradeço por tudo, pelo companheirismo, paciência, apoio incondicional em todas as horas, e por sempre acreditar no meu sucesso profissional, “Uma grande pessoa é aquela que faz nascer dentro da gente um grande sentimento”.

As pesquisas apresentadas nesta Dissertação de Mestrado foram inteiramente apoiadas por uma bolsa de estudo concedida pela CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Ao *CNPq, FAPEPI e CAPES*, tenho enorme gratidão por este prezado apoio financeiro.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b>	xi
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xiv
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1 Transtornos de ansiedade.....	20
3.2 Epilepsia.....	21
3.3 Terpenóides.....	22
3.4 Fitol.....	25
Referências.....	27
<b>4. CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol</b> .....	36
Resumo .....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Resultados.....	41
Discussão.....	46
Referências.....	50
<b>5. CAPÍTULO II: Um possível mecanismo de ação para os efeitos ansiolíticos do fitol: um composto natural</b> .....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	60
Resultados.....	65

Discussão.....	69
Referências.....	72
<b>6. CAPÍTULO III: Efeito anticonvulsivante do fitol no modelo de pilocarpina em camundongos.....</b>	<b>80</b>
Resumo .....	80
Abstract.....	81
Introdução.....	82
Material e Métodos.....	83
Resultados.....	85
Discussão .....	88
Referências .....	91
<b>7. CAPÍTULO IV: Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas com propriedades ansiolítica e antidepressiva.....</b>	<b>97</b>
Resumo .....	97
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>98</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>APÊNDICES</b>	

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

®	Marca registrada
AChE	Acetilcolinesterase
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
BZP	Benzodiazepínicos
ChAT	Colina acetiltransferase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	Colesterol total
DAE	Drogas antiepiléticas
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DL <sub>50</sub>	Dose que mata 50% da população de uma amostra
DZP	Diazepam
EME	Estado de mal epilético
E.P.M.	Erro padrão da média
FAL	Fosfatase Alcalina
FIT	Fitol
fL	Fentolitros
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
i.p.	Via intraperitoneal
IPP	Difosfato de isopentenila
LDEP	Latência para o desenvolvimento de mal epilético
LIPC	Latência da instalação da primeira convulsão
ME	Mal epilético
DOXP	Desoxixilulose fosfato

MVA	Ácido Mevalônico
NEBA	Número de entrada nos braços abertos
PEAB	Porcentagem de entradas para os braços abertos
pg	Picograma
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
SNC	Sistema Nervoso Central
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
U mL <sup>-1</sup>	Unidades por mililitro
U L <sup>-1</sup>	Unidades internacionais por litro
VCM	Volume corpuscular médio
$\chi^2$	Teste do Qui Quadrado

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Introdução

<b>Ilustração 1</b>	Estrutura química da unidade de isopreno e fitol.....	<b>23</b>
<b>Ilustração 2</b>	Rota de formação de monoterpenos e diterpenos.....	<b>24</b>
<b>Ilustração 3</b>	Estrutura química do fitol (A) e do ácido fitânico (B).....	<b>25</b>

### Capítulo I

<b>Ilustração 1</b>	Estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-em-1-ol).....	<b>39</b>
<b>Ilustração 2</b>	Avaliação do efeito do tratamento com fitol no corpo estriado de camundongos adultos.....	<b>45</b>
<b>Ilustração 3</b>	Avaliação do efeito do tratamento com fitol no hipocampo de camundongos adultos.....	<b>46</b>

### Capítulo II

<b>Ilustração 1</b>	Camundongo <i>Swiss</i> macho.....	<b>61</b>
<b>Ilustração 2</b>	Equipamento de Campo Aberto (A) e do <i>Rota rod</i> (B).....	<b>63</b>
<b>Ilustração 3</b>	Equipamento de Labirinto em cruz elevado (A) e do Claro-Escuro (B).....	<b>64</b>

### Capítulo III

<b>Ilustração 1</b>	Estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-em-1-ol).....	<b>83</b>
---------------------	---	-----------

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1</b>	Resultados da determinação da dose letal 50% (DL <sub>50</sub> ) em camundongos <i>Swiss</i> tratados com fitol por via intraperitoneal.....	<b>42</b>
<b>Tabela 2</b>	Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com fitol por via intraperitoneal.....	<b>43</b>
<b>Tabela 3</b>	Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com fitol por via intraperitoneal.....	<b>44</b>

### Capítulo II

<b>Tabela 1</b>	Efeitos do fitol em camundongos no teste de campo aberto.....	<b>66</b>
<b>Tabela 2</b>	Efeitos do fitol em camundongos no teste do <i>rota rod</i> .....	<b>67</b>
<b>Tabela 3</b>	Efeitos do fitol em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.....	<b>68</b>
<b>Tabela 4</b>	Efeitos do fitol em camundongos no teste do claro-escuro.....	<b>69</b>

### Capítulo III

<b>Tabela 1</b>	Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.....	<b>86</b>
<b>Tabela 2</b>	Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.....	<b>87</b>
<b>Tabela 3</b>	Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.....	<b>88</b>

**Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos. JÉSSICA PEREIRA COSTA.** Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

## RESUMO

O fitol é um diterpeno pertencente ao membro do grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada. É um componente da molécula da clorofila-a, e está em menor proporção nas clorofilas b, c e d. Outras possíveis fontes deste diterpeno são os fosfolipídios bacterianos, derivados do glicerol e vitamina K. Além disso, pode ser encontrado no ambiente marinho, em óleos vegetais e em produtos lácteos. Estudos anteriores relatam diversas aplicações terapêuticas do fitol. No entanto, não há pesquisas sobre as propriedades do fitol no sistema nervoso central. No primeiro capítulo, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda após a administração do fitol por via intraperitoneal, para a determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), foram usadas as doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg kg<sup>-1</sup>, bem como investigação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos e para análises histopatológicas do hipocampo e corpo estriado de camundongos *Swiss* adultos tratados com as doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> por via intraperitoneal. Os testes revelaram o valor da DL<sub>50</sub> de aproximadamente 1.153,39 mg kg<sup>-1</sup>. A administração aguda com as doses selecionadas do fitol, não induziu modificações nos parâmetros hematológicos. Por sua vez, na maioria dos parâmetros bioquímicos houve uma diminuição dos valores em todas as doses testadas. Quanto ao estudo histopatológico, apenas os animais tratados com a dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram uma discreta vacuolização no corpo estriado e um discreto comprometimento caracterizado por vacuolização no hipocampo, em apenas um dos animais. No segundo capítulo, foi investigado o possível efeito ansiolítico do fitol em camundongos adultos, bem como a avaliação do mecanismo de ação responsável por este efeito utilizando-se os testes de campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado (*plus maze*) e claro-escuro. No teste de campo aberto, o fitol diminuiu o número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* em todas as doses testadas. No teste do labirinto em cruz elevado, o fitol aumentou de forma dose dependente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e no teste do claro-escuro aumentou o tempo de permanência no campo claro, indicando um efeito ansiolítico. No teste do *rota rod*, houve uma modificação na coordenação motora dos animais apenas na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>. Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil, sugerindo que o fitol, possui atividades psicofarmacológicas incluindo atividades sedativa e ansiolítica, que podem envolver os receptores benzodiazepínicos. O terceiro capítulo avaliou os efeitos do fitol em convulsões induzidas por pilocarpina, com a determinação da latência para o desenvolvimento de convulsões, a porcentagem de convulsões e estado de mal epilético, bem como a taxa de mortalidade. Os resultados revelaram que o fitol, aumentou a latência para a primeira convulsão e diminuiu o número de animais que convulsionaram e que apresentaram estado de mal epilético, bem como reduziu a taxa de mortalidade em todas as doses testadas. Por sua vez estes efeitos não foram alterados após o pré-tratamento com atropina e flumazenil. Portanto, o fitol apresenta atividade anticonvulsivante por modulação dos sistemas colinérgicos e gabaérgicos. No entanto, mais estudos devem ser realizados para esclarecer o seu possível mecanismo de ação. O quarto capítulo refere-se ao pedido de registro de patente submetido ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia, com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica, com base no fitol, para a prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** Ansiolítico, Anticonvulsivante, Diterpeno, Fitol.

**Study of neuropharmacological and toxicological effects of phytol aimed at planning of new psychiatric drugs. JÉSSICA PEREIRA COSTA.** Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

### ABSTRACT

The diterpene phytol is a member belonging to the group of unsaturated acyclic alcohols and long chain branching. It is a component of the molecule of chlorophyll-a, and is in a lower proportion in chlorophyll b, c and d. Other possible sources are the bacterial phospholipids, derived from glycerol and vitamin K. Moreover, it is ubiquitous in the marine environment, vegetable oils and dairy products derived. Previous studies have reported various therapeutic applications of phytol. However, there is no research on the effects of phytol in the central nervous system. The first chapter, was performed to evaluate the acute toxicity following administration of phytol intraperitoneally to determine the 50% lethal dose ( $LD_{50}$ ) was used in doses 250, 500, 1000 and 2000  $mg\ kg^{-1}$ , and investigation of biochemical and hematological parameters and histopathological analysis of the hippocampus and striatum of adult Swiss mice treated with doses of 25, 50 and 75  $mg\ kg^{-1}$  intraperitoneally. The tests showed the  $LD_{50}$  value of about 1153.39  $mg\ kg^{-1}$ . Acute administration with selected doses of phytol did not induce changes in hematological parameters. In turn, most of the biochemical parameters were decreased values at all doses tested. As for the histopathological study, only animals treated with 75  $mg\ kg^{-1}$  showed a slight vacuolization in the striatum and a slight impairment characterized by vacuolization in the hippocampus and in only one animal. In the second chapter, we investigated the possible anxiolytic effect of phytol in adult mice, as well as evaluating the mechanism of action responsible for this effect using the tests of open field, rota rod, plus maze and light-dark. In an open field, the phytol decreased the number of crossings, rearing and grooming at all doses tested. In testing the elevated plus maze, the phytol increased in a dose dependent on the number of entries and time spent in open arms and the test of light/dark increased the time spent in the bright field, indicating an anxiolytic effect. In the test rod route, there was a change in motor coordination of animals pretreated with at dose of 75  $mg\ kg^{-1}$  of phytol. All these effects were reversed by pretreatment with flumazenil, suggesting that phytol, has psychopharmacological activities including anxiolytic and sedative activities, which may involve the benzodiazepine receptors. The third section evaluated the effects of phytol in pilocarpine-induced seizures, with the determination of the latency for the development of seizures, seizures percentage, status epilepticus and mortality mice. The results showed that phytol reduced the number of the animals that seized, increased the latency to first seizure and decreases the percentage of the status epilepticus and mortality rate, at all doses tested. In turn these effects were not reversed pre-treatment with atropine and flumazenil. Therefore, the phytol has anticonvulsant activity by modulation of cholinergic and GABAergic systems, but further studies should be conducted to clarify the possible mechanism involved. The fourth chapter deals with the application for patent registration submitted the Center for Innovation and Technology Transfer, in order to subsidize the development of a new pharmaceutical formulation based on phytol for the prevention and/or treatment of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Anxiolytic, Anticonvulsant, Diterpene, Phytol.



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade, nas mais diferentes sociedades. Inúmeros relatos do seu uso tornam quase mística a relação de benefícios obtidos. Registros antigos da medicina romana, egípcia, persa e hebraica mostram que as ervas eram utilizadas de forma extensiva para o tratamento, a cura e a prevenção de praticamente todas as doenças conhecidas pelo homem (CALIXTO, 2000; FRANCO; FONTANA, 2003).

O Brasil é um país que tem uma diversidade genética vegetal que representa uma das maiores do mundo. Tem mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000, e destas espécies muitas apresentam atividade biológica (RODRIGUES *et al.*, 2008). No âmbito regional, o estudo dos usos tradicionais de plantas e seus produtos no Nordeste do Brasil vêm crescendo nos últimos anos. Agra e colaboradores (2008) investigaram as plantas conhecidas pelos usos etnomedicinais no Nordeste do Brasil e apresentam um total de 650 espécies e 407 gêneros pertencentes a 111 famílias. Destes, cerca de 126 espécies referidas pelos seus usos medicinais são exóticas e cultivadas na região, correspondendo a cerca de 20% do total.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza as práticas tradicionais em atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais. Com isso, foi aprovado em 22 de julho de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo governo federal, com a finalidade de assegurar o acesso e a correta utilização das plantas medicinais e fitoterápicos, a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia (GEBHARDT, 2000; MACIEL *et al.*, 2002). Assim, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças é um área de interesse crescente de diversos grupos de pesquisa. Neste sentido, este estudo foi realizado com o intuito de desenvolver novos fármacos originados de constituintes presentes em plantas medicinais.

Neste contexto, o trabalho de dissertação intitulado de *“Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos*

*psicofármacos*”, foi organizado em capítulos originados de artigos científicos submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica. Foram realizados testes em modelos experimentais já validados e diversos equipamentos foram utilizados para os experimentos *in vivo* campo aberto, claro-escuro, labirinto em cruz elevado e *rota rod*. Além disso, houve um depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, uma vez que há uma necessidade crescente da transferência de tecnologia entre universidade e indústria com o objetivo de se construir pontes que favoreçam as ligações entre os dois setores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as propriedades psicofarmacológicas do fitol e investigar seus efeitos toxicológicos;

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Realizar análises histopatológicas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados por via intraperitoneal com fitol;
- Avaliar o possível efeito ansiolítico do fitol em modelos experimentais em camundongos adultos;
- Esclarecer o mecanismo de ação responsável pela ação ansiolítica utilizando os seguintes modelos: campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado (*plus maze*) e claro-escuro;
- Avaliar a atividade anticonvulsivante do fitol e caracterizar seu mecanismo de ação sobre convulsões induzidas por pilocarpina.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Transtornos de ansiedade

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos. Muitas vezes está associada com uma resposta a situações de perigo, ou ameaças reais, estresses e desafios do cotidiano, podendo apresentar sintomas somáticos, cognitivos, comportamentais, emocionais e perceptivos. A ansiedade passa a ser patológica quando apresenta um quadro emocional desagradável e incômodo que surge sem estímulo externo apropriado, sendo caracterizado quando a frequência, intensidade e duração destes eventos estão aumentadas e associadas ao prejuízo no desempenho pessoal, social ou profissional do indivíduo (CORDIOLI; MANFRO, 2004).

De acordo com o Estudo Nacional de Comorbidade (*National Comorbidity Study Replication* [NCS-R]), realizado nos Estados Unidos, os transtornos de ansiedade são o grupo de distúrbios psiquiátricos mais prevalentes, com a estimativa de 28,8%. O custo total anual com esse distúrbio foi estimado entre 43,3 a 46,6 bilhões de dólares, dos quais mais de 75% pode ser atribuído à morbidade, mortalidade e perda da capacidade produtiva (KESSLER et al., 2005; DE VANE et al., 2005). No âmbito nacional, uma pesquisa realizada por Almeida Filho e colaboradores (1997), constatou que a ansiedade e as fobias constituem os principais problemas de saúde mental da população brasileira, com prevalências globais variando entre 8 e 18% e com estimativas de demanda potencial de 5 a 12%.

Os medicamentos ansiolíticos são historicamente o tratamento utilizado para os transtornos de ansiedade. Os benzodiazepínicos (BZP) são os ansiolíticos de primeira linha para os transtornos de ansiedade, representa uma das classes de medicamentos mais consumidas mundialmente, e foi o tratamento de escolha por muitos anos. A sua eficácia na redução dos sintomas somáticos tem sido documentada, porém produzem pouca melhora nos sintomas psíquicos da ansiedade e têm eficácia questionável no tratamento crônico (SRAMEK; ZAROTSKY; CUTLER, 2002).

É importante ressaltar que na prática clínica, os BZP devem ser utilizados para a gestão de ansiedade aguda, não devendo exceder 2 a 4 meses, porém são constantemente prescritos para o tratamento inicial de transtornos do pânico, bem como para outros transtornos de ansiedade e insônia crônica. O uso desses medicamentos ocorre muitas vezes de forma indiscriminada, e a continuidade do uso supera a indicação clínica, levando ao uso excessivo e por um longo período (CARVALHO; DIMENSTEIN, 2004).

Desta forma, apesar das evidências que os efeitos benéficos dos BZP podem diminuir com o tempo, os efeitos adversos na maioria dos casos permanecem. Os potenciais efeitos adversos incluem declínio cognitivo, sedação indesejada, coordenação reduzida, aumento do risco de acidentes, comprometimento da memória, alterações do humor e fadiga. Além disso, o uso em longo prazo pode levar a tolerância, dependência física e psicológica e síndrome da abstinência (BENÍTEZ et al., 2008; AUTHIER et al., 2009).

### **3.2 Epilepsia**

Os episódios convulsivos se caracterizam como uma descarga anormal excessiva em um grupo de neurônios cerebrais, levando a uma alteração da atividade cerebral, caracterizado clinicamente por manifestações sensitivas, motoras, sensoriais psíquicas e neurodegenerativas. Desta forma, dividem-se em crises tônicas (contrações mantidas durante algum tempo), clônicas (contrações intermitentes, onde os músculos são contraídos e relaxados de forma alternada) ou tônico-clônicas (LÖSCHER, 1998). As convulsões são eventos clínicos que podem ser de início súbito, que acometem um grupo pequeno de neurônios (crise parcial) ou os dois hemisférios cerebrais (crise generalizada), sendo que os sintomas das mesmas dependem das áreas cerebrais envolvidas (GUERREIRO et al., 2000).

A epilepsia é a condição neurológica grave mais comum no mundo, e afeta entre 60 a 100 milhões de pessoas no mundo, com prevalência mundial de 10 a 15 em um grupo de 1.000 pessoas (SANDER, 2003). No Brasil, estima-se que mais de três milhões de pessoas têm alguma forma de epilepsia, com prevalência acumulada de 11,9 a 21 por 1.000 habitantes, acometendo principalmente crianças e jovens. Quanto ao impacto econômico a epilepsia é responsável por 0,5% dos gastos com doenças incapacitantes no mundo, alguns fatores influenciam para o aumento dos custos como o afastamento ao trabalho, a necessidade de supervisão constante e o aumento da frequência de internações (LEONARDI; USTUN, 2002; LI; SANDER, 2003; BORGES et al., 2004).

Com o avanço da farmacoterapia da epilepsia, houve a introdução de diversas novas drogas antiepilépticas (DAE). O tratamento pode incluir drogas de “primeira geração”, como a fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, valproato, e medicamentos mais novos, “segunda geração” como a lamotrigina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina e levotiracetam. No entanto, até 1/3 dos pacientes são refratários à farmacoterapia atualmente disponível. Além da farmacoresistência, várias DAE, produzem sérios problemas de toxicidade, efeitos colaterais neurotóxicos e reações idiossincráticas como erupções cutâneas (BRODIE, 2001;

LÖSCHER; SCHMIDT, 2002). Com isso, tornam-se necessárias novas pesquisas que busquem o desenvolvimento de novas DAE, com baixa toxicidade e maior eficácia.

Embora, nas últimas décadas tenham sido verificados muitos avanços para o tratamento da epilepsia, há uma necessidade crescente no desenvolvimento de novos medicamentos com maior eficácia e tolerabilidade para os pacientes que não respondam às atuais DAE. Muitos pacientes relatam crises constantes que não respondem a terapia atual e efeitos colaterais intensos não associados ao uso continuado. Mesmo quando a farmacoterapia é eficaz, as drogas antiepilépticas atuais não parecem afetar a progressão ou a história natural da epilepsia. Além disso, não há atualmente nenhuma droga disponível contra o desenvolvimento de epilepsia em algumas condições clínicas específicas como após um acidente vascular cerebral ou traumatismo craniano (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; MARGINEANU, 2011).

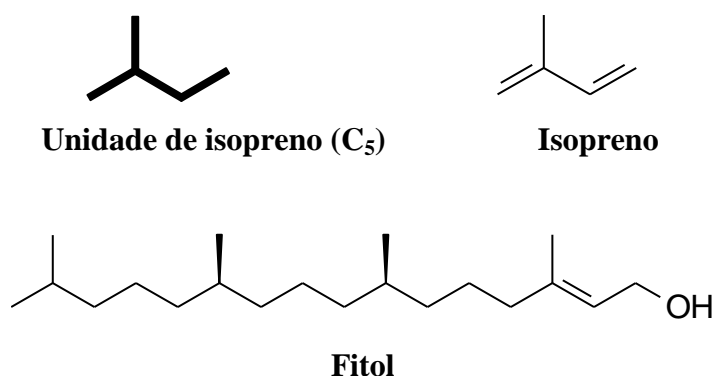
Outro aspecto importante, é que transtornos psiquiátricos são mais prevalentes em epiléticos, entre os mais comuns podemos destacar os transtornos de ansiedade. Esse fato causa impacto direto no comportamento psicossocial e pode reduzir a probabilidade de uma terapia satisfatória (JONES et al., 2007; BRANDT et al., 2010).

Como referido anteriormente às terapias medicamentosas convencionais apresentam uma série de desvantagens que podem comprometer a qualidade de vida dos portadores de transtornos de ansiedade e epilepsia. Com isso, os terpenóides constituem uma importante fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas. Confirmando a relevância desse estudo que visa contribuir para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica com propriedades ansiolítica e anticonvulsivante, com base no diterpeno fitol, buscando, assim, o planejamento de um composto mais eficaz e seguro, com os custos reduzidos à população.

### 3.3 Terpenóides

Os terpenóides representam uma das maiores e mais variadas classes de metabólitos secundários de origem natural, com mais de 55.000 membros já isolados (MAIMONE; BARAN, 2007; SILVA et al., 2009; FATURI et al., 2010). Com isso, representam a família mais extensa e estruturalmente diferente dentre os produtos naturais, derivados de unidades de isopreno ( $C_5$ ), formados da junção cabeça-cauda, como o fitol, que consiste em quatro unidades de isopreno (**Ilustração 1**).

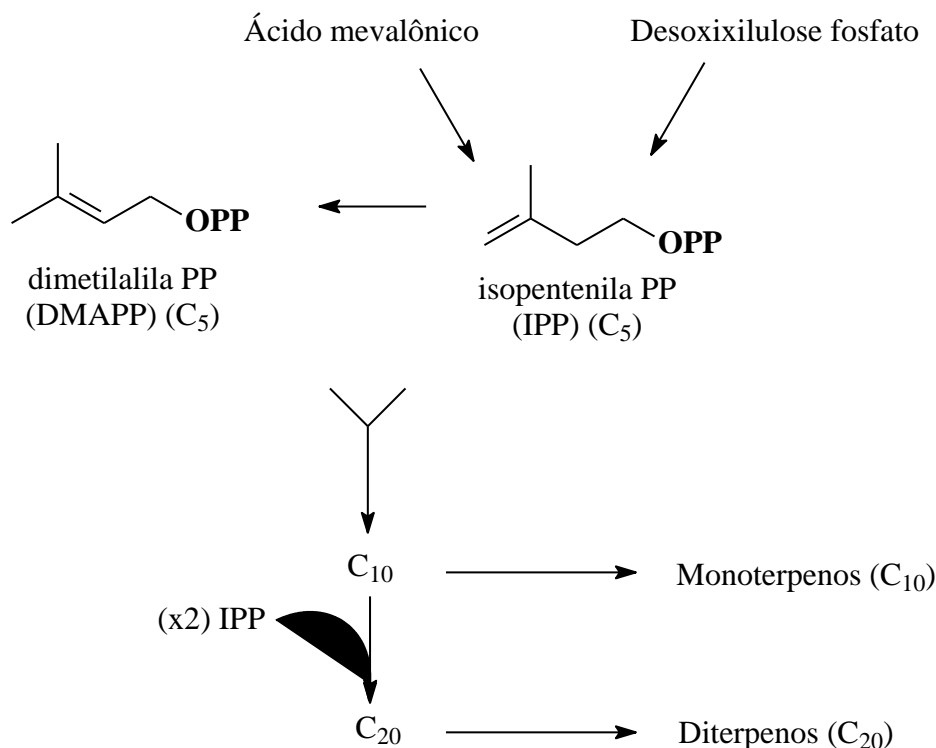
**Ilustração 1** - Estrutura química da unidade de isopreno e fitol.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os terpenos ou terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que constituem: hemiterpenóides, monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e politerpenóides (OLIVEIRA et al., 2003). Os principais terpenos são os monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), que correspondem a cerca de 90% dos óleos essenciais. Os diterpenos podem estar presentes quando os óleos essenciais são extraídos com solventes orgânicos (BAKKALI et al., 2008; DE SOUSA et al., 2011).

Os diterpenos (C<sub>20</sub>), constituídos por quatro unidades de isopreno, compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, de baixo peso molecular e insolúvel em água. Além disso, possuem uma gama de atividades biológicas (TIRAPELLI et al., 2010; SALAE et al., 2012). Suas propriedades físico-químicas são decorrentes do tipo de esqueleto e dos grupos funcionais presentes (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; SIMÕES; SPITZER, 2004). Mesmo se referindo a unidades de isopreno, estes não constituem os blocos de construção dos terpenos e sim suas unidades quimicamente ativas conhecidas como ésteres difosfato: difosfato de dimetilalila (DMAPP) e difosfato de isopentenila (IPP). As unidades de isopreno são obtidas por duas rotas: Ácido mevalônico (MVA) ou Desoxixilulose fosfato (DOXP) (**Ilustração 2**) (DEWICK, 2009).

**Ilustração 2.** Rota de formação de monoterpenos e diterpenos.

**Fonte:** Adaptado do Dewick, 2009.

Neste contexto, trabalhos têm relatado que os diterpenóides apresentam várias propriedades farmacológicas, dentre as quais podemos citar algumas delas no sistema nervoso central (SNC) como agentes antioxidantes e moduladores de muitos sistemas neurotransmissores (MACLENNAN et al., 2002), alucinógenos (SHEFFLER; ROTH, 2003), neuroprotetores (XU et al., 2011), ansiolíticos (WASOWSKI; MARDER, 2011), antidepressivos (NESTEROVA et al., 2011) e anticonvulsivantes (DALO; SOSA-SEQUEIRA; USUBILLAGA, 2007).

Estes estudos apresentam um crescente interesse dos pesquisadores sobre a atividade neurofarmacológica de diversos diterpenóides, entre estes, destaca-se o fitol, um álcool acíclico, componente da molécula da clorofila, com diversas atividades farmacológicas já relatadas na literatura. Portanto, é de extrema relevância avaliar os efeitos psicofarmacológicos do terpenóide fitol em modelos comportamentais e parâmetros neuroquímicos, visando fornecer subsídios, particularmente na área dos transtornos da ansiedade e epilepsia.



Neste contexto, terapias alternativas devem ser exploradas na busca de novos compostos ansiolíticos. Entre estas, os produtos naturais constituem uma importante fonte de pesquisa visando à descoberta de novas substâncias com atividade ansiolítica. Dentre os metabólitos secundários vegetais, os terpenóides, substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno, constituem o grupo majoritário. Diversos compostos terpênicos têm mostrado atividades ansiolíticas significativas, possibilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento da ansiedade patológica (PASSOS et al., 2009; HAN et al., 2009; GOMES et al., 2010).

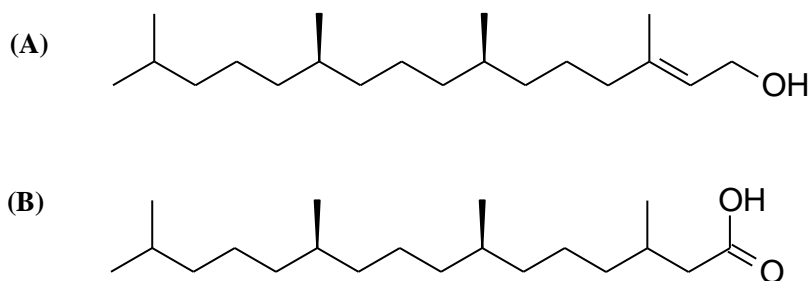
### 3.4 Fitol

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno pertencente ao grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa ( $C_{20}H_{40}O$ ) e ramificada. Este diterpeno apresenta as seguintes características físico-químicas. Encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente, com densidade de  $0.8533 \text{ g cm}^{-3}$  e ponto de ebulição de  $202 \text{ }^\circ\text{C}$ . A solubilidade aquosa do fitol foi determinada em aproximadamente de  $0.00327 \text{ mg L}^{-1}$  (McGINTY; LETIZIA; API, 2010).

O fitol é particularmente um terpenóide interessante porque é integrante da molécula da clorofila-a, bem como se encontra presente em menor proporção nas clorofilas b, c e d e bacterioclorofila a. Outras possíveis fontes incluem fosfolipídios bacterianos, derivados de glicerol e na vitamina K. Além disso, pode ser encontrado no ambiente marinho, em óleos vegetais e produtos lácteos derivados de ruminantes. O fitol está ligado no quarto anel da clorofila por meio de uma ligação éster em sua cadeia lateral e confere à clorofila uma característica apolar e lipofílica, representando o lado hidrofóbico da molécula. Na verdade, a clorofila é ancorada na membrana tilacóide dos cloroplastos por meio da cadeia de fitol (RONTANI; VOLKMAN, 2003).

A ligação éster do fitol com a clorofila pode ser clivada em algumas situações, por meio da enzima clorofilase ou durante a digestão de vegetais, por bactérias presentes no intestino. Quando liberado pode ser absorvido pelo intestino e posteriormente convertido para ácido fitânico, um ácido graxo pouco conhecido (ácido 3,7,11,15-tetrametilexadecanóico), mas com importantes efeitos fisiológicos e patológicos (**Ilustração 3**). Entretanto em humanos, a principal fonte de ácido fitânico não é proveniente do fitol ligado à clorofila, mas sim, da ingestão de carne de ruminantes, gordura animal, produtos derivados do leite ou de pescados (HANSEN, 1980; LANFER-MARQUEZ, 2003; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006).

**Ilustração 3** - Estrutura química do fitol (A) e do ácido fitânico (B).



**Fonte:** Adaptado do Lanfer-Marquez, 2003.

É importante ressaltar que o maior interesse pelo ácido fitânico surgiu com uma desordem metabólica dos lipídeos de caráter recessivo, denominada de “Síndrome de Refsum”, uma doença descrita inicialmente em 1946 por neurologista sueco, caracterizada pelo acúmulo de ácido fitânico no sangue e em diversos órgãos, como fígado, rins e outros, devido à deficiência funcional de fitanoil-Co-A hidroxilase. Essa doença apresenta quatro características fundamentais, retinite pigmentosa, polineuropatia periférica, ataxia cerebelar e aumento dos níveis protéicos no líquido cefalorraquidiano (WIERZBICKI et al., 2002; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006; GLOERICH et al., 2007).

Por outro lado, o fitol e o ácido fitânico podem desempenhar várias funções terapêuticas. Arnhold, Elmazar e Nau (2002) relataram que o fitol e ácido fitânico bloqueiam os efeitos teratogênicos de retinol, sendo úteis na prevenção da teratogenicidade induzida por ingestão excessiva de vitamina A. Goto e colaboradores (2005) evidenciaram que o fitol é capaz de induzir a expressão de genes-alvo envolvidos no tratamento das anormalidades lipídicas em várias doenças comuns, incluindo a obesidade, o diabetes e as dislipidemias.

Pesquisas recentes evidenciaram que o fitol e seus análogos apresentam atividade contra micobactérias e no tratamento da tuberculose, além disso, seus derivados podem ser utilizados para induzir resposta imunológica em humanos, sendo utilizados como adjuvantes em vacinas (SAIKIA et al., 2010; AACHOUI et al., 2011). Leite (2010) comprovou que o fitol exerce efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo em modelos experimentais de animais e atua reduzindo a liberação local de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. No entanto, não foram relatados estudos sobre os efeitos do fitol no sistema nervoso central (SNC).

Tradicionalmente esse diterpeno é utilizado na indústria como componente de cosméticos, xampus, sabonetes, detergentes, entre outros. O uso do fitol em nível mundial é

aproximadamente de 0,1 a 1,0 toneladas por ano (IFRA, 2004). Vários estudos de toxicidade foram realizados para assegurar o uso desse composto. No que se refere à toxicidade aguda, foi determinada a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), por via oral em ratos, cujo resultado foi óbitos com doses maiores que >5,0 g/kg (McGINTY; LETIZIA; API, 2010).

Complementando os estudos sobre a toxicidade do fitol, foram realizadas pesquisas de irritação dérmica em humanos, irritação dérmica e da mucosa ocular em coelhos, bem como sobre a mutagenicidade e genotoxicidade em bactérias e mamíferos e a sua toxicidade sobre o sistema reprodutivo e do desenvolvimento em camundongos. Os resultados confirmaram que o fitol não causa irritação dérmica e de mucosa tanto em humanos quanto em animais. Além disso, não pode ser considerado mutagênico e genotóxico, bem como não induziu malformações fetais em camundongos (RIFM, 1978; CHOI et al., 1993; KAGOURA et al., 1993; McGINTY; LETIZIA; API, 2010).

Estes estudos sugerem dessa forma, que o fitol pode ser usado em testes clínicos em humanos, reforçando o interesse da presente dissertação de mestrado, uma vez que procurou-se investigar a toxicidade aguda, bem como os efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes em modelos animais para que no futuro possam ser exploradas propriedades com segurança e eficácia no tratamento clínico da ansiedade e epilepsia.

## REFERÊNCIAS

AACHOUI, Y.; SCHULTE, M.L; FITCH, R.W.; SHOSH, S.K. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: Evaluation of new phytol derivatives in induction and persistence of specific immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 308-318, 2011.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, I.F.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity - Methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.

ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-*trans*-retinoic acid. **Toxicological sciences**, v. 66, p. 274-282, 2002.

AUTHIER, N.; BALAYSSACA, D.; SAUTEREAUC, M.; ZANGARELLI, A.; COURTY, P.; SOMOGYID, A.A.; VENNAT, B.; LLORCA, P.M.; ESCHALIER, A. Benzodiazepine dependence: Focus on withdrawal syndrome. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 67, p. 408-413, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BENÍTEZ, C.I.P.; SMITH, K.; VASILE, R.; RENDE, R.; EDELEN, M.O.; KELLER, M. Use of Benzodiazepines and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Middle-Aged and Older Adults With Anxiety Disorders: A Longitudinal and Prospective Study. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, p. 5-13, 2008.

BORGES, M.A.; LI, L.M.; GUERREIRO, C.A.M.; YACUBIAN, E.M.T.; CORDEIRO, J.A.; TOGNOLA, W.A.; BORGES, A.P.P.; ZANETTA, D.M.T. Urban prevalence of epilepsy: populational study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, n. 4, p. 199-204, 2004.

BRANDT, C.; SCHOENDIENST, M.; TRENTOWSKA, M.; MAY, T.W.; POHLMANN-EDEN, B.; TUSCHEN-CAFFIER, B.; SCHRECKE, M.; FUERATSCH, N.; WITTE-BOELT, K.; EBNER, A. Prevalence of anxiety disorders in patients with refractory focal epilepsy a prospective clinic based survey. **Epilepsy & Behavior**, v. 17, p. 259-263, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto no. 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRODIE, M.J. Do we need any more new antiepileptic drugs? **Epilepsy Research**, v. 45, p. 3-6, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, L.F.; DIMENSTEIN, M. O modelo de atenção à saúde e o uso de ansiolíticos entre mulheres. **Estudos de psicologia**, v. 9, n. 1, p. 121-129, 2004.

CHOI, Y.H.; AHN, S.J.; PARK, K.Y.; YOO, M.A.; LEE, W.H. Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in salmonella and drosophila mutation assaying systems. **Environmental Mutagens and Carcinogens**, v. 13, p. 92-100, 1993.

CORDIOLI, A.; MANFRO, G. Transtornos de ansiedade. In: DUNCAN, B.; SCHIMIDT, M.I.; GIUGLIANI, E.R.J. **Medicina Ambulatorial: condutas de atenção primária baseada em evidências**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 863-873, 2004.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. **American Society of Plant Physiologists**. p. 1250-1318, 2000.

DALO, N.L.; SOSA-SEQUERA, M.C.; USUBILLAGA, A. On the anticonvulsant activity of kaurenic acid. **Investigación Clínica**, v. 48, p. 349-358, 2007.

DE SOUSA, D.P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233-2252, 2011.

DE VANE, C.L.; CHIAO, E.; FRANKLIN, M, KRUEP, E.J. Anxiety Disorders in the 21st Century: Status, Challenges, Opportunities, and Comorbidity With Depression. **American Journal of Managed Care**, v. 11, p. 344-353, 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, West Sussex, England. 3ª. ed. p. 187-188, 2009.

FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 605-609, 2010.

FRANCO, I.J.; FONTANA, V.L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 8<sup>a</sup>. ed. Erexim, RS: Edelbra, 2003.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica**, v. 66, n. 2, p. 99-105, 2000.

GLOERICH, J.; VAN DEN BRINK, D.M.; RUITER, J.P.N.; VAN VLIES, N.; VAZ, F.M.; WANDERS, R.J.A. Ferdinandusse S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR $\alpha$  in its regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 77-85, 2007.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; DE DOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; DE SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 287-293, 2010.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T.; FUSHIKI, T.; KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR $\alpha$ -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 440-445, 2005.

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In: GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. **Epilepsia**. 3<sup>a</sup>.ed. São Paulo: Lemos editorial, p. 1-10, 2000.

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

HANSEN, R.P. Phytol: its metabolic products and their distribution. A review. **New Zealand Journal Science**, v. 23, p. 259-275, 1980.

IFRA (International Fragrance Association). **Use Level Survey**, August 2004.

JONES, J.E.; BELL, B.; FINE, J.; RUTECKI, P.; SEIDENBERG, M.; HERMANN, B. A controlled prospective investigation of psychiatric comorbidity in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, p. 2357–2360, 2007.

KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n. 3, p. 458-460, 1993.

KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; DEMLER, O.; MERIKANGAS, K.R. WALTERS, E.E.. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 617-627, 2005.

LANFER-MARQUEZ, U.M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 227- 246, 2003.

LEITE, A.C.R.M. **Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais**. 2010. 120f. Tese de Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, 2010.

LEONARDI, M.; USTUN, T.B. The global burden of epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 21-25, 2002.

LI, L.M.; SANDER, J.W. Projeto demonstrativo em Epilepsia no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 1, p. 153-156, 2003.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, p. 1-13, 1998.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 3-16, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACLENNAN, K.M.; DARLINGTON, C.L.; SMITH, P.F. The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B. **Progress in Neurobiology**, v. 67, p. 235-257, 2002.

MARGINEANU, D.G. Systems biology impact on antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, 2011 - *in press*

MAIMONE, T.J.; BARAN P.S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 396-407, 2007.

McGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.

NESTEROVA, Y.U.; POVETIEVA, T.N.; SUSLOV, N.I.; SEMENOV, A.A.; PUSHKARSKIY, S.V. Antidepressant Activity of Diterpene Alkaloids of *Aconitum baicalense* Turcz. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 151, p. 406-409, 2011.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. 1. ed. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003, 64p.

PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; RATES, S.M.K.; VON POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.



RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.). Acute Toxicity Studies on Phytol. **RIFM Report** Number 4455, 20 July, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA. 1978.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; MARQUES, M.M.M.; AGUIAR, L.A.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Atividade antioxidante e gastro-protetora de produtos naturais em animais experimentais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 2, p. 116-123, 2008.

RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHANOTIYA, C.S.; SHANKER, K.; NEGI, A.S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.

SANDER, J.W.A.S. The epidemiology of epilepsy revisited. **Current Opinion in Neurology**, v. 16, p. 165-170, 2003.

SALAE, A.W.; RODJUN, A.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; CHANTRAPROMMA, S.; KANJANA-OPAS, A.; TEWTRAKUL, S.; FUN, H.K. Potential anti-inflammatory diterpenes from *Premna obtusifolia*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 819-829, 2012.

SILVA, M.I.G.; SILVA, M.A.G.; AQUINO-NETO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, cap. 18, p. 467-495, 2004.

SRAMEK, J.J.; ZAROTSKY, V.; CUTLER, N.R. Generalised anxiety disorder: treatment options. **Drugs**, v. 62, p. 1635-1648, 2002.

SHEFFLER, D.J.; ROTH, B.L. Salvinorin A: the 'magic mint' hallucinogen finds a molecular target in the kappa opioid receptor. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 107-109, 2003.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; TOSTES, R.T. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, p. 690-702, 2010.

VAN DEN BRINK, D.M.; WANDERS, R.J.A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1752-1765, 2006.

XU, J.; LIU, C.; GUO, P.; GUO, Y.; JIN, D.Q.; SONG, X.; SUN, Z.; GUI, L.; MA, Y. Neuroprotective labdane diterpenes from *Fritillaria ebeiensis*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 772-776, 2011.

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 393-401, 2011.

WIERZBICKI, A.S.; LLOYD, M.D.; SCHOFIELD, C.J.; FEHER, M.D.; GIBBERD, F.B. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid  $\alpha$ -oxidation. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 727-735, 2002.

**CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas  
em camundongos tratados com fitol**

**(Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e  
Aplicada)**

**Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol**

**COSTA, JP<sup>1</sup>; LOURENÇO, NV<sup>1</sup>; SANTOS, CCMP<sup>2</sup>; TOMÉ, AR<sup>1</sup>; SOUSA, GF<sup>3</sup>;  
SOUSA, DP<sup>3</sup>; ALMEIDA, RN<sup>2</sup>; FREITAS, RM<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

**RESUMO**

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno pertencente ao grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada. É um componente da molécula da clorofila, presente em folhas verdes de várias plantas medicinais. Entretanto pouco é descrito na literatura sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo fitol. O objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade aguda do fitol após administração intraperitoneal para determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) e os efeitos sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>. Os testes para determinação do grau de toxicidade aguda, bem como a investigação da DL<sub>50</sub>, revelaram que o valor é aproximadamente 1153,39 mg kg<sup>-1</sup>. Os camundongos tratados com as doses selecionadas do fitol a partir da DL<sub>50</sub> apresentaram todos os parâmetros hematológicos dentro da faixa de referência. Por sua vez, a maioria dos valores dos parâmetros bioquímicos diminuiu em todas as doses testadas (p<0,05). Neste estudo, apenas os animais tratados com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> mostraram uma discreta vacuolização no corpo estriado e hipocampo em apenas um dos animais. Estes resultados indicam que o tratamento com fitol não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais em camundongos. O estudo toxicológico pré-clínico com fitol revelou que o produto avaliado possui discreta toxicidade aguda por via intraperitoneal, sendo estes dados uma contribuição para pesquisas com compostos obtidos de plantas medicinais com potencial farmacológico. Porém, ressalta-se a necessidade de futuras pesquisas que possibilitem comparar os resultados em outras vias, bem

como para realizar análises anatomopatológicas dos animais tratados com fitol, para assegurar o uso seguro deste diterpeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioquímica; Fitol; Hematologia; Histologia; Toxicidade aguda.

**ABSTRACT: Evaluation of acute toxicity and histopathological changes in mice treated with phytol**

The phytol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) is a diterpene belonging to the group of acyclic unsaturated alcohols and long chain branched. It is a component of chlorophyll molecule, present in green leaves of various medicinal plants. However little is described in the literature about the possible toxic effects produced by phytol. The aim of study was to evaluate the acute toxicity of phytol after intraperitoneal administration to determine the 50% lethal dose ( $LD_{50}$ ) and the effects on biochemical parameters, hematology and histopathology in the hippocampus and striatum of adult mice treated with doses of phytol 25, 50 and 75 mg  $kg^{-1}$ . The tests for determining the degree of acute toxicity and the investigation of the  $LD_{50}$  revealed that the value is approximately 1153.39 mg  $kg^{-1}$ . Mice treated with selected doses of phytol of the  $LD_{50}$  showed all hematological parameters within the reference range. In turn, most of the biochemical parameters decreased at all doses tested ( $p < 0.05$ ). In this study, only animals treated with phytol at a dose of 75 mg  $kg^{-1}$  showed a slight vacuolization in the striatum and a slight impairment characterized by vacuolation in the hippocampus in one animal. These results indicate that treatment with phytol produces no hematological, biochemical and histopathological brain of the mice. The preclinical toxicology study with phytol showed that the product evaluated has slight acute toxicity by the intraperitoneal route, and these data a contribution to research on compounds natural obtained from medicinal plants with pharmacological potential. However, it emphasizes the need for future research to gain compare the results in other ways as well as to conduct pathological analysis in animals treated with phytol, to ensure the safe use of this diterpene.

**KEYWORDS:** Acute toxicity; Biochemistry; Hematology; Histology; Phytol.

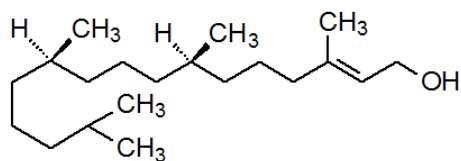
## INTRODUÇÃO

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno de fórmula molecular  $C_{20}H_{40}O$  pertence ao grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa. Sua fórmula molecular é  $C_{20}H_{40}O$  e a estrutura química encontra-se na ilustração 1. Esse diterpeno apresenta as seguintes características físico-químicas, encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente, com densidade de  $0,8533 \text{ g cm}^{-3}$  e ponto de ebulição de  $202 \text{ }^\circ\text{C}$ . A solubilidade aquosa do fitol foi determinada em aproximadamente de  $0,00327 \text{ mg L}^{-1}$  (McGINTY; LETIZIA; API, 2010).

O fitol é particularmente interessante porque é um componente da molécula da clorofila, presente em folhas verdes de várias plantas medicinais, sendo a ela complexado por uma ligação do tipo éster em sua cadeia lateral e, portanto, está presente na natureza de forma abundante. O fitol e seus produtos de degradação têm sido frequentemente usados como biomarcadores em processos químicos e biológicos. Além disso, é considerado a principal fonte de isoprenoídes com 20 átomos ou menos de carbonos (HANSEN, 1980; RONTANI; VOLKMAN, 2003).

Em sua rota de degradação, o fitol pode ser convertido a ácido fitânico, que pode ser associado com uma desordem metabólica dos lipídeos, de caráter recessivo, denominada de “Síndrome de Refsum”, em que os indivíduos são incapazes de metabolizar o ácido fitânico e o acumulam em quantidades muito elevadas desse ácido graxo no sangue e em diversos órgãos, incluindo fígado e rins. Corroborando com esses estudos foi avaliada a toxicidade aguda deste diterpeno em camundongos (VERHOEVEN; JAKOBS, 2001; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006; GLOERICH et al., 2007).

Este diterpeno é usado na indústria como componente e em produtos de higiene pessoal (IFRA, 2004). Sob o ponto de vista terapêutico, o fitol e seus análogos apresentaram, atividade contra micobactérias e no tratamento da tuberculose. Outros estudos relatam que o fitol é capaz de induzir a expressão de genes-alvo envolvidos em anormalidades lipídicas em várias doenças comuns, incluindo a obesidade, o diabetes e as dislipidemias (GOTO et al., 2005; SAIKIA et al., 2010). Porém pouco é descrito na literatura sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo fitol em ensaios pré-clínicos. Diante disto, este estudo teve como objetivo determinar a dose letal 50% ( $DL_{50}$ ), avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como realizar análises histopatológicas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados por via intraperitoneal com fitol.



**Ilustração 1.** Estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso variando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina<sup>®</sup>) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 013/2011).

### *Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>) do fitol em camundongos*

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental, foram utilizados 50 camundongos, divididos em grupos de 10 animais. Foram estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. De forma que, ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos foi possível inferir uma relação com atividade no SNC (ALMEIDA et al., 1999, ALMEIDA, 2006).

O grupo controle foi tratado com solução de Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; n=10). Após as respectivas administrações, os camundongos foram colocados em gaiolas de polipropileno (em grupos de cinco animais cada) e observados a cada trinta minutos (30; 60; 120; 180 e 240 min), durante quatro horas, após os respectivos tratamentos, seguindo-se um protocolo experimental padrão de avaliação comportamental.

Para a determinação da DL<sub>50</sub> os animais foram divididos em quatro grupos de 10 camundongos (5 machos e 5 fêmeas) e separados em gaiolas de acordo com o sexo. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu fitol por via intraperitoneal nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> (quatro doses). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração

e água *ad libitum* e observados durante as primeiras 72 horas e por um período de 14 dias para observação dos parâmetros comportamentais, segundo teste hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962).

O número de mortes de cada grupo foi expresso como o percentual do número total de animais que receberam o produto. A determinação da  $DL_{50}$  foi realizada por meio da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos produtos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas de produto.

### ***Estudo da toxicidade aguda do fitol em parâmetros bioquímicos e hematológicos***

Quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos ( $n=10/\text{grupo}$ ) foram tratados, por via intraperitoneal, com fitol nas doses de 25, 50 e 75  $\text{mg kg}^{-1}$  emulsionado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (grupos FIT 25, FIT 50 e FIT 75), respectivamente. Por sua vez, o grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%).

Após 14 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) e em seguida foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab<sup>®</sup>) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST<sup>®</sup>.

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (MALONE, 1977; AL-HABORI et al., 2002).



### ***Estudo da toxicidade aguda do fitol em cérebros de camundongos***

Os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi tratado com veículo (i.p., n=8, grupo controle). Os outros três grupos foram tratados com fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.; n=8). Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos parâmetros de toxicidade na triagem farmacológica comportamental discutida anteriormente.

Após o período de observação de 14 dias, todos os grupos foram eutanasiados por anestesia. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 µm foram feitas, coradas em hematoxilina - eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (MALONE, 1977; AL-HABORI et al., 2002). Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo ou corpo estriado conforme descrito anteriormente por Campêlo e colaboradores (2011).

### ***Análises estatísticas***

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### ***Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>)***

O fitol não alterou de forma significativa a massa corpórea dos animais. Durante o tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi

registrada nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>. Não houve alteração no consumo de água e ração dos animais.

Os resultados mostram que a administração intraperitoneal, do fitol, de forma geral, não produz efeitos tóxicos no comportamento de camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade comportamental foi observado. Após o tratamento com as doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> foi observada a presença de analgesia, bem como não foi verificado a presença de alterações na resposta ao toque e ambulação. Além disso, a atividade geral dos camundongos não foi alterada.

O ensaio para determinação do grau de toxicidade aguda, bem como a investigação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), revelou o valor de aproximadamente 1153,39 mg kg<sup>-1</sup> para camundongos tratados com fitol por via intraperitoneal e observados durante 14 dias (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Resultados da determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) em camundongos *Swiss*, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Grupos	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	Número de animais por grupo	Número de mortes por grupo
<b>Veículo</b>	00	10	00
<b>Fitol</b>	250	10	01
	500	10	02
	1000	10	06
	2000	10	10

**Legenda:** Determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) em camundongos machos e fêmeas *Swiss*, tratados por via intraperitoneal de forma aguda com veículo (Controle, n = 10) e com fitol nas doses 250, 500, 1000 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> observados durante 14 dias.

### ***Resultados das análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com fitol***

Os camundongos tratados com a dose de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p), do fitol apresentaram todos os parâmetros hematológicos dentro da faixa de referência, observando-se pequenas alterações no valor dos linfócitos, mas sem importância clínica (p<0,05; **Tabela 2**).

A tabela 3 apresenta os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos aos ensaios toxicológicos pré-clínicos, por via intraperitoneal,

houve pequenas alterações nos parâmetros analisados ( $p < 0,05$ ) sem indicativo de importância clínica. Os valores de uréia, ácido úrico, triglicérides, AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta, diminuíram em relação ao controle em todas as doses testadas ( $p < 0,05$ ; **Tabela 3**).

**Tabela 2.** Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Parâmetros	Controle (n=10)	FIT 25 (n=10)	FIT 50 (n=10)	FIT 75 (n=10)
Hemácias ( $\text{mm}^3$ )	8,60 $\pm$ 0,23	8,91 $\pm$ 0,30	8,62 $\pm$ 0,44	8,78 $\pm$ 0,39
Hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ )	14,00 $\pm$ 0,15	13,83 $\pm$ 0,47	13,91 $\pm$ 0,55	14,50 $\pm$ 0,68
Hematócrito (%)	43,33 $\pm$ 0,28	46,56 $\pm$ 1,61	47,97 $\pm$ 1,85	42,21 $\pm$ 2,27
VCM (fL)	48,78 $\pm$ 0,27	49,86 $\pm$ 0,60	49,20 $\pm$ 1,20	45,67 $\pm$ 0,41
HCM (pg)	15,56 $\pm$ 0,34	17,14 $\pm$ 0,16	16,36 $\pm$ 0,44	18,22 $\pm$ 0,13
CHCM ( $\text{g dL}^{-3}$ )	34,22 $\pm$ 0,62	34,37 $\pm$ 0,43	31,93 $\pm$ 0,41	32,76 $\pm$ 0,31
Plaquetas ( $\text{mm}^3$ )	392,4 $\pm$ 0,83	383,4 $\pm$ 52,73	386,8 $\pm$ 96,63	397,6 $\pm$ 79,04
Linfócitos (%)	78,12 $\pm$ 0,31	83,36 $\pm$ 2,02	76,63 $\pm$ 4,28	75,57 $\pm$ 3,75

**Legenda:** Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos *Swiss*, tratados de forma aguda por via intraperitoneal com veículo (Controle,  $n = 10$ ) e com fitol nas doses 25  $\text{mg kg}^{-1}$  (FIT 25,  $n = 10$ ), 50  $\text{mg kg}^{-1}$  (FIT 50,  $n = 10$ ) e 75  $\text{mg kg}^{-1}$  (FIT 75,  $n = 10$ ). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo.

**Tabela 3.** Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss*, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Parâmetros	Controle (n=10)	FIT 25 (n=10)	FIT 50 (n=10)	FIT 75 (n=10)
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	93,67 ± 1,69	92,50 ± 1,32	95,40 ± 2,53	91,40 ± 1,65
Uréia (mg dL <sup>-1</sup> )	50,89 ± 1,45	38,70 ± 3,80 <sup>a</sup>	43,60 ± 4,44 <sup>a</sup>	40,60 ± 3,43 <sup>a</sup>
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,42	0,42 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,05 <sup>a</sup>
Ácido úrico (mg dL <sup>-1</sup> )	2,61 ± 0,04	0,87 ± 1,22 <sup>a</sup>	0,87 ± 1,22 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,10 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg dL <sup>-1</sup> )	100,6 ± 3,12	60,60 ± 8,09 <sup>a</sup>	81,30 ± 8,58 <sup>a</sup>	82,80 ± 3,32 <sup>a</sup>
CT (mg dL <sup>-1</sup> )	86,07 ± 0,57	87,27 ± 11,51	83,91 ± 9,19	86,91 ± 11,73
Proteínas totais (mg dL <sup>-1</sup> )	6,64 ± 1,03	6,60 ± 0,13	6,89 ± 0,12	6,44 ± 0,16
AST (U mL <sup>-1</sup> )	49,67 ± 3,62	46,90 ± 1,86 <sup>a</sup>	46,60 ± 4,18 <sup>a</sup>	44,50 ± 5,94 <sup>a</sup>
ALT (U mL <sup>-1</sup> )	91,67 ± 1,92	83,40 ± 3,01 <sup>a</sup>	83,60 ± 2,93 <sup>a</sup>	88,50 ± 2,77 <sup>a</sup>
Fosfatase alcalina (U L <sup>-1</sup> )	157,6 ± 0,97	106,1 ± 1,30 <sup>a</sup>	113,4 ± 4,72 <sup>a</sup>	118,4 ± 4,17 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg dL <sup>-1</sup> )	0,26 ± 0,02	0,15 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>a</sup>
Bilirrubina direta (mg dL <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,005 <sup>a</sup>

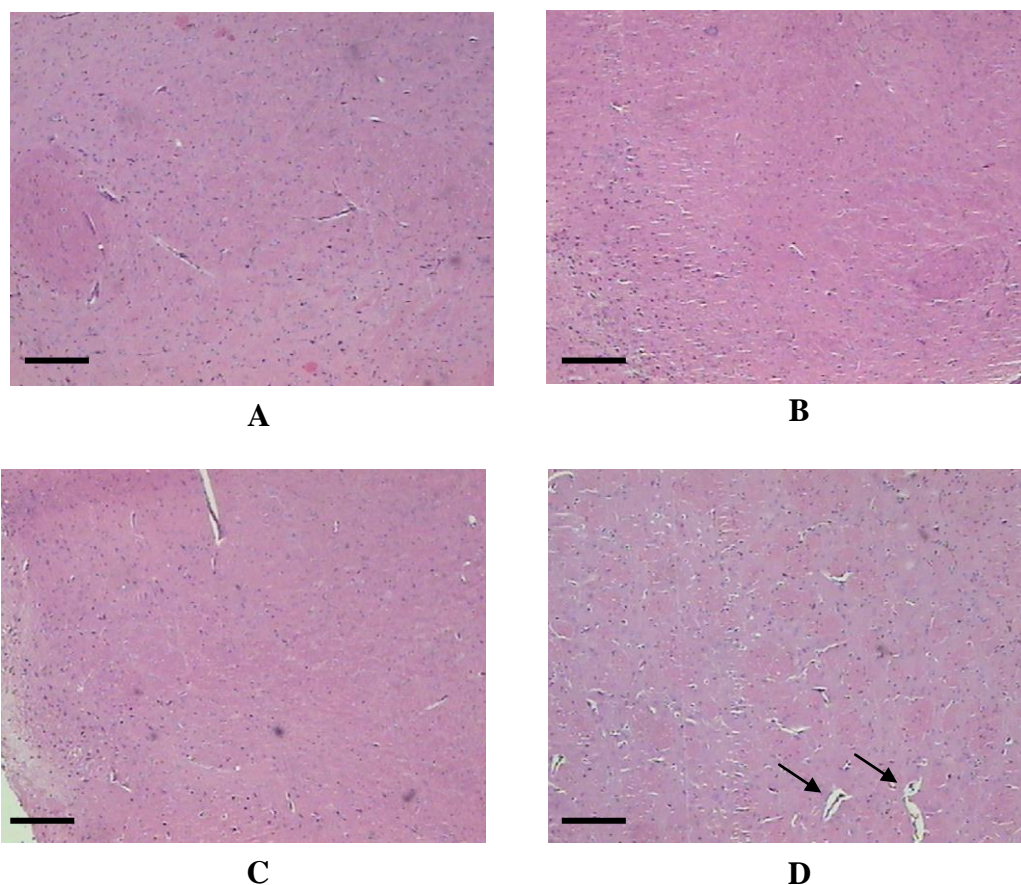
**Legenda:** Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, tratados de forma aguda por via intraperitoneal com veículo (Controle,  $n = 10$ ) e com fitol nas doses 25 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 25,  $n = 10$ ), 50 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 50,  $n = 10$ ) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 75,  $n = 10$ ). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos.  $n$  - representa o número de animais em cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

### **Resultados das análises histopatológicas em camundongos tratados com fitol**

A ilustração 2 apresenta as alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos. Neste estudo, apenas os animais tratados com fitol (75 mg kg<sup>-1</sup>) mostraram uma discreta vacuolização no corpo estriado em apenas um dos animais (12,5%). Também foi detectado um comprometimento de 12% do corpo estriado nesse mesmo grupo, quando comparado ao controle.

A ilustração 3 mostra as principais mudanças histopatológicas no hipocampo dos camundongos adultos. Por sua vez, apenas nos animais tratados com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram alteração histopatológica (12,5%) em um dos animais com um discreto

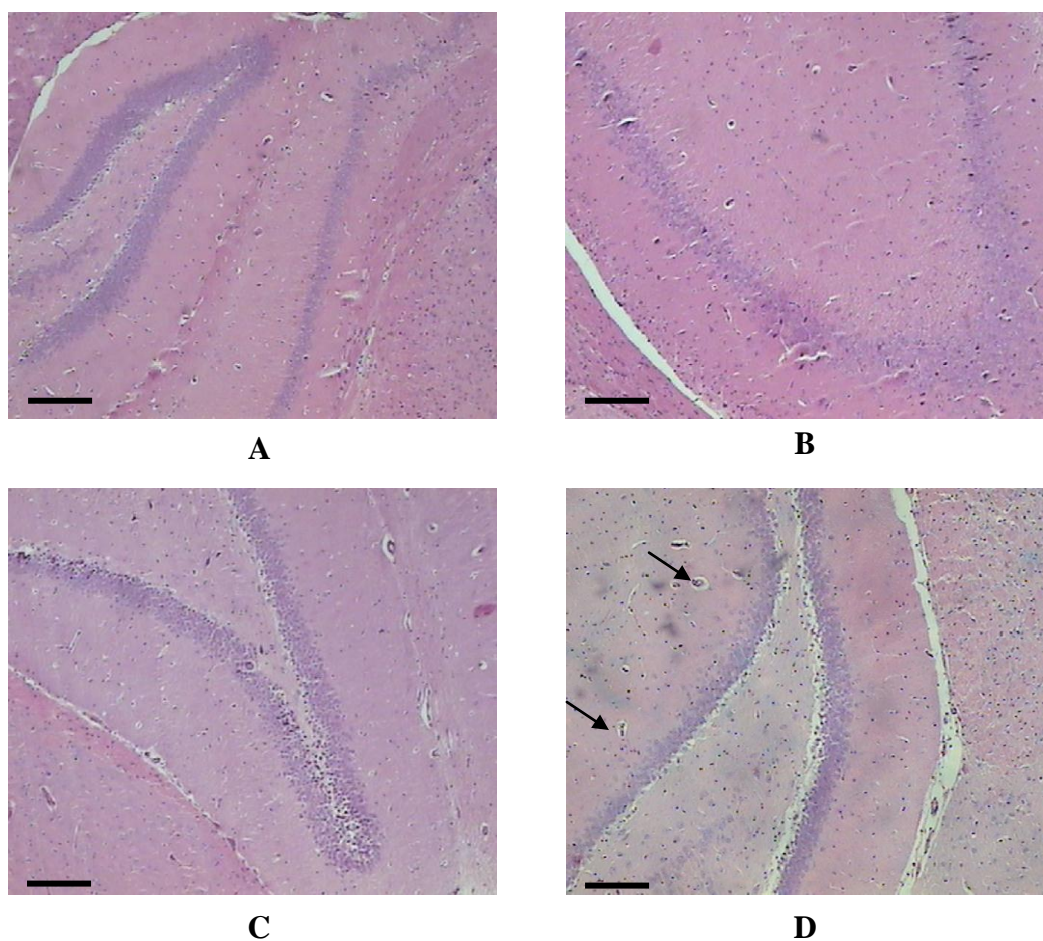
comprometimento caracterizado por vacuolização no hipocampo (16%). Por sua vez, os grupos tratados somente com veículo (grupo controle) ou fitol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 25) e 50 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 50) não revelaram nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado e hipocampo (Ilustração 2 e 3, respectivamente).



**Ilustração 2.** Avaliação do efeito do tratamento com fitol no corpo estriado de camundongos adultos.

**A** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, i.p.; n=8, Controle; Hematoxilina - Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10 µm). **B e C** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol nas doses de 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 25 e FIT 50, i.p.; n=8; HE X40; Barra de Escala = 10 µm), respectivamente. **D** - Alteração histológica mostrando discreta vacuolização (seta preta) no corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> (FIT 75, i.p.; n=8; HE X40; Barra de Escala = 10 µm).





**Ilustração 3.** Avaliação do efeito do tratamento com fitol no hipocampo de camundongos adultos.

**A** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos observados por 24 h após administração do veículo - (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, i.p.; n=8, Controle; Hematoxilina - Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10  $\mu\text{m}$ ); **B e C** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos tratados com fitol nas doses de 25 e 50  $\text{mg kg}^{-1}$  (FIT 25 e FIT 50, i.p.; n=8; HE X40; Barra de Escala = 10  $\mu\text{m}$ ), respectivamente. **D** - Alteração histopatológica mostrando um discreto comprometimento caracterizado por discreta vacuolização (seta preta) no hipocampo de camundongos tratados com fitol na dose de 75  $\text{mg kg}^{-1}$  (FIT 75, i.p.; n=8; HE X40; Barra de Escala = 10  $\mu\text{m}$ ).

## DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a administração aguda do fitol, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. O acompanhamento da massa corporal do animal é importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN; GÜNZEL, 1997).

Embora alguns parâmetros do perfil bioquímico dos animais estivessem dentro dos valores de referência (glicose, colesterol total e proteínas totais), houve uma diminuição dos valores de uréia, creatinina, ácido úrico, triglicerídeos, AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta.

A uréia, o produto final do metabolismo protéico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001), teoricamente, a creatinina é mais indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a uréia (STEVEN; SCOTT, 2002).

A redução nos níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico fornecem indicativos de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda ou, ainda, pode indicar uma diminuição do catabolismo protéico (DANTAS et al., 2006). No entanto, a elevação nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHDANANDAM, 2000; ADEBAYO et al., 2003). Neste estudo observou-se uma diminuição nos níveis séricos de creatinina, uréia e ácido úrico. Dessa forma podemos ainda sugerir que não há sobrecarga renal; no entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a toxicidade aguda com doses repetidas, e para a avaliação da toxicidade subcrônica e crônica em roedores.

Os triglicerídeos são depósitos de combustível metabólico armazenados por células especializadas chamadas adipócitos, estas células formam o tecido adiposo que está presente sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). A maior parte da estocagem de gordura no tecido adiposo e nas células musculares é na forma de triglicerídeos (CHAMPE; HARVEY, 2000). O aumento dos níveis séricos dos mesmos é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares e há urgente necessidade de baixar os níveis de triglicerídeos no plasma, diminuindo, assim, o risco de doenças cardíacas (AUSTIN; HOKANSON; EDWARDS, 1998).

Com relação aos níveis séricos dos triglicerídeos foi detectada uma diminuição significativa nos camundongos tratados com todas as três doses de fitol. Diante dos efeitos na redução sérica dos triglicerídeos pode ser sugerido o uso do fitol no tratamento das dislipidemias; no entanto, essa avaliação precisa ser investigada de forma mais detalhada inclusive em modelos animais de dislipidemia.

Na prática clínica de pequenos animais é comum a detecção de anormalidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas, as quais são consideradas indicadores sensíveis de alterações hepatobiliares. Muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, uma vez que há variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático, bem como essas mudanças podem ser induzidas por agentes exógenos químicos incluindo fármacos (SHARON; CENTER, 1995).

As análises das enzimas transaminases (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN; MAYES; RODWELL, 1981). As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e a ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. AST e ALT são considerados sensíveis indicadores de dano hepatocelular e dentro dos limites pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999; AL-HABORI et al., 2002). O presente estudo sugere que o uso do fitol de forma aguda pode não ser hepatotóxico, uma vez que foi observada uma diminuição significativa da AST e ALT, sugerindo que o composto pode induzir um efeito hepatoprotetor que precisa ser melhor investigado.

A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar que pode ser induzida por medicamentos. Portanto, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamento farmacológico e em algumas condições patológicas. O aumento da atividade sérica de FAL pode ocorrer em condições de colestase, intra e extrahepática, por indução com drogas ou hormônios, pela hiperatividade osteoblástica e em processos necróticos (WRIGHT; PLUMMER, 1974; MILLER; GONÇALVES, 1999). Como foi observado no presente estudo ocorreu uma diminuição significativa na fosfatase alcalina em todas as doses testadas, indicando que o fitol pode ser usado de forma segura já que não induziu nenhuma alteração bioquímica indicativa de hepatopatias no soro dos camundongos.

A bilirrubina é um pigmento tetrapirrólico. Cerca de 70 a 80% é derivada da degradação da hemoglobina (Hb) de hemácias senescentes ( $\leq 300$  mg/dia); 20 a 30% são derivadas das células eritróides da medula prematuramente e de hematoproteínas de outros locais do



organismo (principalmente fígado). A degradação das hemácias nas células reticuloendoteliais (RE) dá origem à bilirrubina, que se liga a albumina para o transporte ao fígado, sendo então conjugada com ácido glicurônico e transportada aos canalículos biliares e, em seguida, ao duodeno. No intestino, a bilirrubina é hidrolisada a bilirrubina não conjugada e reduzida a urobilinogênios por bactérias; 80 a 90% são excretadas nas fezes inalteradas ou oxidadas (urobilinas); 10 a 20% são reabsorvidas, retornam ao fígado e são reexcretadas. Menos de 3 mg/dL são filtradas por meio dos glomérulos para a urina como urobilinogênio. Bilirrubina conjugada (direta) é aumentada em doenças hereditárias e durante o dano celular hepático. Bilirrubina não conjugada (indireta) pode estar aumentada em doenças hemolíticas, doenças hereditárias e durante o tratamento com medicamentos (WALLACH, 2009). Neste estudo observou-se uma diminuição da bilirrubina total e direta em todas as doses testadas.

Quanto ao estudo hematológico, todos os parâmetros hematológicos estão dentro da faixa de referência, observando-se um pequeno aumento no valor dos linfócitos. A contagem diferencial para neutrófilos, linfócitos e monócitos revelou, embora, dentro dos limites de referência (HARKNESS; WAGNER, 1993), discretas alterações, porém sem indicativo de importância clínica, sugerindo o seu uso de forma segura em humanos no tratamento de doenças.

Estudos anteriores mostraram que a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas envolve várias alterações em nível neuroquímico e histológico em regiões cerebrais que precisam ser investigadas fazendo uso de compostos naturais com possível efeito neuroprotetor (BARROS et al., 2007; XAVIER et al., 2007; FREITAS et al., 2011).

Dessa forma, decidiu-se investigar os efeitos do fitol em cérebros de camundongos, para avaliar a sua neurotoxicidade contra neurônios hipocampais e estriatais, uma vez que a literatura relata várias propriedades farmacológicas para esse diterpeno em estudo (KITAREEWAN et al., 1996; CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2000; HUBERLE et al., 2009).

Nos estudos histopatológicos foi observado um pequeno número de animais com lesão cerebral e um comprometimento de forma não significativa das áreas investigadas apenas no grupo tratado com fitol na maior dose. Além disso, foi possível detectar que no corpo estriado e hipocampo de animais tratados com as doses de 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup> de fitol não houve nenhuma alteração histopatológica, bem como não foi detectado nenhum grau de comprometimento das áreas analisadas desses animais.

A morte neuronal observada no hipocampo e corpo estriado dos animais durante o estabelecimento de desordens neurodegenerativas pode ser atribuída a excitotoxicidade

produzida pelo sistema glutamatérgico (TOMÉ et al., 2010). Entretanto, os estudos histopatológicos de animais tratados com fitol, não apresentaram a produção dano neuronal no corpo estriado e hipocampo de forma significativa, sugerindo que esse diterpeno não produz neurotoxicidade. A literatura sugere que o estresse oxidativo pode estar envolvido na instalação de várias doenças do sistema nervoso central (SNC), provavelmente pelo aumento da produção de radicais livres e há uma diminuição da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas (SHULTS e HAAS, 2005; FREITAS et al., 2005; CHATUVERDI; BEAL, 2008).

Esses resultados indicam que o tratamento com fitol não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais em camundongos adultos. O tratamento agudo com fitol mostrou ausência de toxicidade em parâmetros hepáticos, renais e neuronais, bem como reduziu os níveis de triglicerídeos que precisam ser melhor investigados em modelos animais de hipercolesterolemia. Devido à ausência de toxicidade aguda proeminente verificada em nesses experimentos durante 14 dias de observação, novos estudos comportamentais e neuroquímicos com esse diterpeno precisam ser realizados, para esclarecer seu mecanismo de ação e justificar o uso do fitol de forma segura e eficaz, como um potencial agente terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

## REFERÊNCIAS

ADEBAYO, J.O.; YAKUBU, M.T.; EGWIM, E.C.; OWOYELE, V.B.; ENAIBE, B.U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 69-72, 2003.

AL-HABORI , M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 384p.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO CC. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no

Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AUSTIN, M.A.; HOKANSON, J.E.; EDWARDS, K.L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. **American Journal of Cardiology**, v. 81, p. 7-12, 1998.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletim Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 9, n. 6, p. 440-445, 2011.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. **Bioquímica ilustrada**. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, 446p.

CHATUVERDI, R.K.; BEAL, M.F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 395-412, 2008.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflammation Research**, v. 46, n. 10, p. 497-505, 2000.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI, A.; CIOMAR, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**. v. 28, p. 165-170, 2006.

FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

FREITAS, R.M.; DEJIANG FENG, D.; JORDAN, J. Neuropharmacological effects of lipoic acid and ubiquinone on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 211-216, 2011.

GLOERICH, J.; VAN DEN BRINK, D.M.; RUITER, J.P.N.; VAN VLIES, N.; VAZ, F.M.; WANDERS, R.J.A. Ferdinandusse S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR $\alpha$  in its regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 77-85, 2007.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T.; FUSHIKI, T.; KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR $\alpha$ -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 440-445, 2005.

HANSEN, R.P. Phytol: its metabolic products and their distribution. A review. **New Zealand Journal Science**, v. 23, p. 259-275, 1980.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993, 238p.

HUBERLE, A.; BEYEEN, A.D.; OCKINGER, J.; AYTURAN, M.; JAGODIC, M.; DE GRAAF, K.L.; FISSOLO, N.; MARTA, M.; OLOFSSON, P.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R.; OLSSON, T.; WEISSERT, R. Advanced Intercross Line Mapping Suggests That Ncf1 (Ean6) Regulates Severity in an Animal Model of Guillain-Barre´ Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 4432-4438, 2009.

IFRA (International Fragrance Association). **Use Level Survey**, August 2004.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 171-178, 1997.

KITAREEWAN, S.; BURKA, L.T.; TOMER, K.B.; PARKER, C.E.; DETERDING, L.J.; STEVENS, R.D.; FORMAN, B.M.; MAIS, D.E.; HEYMAN, R.A.,; MCMORRIS, T.; WEIBERGER, C. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, p. 1153-1166, 1996.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 4<sup>a</sup>. ed. New York: Freeman and Company, 2005, 119p.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOLF, P. **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. Berlin: Springer Verlag, 1977, 23p.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

MARTIN, D.W.; MAYES, P.A.; RODWELL, Y.W. In: **HARPER'S Review of Biochemistry**. Califórnia: Lange Medical, 1981, 688p.

McGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8.ed. São Paulo: Editora Arheneu, 1999, 607p.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1986.

RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHANOTIYA, C.S.; SHANKER, K.; NEGI, A.S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M.M.; EMANUELLI, M.P.; SCHOSSLER, J.P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de *flunixin meglumine* e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, p. 46-51, 2001.

SHARON, A.; CENTER, D.M.V. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**. p. 1166-1183, 1995.

SHULTS, C.W.; HAAS, R. Clinical trials of coenzyme Q<sub>10</sub> in neurological disorders. **Biofactors**, v. 25, p. 117-126, 2005.

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary system. In: **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.

TOMÉ, A.R.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or alfa-tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, p. 355-361, 2010.

VAN DEN BRINK, D.M.; WANDERS, R.J.A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1752-1765, 2006.

VERHOEVEN, N.M.; JAKOBS, C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. **Prog. Lipid Research**, v. 40, p. 453-466, 2001.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 9-15, 2000.

WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980.

WALLACH, J.B. **Interpretação de Exames laboratoriais**. 8<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 1465p.

WRIGHT, P.J.; PLUMMER, D.T. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 65-73, 1974.

XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

**CAPÍTULO II: Um possível mecanismo para os efeitos ansiolíticos do fitol: um composto natural**

**(Artigo submetido à Revista Pharmacology Biochemistry and Behavior)**



## Um possível mecanismo para os efeitos ansiolíticos do fitol: um composto natural

COSTA, JP<sup>1</sup>; ALMEIDA, AAC<sup>1</sup>; SOUSA, DP<sup>2</sup>; FENG, D<sup>3</sup>; FREITAS, RM<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular, Celular e do Desenvolvimento, Universidade do Colorado em Boulder, Colorado.

### RESUMO

Compostos isolados de óleos essenciais das diferentes partes de espécies de plantas medicinais estão se tornando opções relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Em particular, o fitol apresenta um perfil amplo de aplicações terapêuticas. Este trabalho foi sobre a caracterização comportamental e farmacológica do fitol, um diterpeno, membro do grupo dos alcoóis de cadeia ramificada e insaturada. No teste de campo aberto, o fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, após a administração intraperitoneal, diminuiu significativamente o número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*. Quando administrado por via intraperitoneal, o fitol aumentou de forma dose dependente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado e aumentou o tempo de permanência no campo claro no teste do claro-escuro, indicando um efeito ansiolítico semelhante. No teste do *rota-rod*, o fitol modificou a coordenação motora dos animais, quando relacionado ao controle. Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), de forma semelhante ao observado com diazepam utilizado como controle positivo. Esses resultados sugerem que o fitol, possui atividade psicofarmacológica incluindo atividades sedativa e ansiolítica e esses efeitos podem ser mediados por transmissão GABAérgica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ansiedade; Campo aberto; Fitol; Labirinto em cruz elevado; *Rota rod*.

**ABSTRACT: A possible mechanism for anxiolytic effects of phytol: a natural compound**

Compounds isolated of essential oils from different members of the medicinal plant species are becoming relevant options for the treatment of neurodegenerative diseases. In particular, phytol presents a wide profile of putative therapeutical applications. Here, we report on the behavioral and pharmacological characterization of phytol, a diterpene, member of the fragrance structural group alcohols branched chain unsaturated. In the open-field test, phytol at the doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, after intraperitoneal administration, significantly decreased the number of crossings, grooming, and rearing. When given intraperitoneal, phytol dose-dependently increased the number of entries and the time spent in the open arms of an elevated plus maze and augmented the time spent light space during a light-dark test, indicating an anxiolytic-like effect. In the rota rod test, phytol changed motor coordination, as related to control. All these effects were reversed by the pre-treatment with flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), similarly to those observed with diazepam used as a positive standard. Those results suggest that phytol, has psychopharmacological activities including sedative and anxiolytic activities, and these effects may be mediated by GABAergic transmission.

**KEYWORDS:** Anxiety; Elevated plus maze; Open-field; Phytol; Rota rod.

## INTRODUÇÃO

Transtornos de ansiedade são considerados os mais comuns distúrbios psiquiátricos, afetando entre 10 a 30% da população em geral, podendo ocasionar prejuízos no relacionamento familiar, social e escolar (WITTCHEN; HOYER, 2001; SILVA; LEITE, 2002).

A ansiedade consiste em um estado de tensão como reações normais até o momento em que começam a provocar sofrimento no indivíduo (LENT, 2004). Há vários tipos de ansiedade e nos últimos 45 anos, o tratamento farmacológico de primeira linha dos transtornos de ansiedade são os benzodiazepínicos. No entanto, apesar da eficácia clínica, a maioria dos fármacos desta classe apresenta muitos problemas, como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada, riscos de acidentes, vertigem, disartria e ataxia com quedas (REX; MORGENSTERN; FINK, 2002; MITTE et al., 2005). Além disso, com o uso crônico pode levar a dependência física e síndrome da abstinência (RABBANI et al., 2008).

Diante dessas informações diversos pesquisadores procuram por novas formas de tratamento farmacológico para a ansiedade que possam substituir as convencionais. Além disso, a busca por novos compostos mais seguros e eficazes, com menores possibilidades de reações adversas é extremamente necessária já que um grande número de usuários se tornam dependentes químicos e físicos. De acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (BRASIL, 2009), no Brasil, como na maioria dos países, os medicamentos se apresentam como o principal agente tóxico, respondendo por, aproximadamente, 27% dos casos de intoxicação humana registrados anualmente, sendo os benzodiazepínicos, uma das classes de medicamentos que mais intoxicam em nosso país. Dessa forma, vários grupos de pesquisa têm explorado cientificamente várias espécies de plantas medicinais tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico na busca por novos compostos ansiolíticos (SAKELLARIDIS et al., 2008; COSTA et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Dentre as plantas medicinais, destacam-se as diversas espécies de plantas aromáticas que têm sido utilizadas medicinalmente por causa de seus óleos essenciais. Pesquisas recentes revelam que a grande maioria das atividades biológicas pode ser atribuída aos monoterpenos, que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais (DO AMARAL et al., 2007; SOUTO-MAIOR et al., 2011). Na literatura há diversos estudos que relatam as ações de terpenóides sobre o sistema nervoso central (SNC) (ALMEIDA et al., 2008; DE SOUSA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010). No entanto, o diterpeno fitol ainda não foi submetido à avaliação neurofarmacológica. Sendo relevante a realização desse estudo, uma vez que o fitol

tem mostrado efeitos sedativos, e pode estar envolvido na ativação de vias neuronais relacionadas com distúrbios psiquiátricos, como ansiedade.

O índice de prevalência dessas doenças está aumentando em todo o mundo, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde estimou que o índice de prevalência destas doenças é aproximadamente de 0,1 a 16,9% (DEMYTTENAERE et al., 2004). Estes dados dão apoio às pesquisas para o isolamento e identificação de novos produtos naturais, em busca de alternativas mais seguras e eficazes (MARQUES et al., 2012).

Estudos atuais sobre óleos essenciais e seus principais componentes têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, com o objetivo de estudar seus aspectos químicos e farmacológicos a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos psicofármacos mais seguros e eficazes que as drogas atualmente disponíveis (DE SOUSA, 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito ansiolítico do fitol em modelos experimentais em camundongos adultos, bem como esclarecer o mecanismo de ação responsável pela ação ansiolítica utilizando os seguintes modelos: campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado (*plus maze*) e claro-escuro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizados, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (**Ilustração 1**). Os animais receberam água e ração tipo *pellets* (Purina®) com livre acesso e foram mantidos com iluminação controlada (12h de ciclo claro/escuro) e temperatura ( $26 \pm 1$  °C). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 8h00-12h00 am. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 013/2011).

**Ilustração 1** – Camundongo *Swiss* macho.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

### ***Tratamento com drogas***

Fitol foi emulsificado com Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal, 30 minutos antes dos experimentos. O grupo controle recebeu veículo (Tween 80 0,05% com salina 0,9%) em um volume constante de 10 ml kg<sup>-1</sup>, administrado pela mesma via dos grupos tratados. Diazepam (DZP) 2 mg kg<sup>-1</sup> (União Química/Brasil) e flumazenil (FLU) 25 mg kg<sup>-1</sup> (União Química/Brasil), utilizados como padrões, foram administrados via intraperitoneal após a dissolução em água destilada.

### ***Protocolo experimental***

Os animais foram testados durante o período de luz e observados em uma sala fechada com temperatura constante (26 ± 1 °C). Todos os testes foram realizados em dias diferentes, com grupos distintos de animais.

### ***Teste do Campo aberto***

O campo aberto é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em nove quadrantes iguais (**Ilustração 2 - A**). Esse aparato foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, baseado no modelo descrito por Archer (1973). Os camundongos foram divididos em cinco grupos de 7 a 10 animais cada. Os diferentes grupos foram tratados com: veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%, i.p.), fitol (25, 50

e 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos dos tratamentos, os seguintes parâmetros foram observados: número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, sendo avaliados durante o tempo de 5 minutos. Após cada sessão de teste individual, o campo foi limpo com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

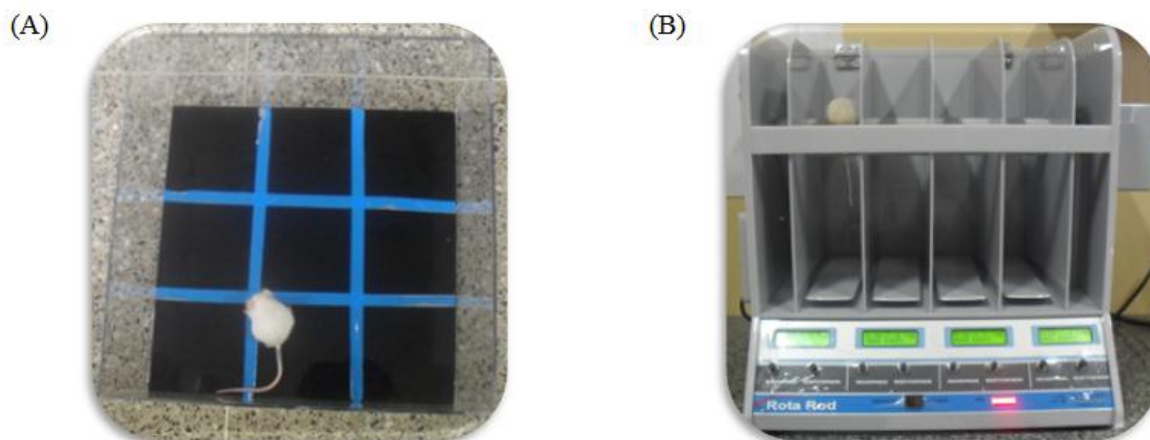
Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> no efeito do fitol na atividade locomotora. Para este fim, três grupos de sete camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), um antagonista competitivo reconhecido do receptor central dos benzodiazepínicos, e após 15 minutos foram tratados com o veículo, FIT (75 mg kg<sup>-1</sup>), ou diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos de atividade motora dos animais do tratamento foi verificada por um campo aberto semelhante ao protocolo realizado anteriormente.

### ***Teste do Rota Rod***

O equipamento do *rota rod* foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por drogas em animais (**Ilustração 2 - B**) (CARLINI; BURGOS, 1979). Camundongos, 7 a 10 por grupo, foram divididos e tratados com: veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%, i.p.), fitol (25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Trinta minutos após a administração, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de três minutos. Foram registrados, o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> no efeito do fitol no relaxamento muscular. Para este fim, três grupos de sete camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), um antagonista competitivo reconhecido do receptor central dos benzodiazepínicos, e após 15 minutos foram tratados com o veículo, FIT (75 mg kg<sup>-1</sup>), ou diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos de tratamento os mesmos parâmetros descritos acima foram analisados.

**Ilustração 2** – Equipamento de Campo Aberto (A) e do *Rota-Rod* (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal.

### ***Teste do Labirinto em Cruz Elevado***

O objetivo deste teste é verificar o possível efeito ansiolítico ou ansiogênico de substâncias, uma vez que drogas ansiolíticas levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas induzem ao aumento dos mesmos parâmetros nos braços fechados. Experimento largamente utilizado em modelo animal de ansiedade (LISTER, 1987).

O teste de labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987) consistiu de dois braços abertos perpendicular (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) também na posição perpendicular (**Ilustração 3 - A**). Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Para este teste foram utilizados cinco grupos de 7 a 10 animais cada. O primeiro grupo foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%, i.p.), o segundo grupo com diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e os outros grupos foram tratados com fitol em doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.). Trinta minutos após os tratamentos, o animal foi colocado no centro do labirinto com o nariz em direção a um dos braços fechados, e observados por 5 min. Os parâmetros observados foram: porcentagens de entradas para os braços abertos (PEBA), número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> no efeito ansiolítico do fitol. Para este fim,

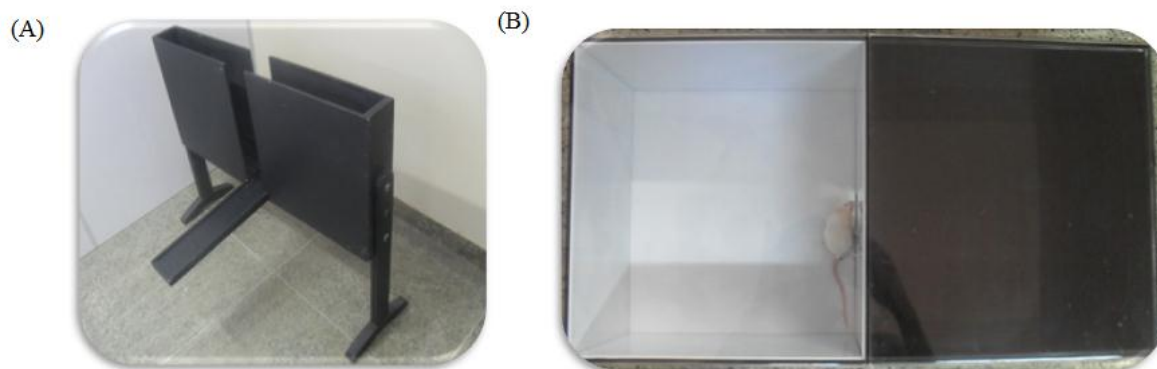
três grupos de sete camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), um antagonista competitivo reconhecido do receptor central dos benzodiazepínicos, e após 15 minutos foram tratados com o veículo, FIT (75 mg kg<sup>-1</sup>), ou diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos de tratamento os mesmos parâmetros descritos acima foram analisados.

### ***Teste do Claro-Escuro***

Complementando a avaliação do efeito ansiolítico, foi realizado o teste claro-escuro (**Ilustração 3 - B**). Foram utilizados cinco grupos com camundongos 7 a 10 por grupo. Os grupos foram tratados com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%, i.p.), fitol (25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no equipamento abaixo descrito. O aparato utilizado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (*box* claro e *box* escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1981). O *box* escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O *box* claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente. Os animais foram observados por 5 minutos e depois de cada ensaio, o equipamento foi limpo com solução de etanol 70%. O parâmetro utilizado foi o tempo de permanência no *box* claro expresso em segundos.

Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> no efeito ansiolítico do fitol. Para este fim, três grupos de sete camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), um antagonista competitivo reconhecido do receptor central dos benzodiazepínicos, e após 15 minutos foram tratados com o veículo, FIT (75 mg kg<sup>-1</sup>), ou diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 minutos de tratamento os mesmos parâmetros descritos acima foram analisados.

**Ilustração 3** – Equipamento de Labirinto em cruz elevado (A) e do Claro-Escuro (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal.



### *Análise Estatística*

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0) e os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### *Teste do campo aberto*

O fitol, nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., apresentou efeitos sedativos em camundongos avaliados pelo teste do campo aberto (**Tabela 1**). Foram detectados efeitos significativos em todas as doses testadas de fitol e produziram porcentagens semelhantes de diminuição (71, 70 e 69,5%, respectivamente) no número de cruzamentos ( $p < 0,01$ ), quando comparados aos controles. O número de *rearings* e *groomings* ( $p < 0,01$ ) foram diminuídos após tratamento com as doses de FIT 25, FIT 50 e FIT 75 mg kg<sup>-1</sup>, resultados semelhantes aos observados com diazepam (controle positivo). Flumazenil foi usado para avaliar o possível mecanismo de ação do efeito sedativo do fitol. Para isso, 15 min após a injeção de flumazenil, foi administrado fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>, o comportamento dos animais foi semelhante aos observados no controle, sugerindo que o mecanismo de ação do fitol pode envolver os receptores benzodiazepínicos.

**Tabela 1:** Efeitos do fitol em camundongos no teste de campo aberto.

Grupos	Número de Cruzamentos	Número de Rearing	Número de Grooming
Veículo	99,13 ± 12,96	45,17 ± 3,85	4,67 ± 0,44
DZP 2	38,13 ± 2,36 <sup>a</sup>	13,13 ± 0,93 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,41 <sup>a</sup>
FIT 25	28,89 ± 1,65 <sup>a</sup>	13,40 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,42 <sup>a</sup>
FIT 50	29,78 ± 1,81 <sup>a</sup>	13,35 ± 1,92 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,16 <sup>a</sup>
FIT 75	30,25 ± 1,88 <sup>a</sup>	12,93 ± 1,69 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,26 <sup>a</sup>
FLU 25 + DZP 2	100,9 ± 4,20	52,09 ± 2,41	5,27 ± 0,88
FLU 25	100,7 ± 1,71	51,18 ± 3,09	6,27 ± 0,52
FLU 25 + FIT 75	89,20 ± 2,75	41,40 ± 3,11	4,80 ± 0,37

**Legenda:** Os valores representam a média ± E.P.M. do número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* dos camundongos usados nos experimentos (n=7 por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,01, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste). FIT = fitol; DZP = diazepam.

### **Teste do Rota Rod**

O teste do *rota rod* é utilizado para avaliar a coordenação motora ou presença de relaxamento muscular no animal. Não houve nenhuma diferença significativa após a administração de fitol (25 e 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), em comparação com o controle (**Tabela 2**). O diazepam e fitol (75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), diminuíram significativamente o tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória e aumentaram o número de quedas (p<0,01). Flumazenil foi utilizado para avaliar o possível mecanismo de ação do efeito do fitol sobre o relaxamento muscular. Desta forma, 15 min após a injeção de flumazenil, foi administrado fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>. Neste teste o comportamento dos animais foi semelhante do controle, indicando que o efeito relaxante muscular apresentado pelo fitol pode envolver a participação direta dos receptores benzodiazepínicos. Além disso, foi verificado que o efeito sobre o relaxamento muscular induzido por fitol foi semelhante ao diazepam (controle positivo) (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Efeitos do fitol em camundongos no teste do *rota rod*.

Grupos	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
<b>Veículo</b>	1,40 ± 0,25	178,7 ± 0,56
<b>DZP 2</b>	2,29 ± 0,47 <sup>a</sup>	171,0 ± 1,38 <sup>a</sup>
<b>FIT 25</b>	1,45 ± 0,47	178,9 ± 3,62
<b>FIT 50</b>	1,43 ± 0,63	178,6 ± 1,80
<b>FIT 75</b>	2,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	170,0 ± 3,72 <sup>a</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	1,45 ± 0,33	177,3 ± 0,67
<b>FLU 25</b>	1,50 ± 0,16	177,5 ± 0,65
<b>FLU 25 + FIT 75</b>	1,39 ± 0,51	178,5 ± 1,20

**Legenda:** Os valores representam a média ± E.P.M. do número de quedas e tempo de permanência sobre a barra giratória dos camundongos usados nos experimentos (n=7 por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,01, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste). FIT = fitol; DZP = diazepam.

### **Teste do Labirinto em Cruz Elevado**

No labirinto em cruz elevado, usado para avaliar os efeitos ansiolíticos, não houve diferença significativa após a administração do fitol (25 e 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), em comparação com o controle (Tabela 3). A administração intraperitoneal do fitol (75 mg kg<sup>-1</sup>) promoveu um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos (NEBA) e a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA), em comparação ao grupo tratado com veículo (p<0,01). Além disso, houve um aumento significativo no grupo tratado com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>, no tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e na porcentagem do tempo de permanência (PTBA) nos braços abertos (p<0,01). Diante destes resultados, pode ser verificado que o fitol pode apresentar uma melhor ação ansiolítica que o controle positivo (diazepam) (Tabela 3).

Por outro lado, a fim de determinar se o efeito ansiolítico da ação do fitol é exercido por meio do sistema GABAérgico, os camundongos foram tratados com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>. No entanto, esse grupo de animais foi submetido a um co-tratamento com flumazenil (antagonista do receptor benzodiazepínico). O efeito ansiolítico do fitol foi revertido pelo flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>).

**Tabela 3:** Efeitos do fitol em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
<b>Veículos</b>	10,67 ± 0,74	40,00 ± 2,25	122,5 ± 6,37	40,75 ± 2,16
<b>DZP 2</b>	15,71 ± 0,28 <sup>a</sup>	75,43 ± 2,08 <sup>a</sup>	208,4 ± 3,57 <sup>a</sup>	69,25 ± 1,26 <sup>a</sup>
<b>FIT 25</b>	10,67 ± 0,65	41,33 ± 7,36	123,3 ± 17,58	44,29 ± 5,85
<b>FIT 50</b>	10,37 ± 0,74	42,45 ± 5,60	124,3 ± 8,00	46,86 ± 2,75
<b>FIT 75</b>	18,97 ± 0,47 <sup>a,b</sup>	79,67 ± 2,82 <sup>a,b</sup>	220,4 ± 12,05 <sup>a,b</sup>	80,14 ± 4,00 <sup>a,b</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	11,71 ± 0,82	62,61 ± 1,49	156,0 ± 5,31	41,60 ± 1,71
<b>FLU 25</b>	10,42 ± 0,43	42,01 ± 1,57	121,6 ± 1,28	40,30 ± 1,43
<b>FLU 25 + FIT 75</b>	10,63 ± 0,66	39,92 ± 3,75	121,8 ± 4,67	41,40 ± 2,97

**Legenda:** Os valores representam a média ± E.P.M. de NEBA, número de entradas nos braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas nos braços abertos; TPBA, tempo de permanência nos braços abertos; PTBA, porcentagem de tempo nos braços abertos, dos camundongos usados nos experimentos (n=10 por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,01, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste), <sup>b</sup>p<0,01 quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste). FIT = fitol; DZP = diazepam.

### **Teste do Claro-Escuro**

A administração de diazepam aumentou significativamente (p<0,01) o tempo de permanência dos camundongos no campo claro. Nenhuma alteração foi observada no número de entradas para o campo claro após o tratamento com fitol nas doses 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.) (p>0,05) (dados não mostrados). Neste modelo, a administração de fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> aumentou significativamente o tempo de permanência dos animais no compartimento iluminado. Este efeito foi dose-dependente e estatisticamente diferente quando comparado com o grupo controle, conforme descrito na tabela 4 (p<0,01). Por outro lado, a fim de determinar se o efeito do fitol no tempo de permanência no campo claro é exercido por meio do sistema GABAérgico, os camundongos tratados com fitol na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>, foram submetidos a um co-tratamento com flumazenil (antagonista do receptor benzodiazepínico). O efeito do fitol no tempo de permanência no campo claro foi revertido pelo flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>) (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Efeitos do fitol em camundongos no teste do claro-escuro.

Grupos	Tempo de permanência no campo claro (s)
<b>Veículo</b>	104,2 ± 3,98
<b>DZP 2</b>	158,1 ± 2,86 <sup>a</sup>
<b>FIT 25</b>	111,2 ± 8,80 <sup>a</sup>
<b>FIT 50</b>	115,6 ± 11,26 <sup>a</sup>
<b>FIT 75</b>	173,8 ± 5,31 <sup>a,b</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	101,3 ± 2,00
<b>FLU 25</b>	106,5 ± 0,65
<b>FLU 25 + FIT 75</b>	105,8 ± 4,51

**Legenda:** Os valores são que a média ± S.E.M. do tempo de permanência no campo claro (s) dos sete camundongos (por grupo) usados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,01, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste), <sup>b</sup>p<0,01 quando comparado ao grupo DZP (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). FIT = fitol; DZP = diazepam.

## DISCUSSÃO

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno pertencente ao grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada. Em estudos anteriores, realizados uma determinação preliminar da toxicidade aguda e indicou o valor de DL<sub>50</sub> de 1153,39 mg kg<sup>-1</sup> para camundongos machos. Neste capítulo, avaliaram-se os efeitos comportamentais do fitol utilizando doses mais baixas. Foi determinado que o fitol reduz a atividade locomotora e possui efeitos sedativo e ansiolítico em camundongos.

Neste estudo, foram avaliados os efeitos do fitol em modelos animais de ansiedade utilizando testes como labirinto em cruz elevado, campo aberto, *rota rod* e claro-escuro, que são modelos clássicos para a triagem da atividade do sistema nervoso central e fornecem dados sobre ansiedade, sedação e atividade miorelaxante (DE MELO et al., 2005; SILVA et al., 2007).

Os transtornos de ansiedade podem ser caracterizados pelo medo excessivo, normalmente em resposta a um objeto especificado ou com uma situação com ausência real de perigo. Os transtornos de ansiedade têm a maior taxa de prevalência global entre os transtornos psiquiátricos. A ansiedade é também um problema de saúde pública, e apresenta um custo expressivo, que associado à deficiência física tem um grande impacto negativo na

qualidade de vida do portador desta condição (KESSLER et al., 2005; DEACON; CISLER; OLATUNJI, 2010). O presente trabalho apresentou uma potencial atividade farmacológica ansiolítica do fitol. Este diterpeno foi capaz de aumentar o tempo de permanência e o número de entradas de camundongos nos espaços aversivos nos testes de labirinto em cruz elevado e claro-escuro de forma significativa. Estes resultados indicam uma atividade ansiolítica comparável à exercida pelo diazepam, a droga utilizada como padrão ansiolítico. No caso do teste de claro-escuro este efeito revelou um comportamento dose-dependente, indicando que o fitol tem um efeito ansiolítico semelhante ao diazepam usado como droga de referência.

O fitol mostrou efeito ansiolítico semelhante, quando avaliado no labirinto em cruz elevado. A ansiedade é um sintoma que acompanha diversos distúrbios do sistema nervoso central e é uma doença que por si só, caracteriza-se em seres humanos por um estado permanente de vigilância física de forma tensa e exaustiva (JACKSON; TURKINGTON, 2005). Outras espécies exibem uma variedade de reações defensivas em resposta a predadores, alguns entendidos e correlacionados com estados de ansiedade (RODGERS et al., 1995). Roedores mostram ansiedade, medo e curiosidade, quando colocados em um novo ambiente, e uma avaliação global do comportamento pode ser determinada por meio da observação de *freezing*, *grooming*, *rearing*, *head-dips* e o número de bolos fecais (TAKEDA et al., 1998; NIC et al., 2003; COSTA-CAMPOS et al., 2004).

O labirinto em cruz elevado tem sido frequentemente usado para detectar e avaliar as propriedades ansiolítica/ansio gênica de drogas (TAKEDA et al., 1998; PELLOW; FILE., 1986; PELLOW; FILE., 1987). Geralmente, os camundongos quando retirados de suas gaiolas apresentam um padrão de comportamento caracterizado por evitar os braços abertos com uma preferência consistente para os braços fechados. O perfil de preferência pela ordem é fechado > centro > aberto, indicativo de uma propensão para seções relativamente protegidas do labirinto. Esta tendência é suprimida por drogas ansiolíticas e potencializada por agentes ansio gênicos (BOURIN et al., 2007). A frequência e o tempo de permanência nos braços abertos são os maiores índices de ansiedade no modelo do labirinto em cruz elevado, uma vez que é área aberta sendo extremamente aversiva para roedores (PELLOW; FILE, 1986).

O fitol de maneira dose-dependente aumentou a porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. Estes resultados sugerem que, quando administrado por via intraperitoneal, este diterpeno possui um efeito ansiolítico. Uma redução no número de *rearings* e cruzamentos no teste de campo aberto confirma uma atividade central do fitol, uma vez que é sugerido que o *rearing* é uma função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MASUR et al., 1971).

Para complementar os possíveis efeitos ansiolíticos do fitol, o teste claro-escuro também foi realizado. Este teste baseia-se na aversão dos roedores por áreas iluminadas e em seu comportamento exploratório espontâneo em resposta a um ambiente novo e iluminado (PULTRINI et al., 2006). Após tratamento com drogas ansiolíticas (BDZ), a aversão aparente de permanecer ou se mudar para a área iluminada é removida. Desde então, o teste de claro-escuro tem sido amplamente adotado como um teste de triagem ansiolítico em camundongos (COSTALL et al., 1989). Esses resultados indicam que o fitol pode atuar no sítio BDZ do receptor de GABA no cérebro de camundongos. Assim, os efeitos ansiolítico e sedativo do fitol poderiam ser produzidos por uma ação combinada de vários sistemas neurotransmissores, incluindo os receptores GABA<sub>A</sub> (SILVA et al., 2006).

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal. Conforme pode ser observado por meio de exploração da área mais central pelos animais tratados com fitol, 30 min antes do teste. A partir dos resultados do teste de campo aberto, foi detectado que as porcentagens da distância percorrida na área central e o tempo gasto na área central foram aumentados pelo tratamento com fitol ou diazepam, indicando que o efeito exploratório do tratamento com fitol, foi semelhante ao efeito apresentado pelo diazepam.

Neste teste o diazepam foi usado como um ansiolítico padrão e tem sido empregado frequentemente na farmacologia comportamental como um composto de referência para substâncias com potencial efeito ansiolítico (HERRERA-RUIZ et al., 2006). Na análise preliminar sobre o efeito ansiolítico do fitol, foi mostrado que este composto apresentou melhor efeito no teste claro-escuro em comparação ao resultado do teste labirinto em cruz elevado, assim como o efeito do diazepam, sugerindo que o método do teste claro-escuro pode ser mais sensível do que o teste do labirinto em cruz elevado na avaliação dos efeitos ansiolíticos. Ao mesmo tempo, agonistas típicos dos receptores GABA/benzodiazepínicos, como diazepam, têm efeitos colaterais, incluindo o relaxamento muscular e alterações do humor (HERTZ et al., 2006). O fitol apresentou efeitos ansiolíticos semelhantes ao diazepam, sem afetar a atividade locomotora em doses mais baixas, indicando que este diterpeno exerce um efeito sedativo e ansiolítico.

Agentes sedativos e ansiolíticos como os benzodiazepínicos, potencializam a ação do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) sobre os receptores GABA<sub>A</sub>. Os benzodiazepínicos têm afinidade para o subtipo GABA<sub>A</sub>, que é o maior sistema de inibição neuronal no SNC. Estes compostos atuam sobre esses receptores aumentando o efeito inibitório do GABA e exercem atividade depressora sobre o SNC (LILLY; TIETZE, 2000). Em ensaios pré-clínicos, essas substâncias são amplamente utilizadas como sedativos e ansiolíticos de acordo com os

estudos em modelos animais (IMAMURA; PRASAD, 1998), como os testes do labirinto em cruz elevado e claro-escuro, sendo os efeitos do diazepam altamente reprodutíveis (PELLOW et al., 1985). Com base nestes resultados, pode ser sugerido que o fitol é capaz de reduzir a ansiedade dos animais expostos a estes modelos experimentais por meio de um mecanismo de ação semelhante ao dos benzodiazepínicos (TREIT, 1985).

Flumazenil reverteu não apenas o efeito do diazepam, mas também o efeito do fitol, indicando que ambas as drogas podem apresentar um mecanismo de ação semelhante. Os resultados apresentados podem reforçar o interesse em identificar o mecanismo de ação do fitol com o receptor GABA<sub>A</sub>, provavelmente nos subtipos de receptores que medeiam os efeitos dos benzodiazepínicos, para induzir atividades sedativa e ansiolítica. No entanto, estudos adicionais, são necessários para esclarecer totalmente o mecanismo da ação ansiolítica do fitol. Além disso, o fitol poderia manifestar esses efeitos em algumas doses, sem mostrar atividade sedativa, sendo, portanto, potencialmente útil na prática clínica.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.N.; DE SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ARAÚJO, D.A.M.; LEITE, J.R; MATTEI, R. Anticonvulsant effect of a natural compound alpha,beta-epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neuroscience Letters**, v. 443, p. 51-55, 2008.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-35, 1973.

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Informação Científica e Tecnológica / Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

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.



CARLINI, E.A., BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S.C.; RIGO, A.P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 481-489, 2004.

COSTA, M.; FLÓRIO, J.C.; GARGANO, A.C.; DE LIMA, V.M.; KOHN, D.O.; COSTA, C.A.R.A. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemon grass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 828-836, 2011.

COSTALL, B.; JONES, B.J.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; TOMKINS, D.M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, p. 777-785, 1989.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 695-699, 1981.

DEACON, B.J.; CISLER, J.M.; OLATUNJI, B.O. Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy for Anxiety Disorders: A Review of Meta-Analytic Findings. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, p. 557-577, 2010.

DEMYTTENAERE, K.; BRUFFAERTS, R.; POSADA-VILLA, J.; GASQUET, I.; KOVESS, V.; LEPINE, J.P.; ANGERMEYER, M.C.; BERNERT, S.; DE GIROLAMO, G.; MOROSINI, P.; POLIDORI, G.; KIKKAWA, T.; KAWAKAMI, N.; ONO, Y.; TAKESHIMA, T.; UDA, H.; KARAM, E.G.; FAYYAD, J.A.; KARAM, A.N.; MNEIMNEH, Z.N.; MEDINA-MORA, M.E.; BORGES, G.; LARA, C.; DE GRAAF, R.; ORMEL, J.; GUREJE, O.; SHEN, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, M.; ALONSO, J.; HARO, J.M.; VILAGUT, G.; BROMET, E.J.; GLUZMAN, S.; WEBB, C.; KESSLER, R.C.; MERIKANGAS, K.R.; ANTHONY, J.C.; VON KORFF, M.R.; WANG, P.S.; BRUGHA, T.S.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; LEE, S.; HEERINGA, S.; PENNELL, B.E.; ZASLAVSKY, A.M.; USTUN,

T.B.; CHATTERJI, S. Prevalence, severity, and unmet need fortreatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, p. 2581-2590, 2004.

DE MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; DE ARAÚJO, F.L.; LIMA, V.T.; BARBOSA-FILHO, J.M. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 451-454, 2005.

DE SOUSA, D.P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233-2252, 2011.

DE SOUSA, F.C.F.; SILVA, M.I.G.; SILVA, M.A.G.; DE AQUINO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; DE VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S.M.M. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

DO AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.G.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; MELO, C.T.; DE ARAÚJO, F.L.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, P.F.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE SOUSA, F.C. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-Limonene in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1217-1220, 2007.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI.S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA.F.R.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.S.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JUNIOR, L. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

HERRERA-RUIZ, M.; JIMENEZ-FERRER, J.E.; DE LIMA, T.C.M.; AVILES-MONTES, D.; PEREZ-GARCIA, D.; GONZALEZ-CORTAZAR, M.; TORTORIELLO, J. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 23-28, 2006.

HERTZ, L.; ZHAO, Z.; CHEN, Y. The Astrocytic GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepine-Like Receptor: The Joker Receptor for Benzodiazepine-Mimetic Drugs? **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 1, p. 93-103, 2006.

IMAMURA, M.; PRASAD, C. Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. **Physiology & Behavior**, v. 64, p. 415-417, 1998.

KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K.R.; WALTERS, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

LILLY, S.M.; TIETZ, E.I. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions q Relationship to GABA receptor subunit expression A. **Brain Research**, v. 882, p. 138-148, 2000.

LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 25, p. 180-185, 1987.

JACKSON, M.J.; TURKINGTON, D. Depression and anxiety in epilepsy. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 76, p. 45-47, 2005.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos Fundamentais de Neurociências**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 651-668, 2004.

MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M. Evaluation antioxidant activity *in vitro* and anxiolytic- and antidepressant-like of the ethanolic extract from *Bellis perennis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2012. *in press*.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (–)  $\alpha$ 9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MITTE, K.; NOACK, P.; STEIL, R.; HAUTZINGER, M. A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, p. 141-150, 2005.

NIC, D.B.A.; BOURIN, M.; HASCOET, M. Anxiolytic-like effects of 5HT<sub>2</sub> ligands on three mouse models of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 140, p. 203-214, 2003.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Lack of cross-tolerance in mice between the stimulatory and depressant actions of novel anxiolytics in the holeboard. **Behavioural Brain Research**, v. 23, p. 159-166, 1987.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, p. 1720-1725, 2006.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. **eCAM Advance Access Publication** v. 5, n. 2, p. 181-186, 2008.

REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of Kava-Kava in the elevated plus maze test-a comparison with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 855-860, 2002.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 805-813, 1995.

SAKELLARIDIS, N.; TARANTILIS, P.A.; GEORGIADOU, G.; BOULTADAKIS, A.; PITSIKAS, N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. **Phytomedicine**, v. 15, p. 1135-1139, 2008.

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, anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platypetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2012. *in press*.

SILVA, A.F.S.; ANDRADE, J.P.; BEVILAQUA, L.R.M.; SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A.T.; ZUANAZZI, J.A. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 148-154, 2006.

SILVA, F.T.; LEITE, J.R. Physiological modifications and increase in state anxiety in volunteers submitted to the Stroop Color-Word Interference Test: A preliminary study. **Physiology & Behavior**, v. 70, p. 113-118, 2002.

SILVA, M.I.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; AMARAL, J.F.; DE SOUSA, D.P. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 141-147, 2007.

SOUTO-MAIOR, F.N.; DE CARVALHO, F.L.; DE MORAIS, L.C.S.L.; NETTO, S.M.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 100, p. 259-263, 2011.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, p. 21-29, 1998.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 203-222, 1985.

WITTCHEN, H.U.; HOYER, J. Generalized anxiety disorder: nature and course. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, p. 15-21, 2001.

**CAPÍTULO III: Efeito anticonvulsivante do fitol no modelo de pilocarpina em camundongos.**

**(Artigo a submetido à Revista Neuroscience letters)**

## **Efeito anticonvulsivante do fitol no modelo de pilocarpina em camundongos**

**COSTA, JP<sup>1</sup>; FERREIRA, PB<sup>1</sup>; SOUSA, DP<sup>2</sup>; FENG, D<sup>3</sup>; FERREIRA, PMN<sup>1</sup>;  
FREITAS, RM<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular, Celular e do Desenvolvimento, Universidade do Colorado em Boulder, Colorado.

### **RESUMO**

A epilepsia é uma das mais comuns condições neurológicas sérias, afetando mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Continua sendo uma grande preocupação de saúde, apesar da crescente disponibilidade de novas drogas anticonvulsivantes. Portanto, o presente estudo investigou os efeitos do fitol em convulsões induzidas por pilocarpina. A latência para o desenvolvimento de convulsões e taxa de mortalidade foi registrada neste modelo utilizando camundongos. Os resultados revelaram que nas convulsões induzidas pela pilocarpina o fitol (25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) aumentou a latência para a primeira convulsão e diminuiu a porcentagem destas. Além disso, nenhum dos efeitos do fitol no modelo de pilocarpina foi bloqueado pelo pré-tratamento com atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos. E estes efeitos também não foram revertidos pelo flumazenil, um antagonista dos receptores benzodiazepínicos. Sugere-se que o fitol apresenta atividade anticonvulsivante por modulação dos sistemas de neurotransmissores colinérgicos e GABAérgicos que precisam ser mais bem investigados, indicando que este diterpeno pode encontrar aplicação clínica no tratamento da epilepsia humana.

**Palavras-chave:** Anticonvulsivantes; Camundongos; Convulsões; Fitol; Pilocarpina.



**ABSTRACT: Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice**

Epilepsy is one of the most common, serious neurological conditions, affecting more than 50 million people worldwide. It remains a continuing health concern despite the increasing availability of newer anticonvulsant drugs. Therefore, the present study investigated the effects of phytol in pilocarpine-induced seizures. The latency for development of convulsions and mortality rate was recorded in this model using mice. The results revealed that in pilocarpine-induced seizures model, phytol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) increased latency to first seizure and decreased the percentage of these seizures. Moreover, these doses of phytol also protected mice against status epilepticus induced by pilocarpine and decreased the mortality rate. In addition, none of phytol effects in the pilocarpine model were blocked by atropine pretreatment, an antagonist of muscarinic receptors. And none of these effects also were reversed by flumazenil, an antagonist of benzodiazepine receptors. It is suggested, phytol has anticonvulsant activity by modulation of neurotransmitter cholinergic and GABAergic systems that need to be investigated, indicating that this diterpene may find clinical application in the treatment of human epilepsy.

**Keywords:** Anticonvulsant; Mice; Phytol; Pilocarpine; Seizures.

## INTRODUÇÃO

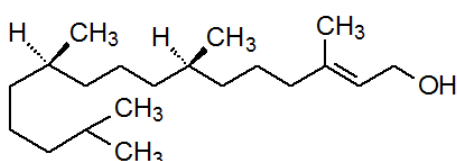
A epilepsia é uma doença neurológica crônica comum caracterizada por convulsões espontâneas recorrentes. É considerada um importante problema de saúde que afeta 1 a 2% da população mundial (MARTIN; ARAQUE; BUNO, 2001). Embora as convulsões em dois terços dos pacientes sejam controladas com sucesso com medicamentos anticonvulsivantes, o outro um terço restante permanece refratária à terapia medicamentosa (MILITÃO; FERREIRA; FREITAS, 2010). Este fato tem estimulado pesquisas consideráveis para o desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas com maior segurança e eficácia que os anticonvulsivantes disponíveis atualmente. Em razão disso, as plantas medicinais têm sido uma importante fonte para o desenvolvimento de novas drogas com atividade anticonvulsivante (CARLINI, 2003).

Curiosamente, nos últimos anos, crescentes evidências têm mostrado que os produtos naturais utilizados como remédios populares têm contribuído significativamente na descoberta de medicamentos modernos em todo o mundo. Além disso, numerosos medicamentos fitoterápicos são ativos no sistema nervoso central (SNC), e têm pelo menos um potencial hipotético para as condições crônicas, tais como epilepsia que não respondem bem aos tratamentos convencionais (CARLINI, 2003; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2007; CAMPÊLO et al., 2010; MARQUES et al., 2011).

A pesquisa para o tratamento da epilepsia tem sido uma preocupação constante. A necessidade de introdução de novas drogas na terapêutica desta patologia é essencial para o tratamento ou o reforço desta, sempre buscando maior segurança e eficácia. A busca por alternativas menos tóxicas resultou em uma diminuição do uso de combinações de plantas medicinais, bem como a introdução de substâncias isoladas e/ou sintéticas na terapêutica. Isto é apoiado por estudos anteriores que mostraram que alguns monoterpenos tais como timoquinona (HOSSEINZADEH et al., 2005), citronelol (DE SOUSA et al., 2006),  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (DE SOUSA et al., 2007a),  $\alpha$ -terpineol (DE SOUSA et al., 2007b), e isopulegol (SILVA et al., 2009) presentes em vários óleos essenciais, possuem atividade anticonvulsivante em experimentos realizados com animais,

Entre os diterpenos, o fitol é quimicamente definido como 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (**Ilustração 1**). Fitol é um ingrediente de perfumaria usado em muitos compostos de fragrância. Pode ser encontrado em fragrâncias utilizadas nos cosméticos decorativos, perfumes finos, xampus, sabonetes e artigos de higiene outros, bem como em produtos não cosméticos, como os produtos de limpeza e detergentes. Seu uso em todo o mundo é

aproximadamente de 0,1 a 1,0 toneladas por ano (IFRA, 2004). Fitol é um membro de fragrância estrutural do grupo de alcoóis de cadeia ramificada insaturada. Suas características estruturais comuns são um grupo hidroxila por molécula, uma cadeia de carbono C4-C16 com uma ou várias cadeias laterais de grupos metila ou etila e até quatro ligações duplas não-conjugadas (BELSITO et al., 2010). No entanto, os efeitos deste diterpeno no sistema nervoso central ainda não foram estudados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anticonvulsivante do fitol e caracterizar seu mecanismo de ação sobre convulsões induzidas por pilocarpina.



**Ilustração 1.** Estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Drogas*

As drogas utilizadas, flumazenil (FLU), fitol (FIT), hidrocloreto de pilocarpina (P400), monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos de Sigma Chemical Co. St. Louis, M., (USA) e diazepam (DZP) da Cristália (Brasil). A dosagem de todas as drogas foi expressa em miligramas por quilograma de peso corporal. Os agentes foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) com uma dose 0,1 ml 10 g<sup>-1</sup>.

### *Animais*

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos (25 a 30 g, 2 meses de idade), mantidos em uma sala com temperatura controlada (26 ± 1 °C) com 12 h de ciclo claro/escuro (luz 08h00-12h00), com comida e água *ad libitum* (Nutrilabor, Campinas, Brasil). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA), Washington, DC (USA, 1985). Os protocolos experimentais e procedimentos e foram

aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 013/2011).

### ***Procedimento experimental***

Os camundongos foram divididos em cinco grupos ( $n = 24$ ). O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), o segundo grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.). Os demais grupos foram tratados com fitol (FIT) nas doses de 25, 50 e  $75 \text{ mg kg}^{-1}$ . Trinta minutos após a administração da droga, os camundongos foram tratados com pilocarpina (i.p.) na dose de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  e observados por pelo menos 1 h para detectar a latência de instalação da primeira convulsão (LIPC), latência para o desenvolvimento do estado de mal epilético (LDEP), a ocorrência de convulsões tônicas, clônicas, e tônico-clônicas, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram após a administração de P400 (FREITAS, 2009).

Em outra etapa de experimentos, 30 min após o tratamento com veículo,  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  de FIT e  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  de atropina, os camundongos ( $n = 24$ ) receberam pilocarpina (i.p.) na dose de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  e foram observados por pelo menos 1 h para detectar a LIPC, LDEP, a ocorrência de convulsões tônicas, clônicas, e tônico-clônicas, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram após a administração de pilocarpina. Atropina ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ), FIT ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e atropina ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) + FIT ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram usados como drogas de referência.

A atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (BLEDSOE; PORTER; CHERRY, 2004), foi administrado em um grupo de vinte e quatro camundongos, 15 min antes do tratamento com fitol. Quarenta e cinco minutos após o último tratamento foi administrado pilocarpina em cada animal. Os parâmetros registrados foram: LIPC, LDEP, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram.

Em outra série de experimentos, 30 min após o tratamento com veículo,  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  de FIT,  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de diazepam (DZP), e  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  de flumazenil (FLU), os camundongos ( $n = 24$ ) receberam pilocarpina (i.p.) na dose de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  e foram observados por pelo menos 1 h para detectar a LIPC, LDEP, a ocorrência de convulsões tônicas, clônicas, e tônico-clônicas, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram após a administração de pilocarpina. Diazepam ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e FLU ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram utilizados como drogas de referência.

FLU, um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>-BZD (FILE; LISTER; NUTT, 1982'; FILE; PELLOW, 1986; BRODGEN; GOA, 1988; BRODGEN; GOA, 1991), foi administrado em dois grupos de camundongos cada, 15 min antes dos tratamentos com diazepam ou FIT. Trinta minutos após o último tratamento foi administrado pilocarpina em cada animal. Os parâmetros registrados foram: LIPC, LDEP, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram.

### *Análises Estatísticas*

Resultados da latência para primeira convulsão e estado epiléptico foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*, esses resultados mostram uma distribuição paramétrica. O número de animais que convulsionaram e que sobreviveu ao período de observação foram calculados como porcentagens (porcentagem de convulsões e porcentagem de sobrevivência, respectivamente), e comparado com um teste não paramétrico ( $\chi^2$ ). Em ambas as situações, a significância estatística foi considerada em  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).

## **RESULTADOS**

Após 3 a 5 min da administração de pilocarpina, todos os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia, movimentos orofaciais) e movimentos estereotipados (*sniffing*, *grooming* e *rearing*), seguido de convulsões motoras límbicas em 100% (24/24) dos animais testados ( $p < 0,001$ ). O processo convulsivo persiste e evolui até um estado de mal epiléptico em 100% (24/24) desses camundongos, levando a morte de todos os animais ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 1**). Todos os animais selecionados e pré-tratados com o fitol foram observados por 1 h após a administração de pilocarpina e manifestaram alterações comportamentais, tais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, cromodacriorréia, automatismos faciais, *wet dog shakes* e *rearing*.

A administração do fitol, 30 minutos antes da pilocarpina, causou uma proteção significativa dose-dependente contra convulsões induzidas por pilocarpina e estado epiléptico, 25 (58,34%,  $p < 0,001$ ), 50 (66,67%,  $p < 0,001$ ) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (83,34 %,  $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Além disso, fitol causou uma proteção significativa dose-dependente contra a taxa de mortalidade induzida por pilocarpina (**Tabela 1**). Um efeito protetor contra crises convulsivas

e taxa de mortalidade também foi observado com atropina (25 mg kg<sup>-1</sup>) e diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>) utilizadas como drogas de referências (**Tabelas 2 e 3**).

Pilocarpina induziu a primeira convulsão em  $7,90 \pm 1,68$  min e estado de mal epiléptico em  $14,95 \pm 1,57$  min. De acordo com a tabela 1, fitol causou um aumento de latência para a primeira convulsão induzida por P400 nas doses de 25 ( $19,10 \pm 3,83$  min), 50 ( $24,25 \pm 5,17$  min) ou 75 mg kg<sup>-1</sup> ( $27,50 \pm 6,36$  min) em comparação com grupo P400 ( $7,90 \pm 1,68$  min,  $p < 0,001$ ). Além disso, o fitol produziu de maneira dose-dependente, um aumento de latência para o desenvolvimento do estado epiléptico induzido pela pilocarpina nas doses de 25 ( $29,20 \pm 3,75$  min), 50 ( $34,10 \pm 3,46$  min) ou 75 mg kg<sup>-1</sup> ( $37,50 \pm 4,50$  min) em comparação com grupo P400 ( $14,95 \pm 1,57$  min,  $p < 0,001$ ).

A dose de 75 mg kg<sup>-1</sup>, foi selecionada para as análises do mecanismo de ação, pois, mostrou um maior aumento na latência das convulsões quando comparado com as outras doses ( $p < 0,001$ ). Houve proteção de 83,34% (10/12) dos animais contra as convulsões, a ocorrência de estado de mal epiléptico foi reduzida em 83,34% (10/12), houve aumento da latência do estado epiléptico em 151% e reduziu em 83,34% (10/12) a taxa de mortalidade quando comparado ao grupo tratado apenas com pilocarpina (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.

Grupos	LIPC (min)	Convulsões (%)	LDEP (min)	Sobrevivência (%)	N
P400	$7,90 \pm 1,68$	100	$14,95 \pm 1,57$	00	24
FIT 25 + P400	$19,10 \pm 3,83^a$	41,66 <sup>d</sup>	$29,20 \pm 3,75^a$	58,34 <sup>d</sup>	24
FIT 50 + P400	$24,25 \pm 5,17^{a,b}$	33,33 <sup>d,e</sup>	$34,10 \pm 3,46^{a,b}$	66,67 <sup>d,e</sup>	24
FIT 75 + P400	$27,50 \pm 6,36^{a,b,c}$	16,66 <sup>d,e,f</sup>	$37,50 \pm 4,50^{a,b,c}$	83,34 <sup>d,e,f</sup>	24

Resultados para a latência para primeira convulsão e latência para o estado epiléptico foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do número de experimentos mostrados na tabela. Resultados para porcentagem de convulsões e porcentagem de sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental. <sup>a</sup> $p < 0,05$  em comparação ao grupo P400; <sup>b</sup> $p < 0,05$  em comparação ao grupo FIT 25 + P400; <sup>c</sup> $p < 0,05$  em comparação ao grupo FIT 50 + P400 (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>d</sup> $p < 0,05$ , em comparação ao grupo P400; <sup>e</sup> $p < 0,05$ , em comparação a FIT 25 + P400; <sup>f</sup> $p < 0,05$  em comparação com FIT 50 + grupo P400 ( $\chi^2$ -teste). N = Número de animais por grupo.

Atropina foi utilizada para avaliar o possível mecanismo de ação do efeito anticonvulsivante de fitol. Para isso, 15 min após a injeção de atropina, fitol ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foi administrado, e, sob estas condições o comportamento dos animais foi semelhante ao da atropina mais pilocarpina, indicando que o fitol não apresenta um efeito anticonvulsivante relacionados diretamente aos receptores colinérgicos muscarínicos (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.

Grupos	LIPC (min)	Convulsões (%)	LDEP (min)	Sobrevivência (%)	N
P400	$7,90 \pm 1,68$	100	$14,95 \pm 1,57$	00	24
ATR 25	00	00	00	100	24
ATR 25 + P400	00 <sup>a</sup>	00 <sup>b</sup>	00 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	24
FIT 75 + P400	$27,50 \pm 6,36^a$	16.66 <sup>b</sup>	$37,50 \pm 4,50^a$	83,33 <sup>b</sup>	24
FIT 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + FIT 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + FIT 75 + P400	00	00	00	100	24

Resultados para a latência para primeira convulsão e latência para o estado epiléptico foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do número de experimentos mostrados na tabela. Resultado para porcentagem de convulsões e porcentagem de sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental. <sup>a</sup> $p < 0,05$  em comparação ao grupo P400; <sup>b</sup> $p < 0,05$  em comparação com o grupo P400 ( $\chi^2$ -teste). N = Número de animais por grupo.

Os efeitos anticonvulsivantes de fitol são mais potentes que o diazepam (**Tabela 3**). Por outro lado, a fim de determinar se os efeitos anticonvulsivantes de fitol são exercidos por meio do sistema GABAérgico, os camundongos tratados com fitol foram submetidos ao co-tratamento com flumazenil, um antagonista do receptor benzodiazepínico. No entanto, a presença de flumazenil não reverteu o efeito anticonvulsivante de fitol, mas bloqueou o efeito do diazepam (Tabela 3). Nenhum animal em que foi administrado Tween 0,05% dissolvido em solução salina a 0,9% (controle), atropina, flumazenil, diazepam e somente fitol apresentou crises convulsivas.

**Tabela 3.** Efeitos do fitol sobre as convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.

<b>Grupos</b>	<b>LIPC (min)</b>	<b>Convulsões (%)</b>	<b>LDEP (min)</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>	<b>N</b>
P400	7,90 ± 1,68	100	14,95 ± 1,57	00	24
DZP 5	00	00	00	100	24
DZP 5 + P400	15,40 ± 3,50 <sup>a</sup>	25 <sup>d</sup>	23,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	75 <sup>d</sup>	24
FIT 75 + P400	27,50 ± 6,36 <sup>a</sup>	16.66 <sup>d</sup>	37,50 ± 4,50 <sup>a</sup>	83,33 <sup>d</sup>	24
FLU 25	00	00	00	100	24
FLU 25 + P400	7,92 ± 0,57	100	14,91 ± 0,57	00	24
FLU 25 + DZP 5 + P400	7,89 ± 0,59 <sup>b</sup>	100 <sup>e</sup>	14,88 ± 0,43 <sup>b</sup>	00 <sup>e</sup>	24
FLU 25 + FIT 75 + P400	27,42 ± 1,94	16.66	37,45 ± 0,85	83,33	24

Resultados para a latência para primeira convulsão e latência para o estado epiléptico foram expressos como média ± E.P.M. do número de experimentos mostrados na tabela. Resultados para porcentagem de convulsões e porcentagem de sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental. <sup>a</sup>p<0,05 em comparação ao grupo P400; <sup>b</sup>p<0,05 em comparação ao grupo DZP 5 + P400; <sup>c</sup>p<0,05 em comparação ao grupo FIT 75 + P400 (ANOVA e t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>d</sup>p<0,05, em comparação ao grupo P400; <sup>e</sup>p<0,05, em comparação a DZP 5 + P400 ( $\chi^2$ -teste). N = Número de animais por grupo.

## DISCUSSÃO

O modelo de pilocarpina é um modelo animal útil para investigar o desenvolvimento da neuropatologia das convulsões e da epilepsia do lobo temporal (CAVALHEIRO et al., 1994; KWAN; BRODIE, 2000; FREITAS et al., 2004). Neste modelo, a lesão inicial é caracterizada por um prolongado estado de mal epiléptico (EME), que causa perda neuronal, gliose, e degeneração vacuolar típica na região do hipocampo de animais tratados com pilocarpina (SANTOS et al., 2008; 2010).

Embora o mecanismo das crises convulsivas induzidas por pilocarpina e EME não esteja completamente esclarecido, sabe-se que este depende da ativação muscarínica e também de alterações nas atividades da colina acetiltransferase (ChAT) e da enzima



acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de ratos (FREITAS et al., 2010). Após a toxicidade induzida por uma fase inicial colinérgica, ocorre uma fase distinta não colinérgica, em que há produção excessiva de  $H_2O_2$ , liberado durante a dismutação de  $O_2^-$  que pode inibir a atividade da superóxido dismutase durante esta fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina (TOMÉ; FENG; FREITAS, 2010).

Uma alta porcentagem de pacientes com epilepsia tem alguma comorbidade, e este é um fator importante na escolha do medicamento antiepiléptico mais adequado. Embora o nível de evidência científica relativa ao tratamento de epilepsia em pacientes com outras doenças associadas seja baixo e raramente apoiado por ensaios clínicos, há uma necessidade de avaliar os dados disponíveis que suportam o uso de certas drogas antiepilépticas na presença de doenças específicas. Assim, esta informação reforça a realização deste estudo que apresenta um importante interesse clínico, uma vez que estamos procurando novas formas para tratar a epilepsia, provavelmente, com menos efeitos colaterais e atividade antioxidante capaz de reduzir o estresse oxidativo induzido por convulsões neste modelo.

Convulsões induzidas por pilocarpina produzem disfunções diversas em muitas regiões do cérebro (por exemplo: hipocampo, estriado, córtex frontal entre outros (FREITAS et al., 2005) como consequência da ruptura de conexões neuronais entre as regiões cerebrais. As mudanças comportamentais durante as convulsões em ratos têm sido amplamente relatadas. Esses comportamentos são quantificáveis, replicáveis e revertidos pela administração aguda de anticonvulsivantes e compostos antioxidantes (XAVIER et al., 2007; MILITÃO; FREITAS, 2010; FERREIRA, FREITAS, 2010).

No presente trabalho, os efeitos anticonvulsivantes de fitol foram estudados. O fitol foi inicialmente avaliado em estudos comportamentais, o que dá uma boa indicação na redução da taxa de mortalidade por convulsões. Os resultados mostraram que o fitol foi capaz de diminuir significativamente a taxa de mortalidade após convulsões e estado de mal epilético induzido pela pilocarpina.

O fitol é um álcool de cadeia ramificada, que faz parte da molécula de clorofila (STEINBERG, 1995). Os derivados do fitol podem ativar receptores hormonais nucleares e influenciar a expressão gênica e diferenciação celular (BROWN et al., 1993; HANSEN, 1966; MACKIE et al., 2009). Estes efeitos farmacológicos atribuídos ao fitol podem ser responsáveis pelo controle da função neuronal, influenciando sistemas de neurotransmissores e modulando a liberação e/ou síntese de neurotransmissores inibitórios relacionados com o processo convulsivo. Estes resultados confirmam a atividade anticonvulsivante do fitol em convulsões induzidas por pilocarpina e no estado de mal epilético, como revelado pelo

aumento na latência para a instalação das convulsões, na latência de estado de mal epilético, bem como pela redução da taxa de mortalidade por convulsões.

Surpreendentemente, os resultados combinados mostraram que o fitol inibe atividade convulsiva da pilocarpina e protege os camundongos contra a morte induzida por convulsões. Este recurso pode ser interessante quando se avalia o potencial farmacológico de um novo candidato para um novo fitomedicamento com o objetivo de produzir neuroproteção em resposta a convulsões induzidas por pilocarpina. O desenvolvimento atual de novas drogas anticonvulsivantes requer a escolha apropriada de modelos animais de epilepsia para a identificação da atividade anticonvulsivante, bem como de novos mecanismos de ação. Portanto, os modelos de convulsão em animais de laboratório ainda são o pré-requisito mais importante na pesquisa pré-clínica para novas drogas anticonvulsivantes (LOSCHER; SCHMIDT, 1988).

O modelo de pilocarpina apresenta relevância preditiva em relação aos testes de compostos com potencial atividade clínica (BARROS et al., 2007; MILITÃO; FERREIRA; FREITAS, 2010). Além disso, o modelo de pilocarpina é assumido para identificar a eficácia de compostos anticonvulsivantes (PATEL, 2004; BARROS et al., 2007). Os resultados do presente estudo mostram que o fitol pode ser eficaz no bloqueio de convulsões tônico-clônicas generalizadas. Por outro lado, a gênese das crises originadas devido à atividade da pilocarpina envolve o efeito agonista desta droga em receptores colinérgicos muscarínicos, que reduz a transmissão sináptica inibitória para promover a neurotransmissão excitatória (TURSKI et al., 1983). Conforme relatado o fitol confere proteção contra as convulsões induzidas por pilocarpina. No entanto, estes resultados sugerem que o mecanismo de ação do fitol, provavelmente, não envolve receptores GABAérgicos e muscarínicos, uma vez que os antagonistas destes sistemas, quando utilizados em combinação com fitol no tratamento dos animais antes da pilocarpina não promoveram diferença significativa entre os grupos tratados apenas com fitol. Portanto, é razoável sugerir que a atividade anticonvulsivante exercida pelo fitol pode não estar associada a efeitos modulatórios nos sistemas muscarínico e GABAérgico. A ativação direta e/ou indireta do fitol sobre os sistemas de neurotransmissores cerebrais é desconhecida e precisa ser melhor investigada.

Embora o fitol seja eficaz quando comparado com as drogas padrão utilizadas em nosso estudo (como por exemplo, diazepam e atropina), os efeitos observados parecem oferecer uma vantagem potencial sobre a maioria dos agentes com efeitos anticonvulsivantes. Por exemplo, diazepam é especialmente eficaz na prevenção das convulsões tônico-clônicas generalizadas

induzidas por pilocarpina. Em contraste, o efeito mais significativo de atropina é a sua capacidade de bloquear o padrão de convulsões induzidas por pilocarpina.

Os resultados mostram que o fitol diminui a frequência das convulsões induzidas por pilocarpina e aumenta a taxa de sobrevivência. De acordo com a revisão de literatura, estes efeitos do fitol na taxa de mortalidade observada durante a fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina não foram registrados anteriormente. Assim, estes achados podem ter implicações importantes para a compreensão do mecanismo fisiopatológico da epilepsia para promover novos avanços no desenvolvimento de drogas antiepiléticas seletivas. O fitol também protegeu os camundongos contra o estado de mal epilético observado durante as convulsões. Novas investigações dos efeitos do fitol contra o estresse oxidativo, necrose apoptose e/ou autofagia observados durante a fase aguda deste modelo de epilepsia estão em andamento para confirmar seus efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores.

## REFERÊNCIAS

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; FREITAS, R.L.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; TAKAHASHI, R.N. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; GREIM, H.; HANIFIN, J.H.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; TAGAMI, H. A safety assessment of alcohols with unsaturated branched chain when used as fragrance ingredients. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, p. S151-S192, 2010.

BLEDSON, E.B.; PORTER, R.S.; CHERRY, R.A. **Intermediate Emergency Care**. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2004, 260 p.

BRODGEN, R.N.; GOA, K.L. Flumazenil: a preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use. **Drugs**, v. 35, p. 448-467, 1988.

BRODGEN, R.N.; GOA, K.L. Flumazenil: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as a benzodiazepine antagonist. **Drugs**, v. 42, p. 61-89, 1991.

BROWN, P.J.; MEI, G.; GIBBERD, F.B.; BURSTON, D.; MAYNE, P.D.; McCLINCHY, J.E.; SIDEY, M. Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 6, p. 295-305, 1993.

CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Evaluation of neuroprotective potential of *Citrus limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 10, p. 116-126, 2010.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 3, p. 501-512, 2003.

CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: Amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

DE SOUSA D.P.; GONÇALVES J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ J.S.; ARAÚJO D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha$ - $\beta$ -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of alfa-Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v.45, p. 69-70, 2007b.

FILE, S.E.; LISTER, R.G.; NUTT, D.J. The anxiogenic actions of benzodiazepine antagonists. **Neuropharmacology**, v. 21, p. 1033-1037, 1982.

FILE, S.E.; PELLOW, S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. **Psychopharmacology**, v. 88, p. 1-11, 1986.

FREITAS, R.M. Vigabatrina aumenta atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 1, p. 36-40, 2010.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 327-332, 2004.

FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA G.S.B.; FONTELES M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140-144, 2009.

FREITAS, R.M. Lipoic acid increases hippocampal choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities and improvement memory in epileptic rats. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 162-170, 2010.

HANSEN, R.P. Occurrence of phytanic acid in rumen bacteria. **Nature**, v. 210, p. 841, 1966.

HOSSEINZADEH, H.; PARVARDEH, S.; NASSIRI-ASL, M.; MANSOURI, M.T. Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppress epileptic seizures in rats. **Medical Science Monitor**, v. 11, p. 106-110, 2005.

IFRA (International Fragrance Association). **Use Level Survey**, August 2004.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Early identification of refractory epilepsy. **New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 314-319, 2000.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, v. 2, p. 145-181, 1988.

MACKIE, J.T.; ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; SCHROEDER, F.; KIER, A.B. Phytol-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 201-208, 2009.

MARQUES T.H.C.; CARDOSO, K.M.F.; ALMEIDA, A.A.C.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 10, p. 338-350, 2011.

MARTIN, E.D.; ARAQUE, A.; BUNO, W. Synaptic regulation of the slow  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, p. 2878-2886, 2001.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 1951-1962, 2004.

QUINTANS JÚNIOR, L.J.; SILVA, D.A.; SIQUEIRA, J.S.; SOUZA, M.F.V.; ALMEIDA, R.N.; SILVA-JÚNIOR, R.G.C. Anticonvulsant properties of the total alkaloid fraction of *Rauvolfia ligustrina* Roem. et Schult. in male mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 152-158, 2007.

SANTOS, L.F.L.; FREITAS, R.L.; XAVIER, S.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 1-5, 2008.

SANTOS, I.M.; FREITAS, R.L.; DA SILVA, E.P.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; TOMÉ, A.R.; FENG, D.; DE FREITAS, R.M. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures. **Brain Research**, v. 1315, p. 33-40, 2010.

SILVA, M.I.; SILVA, M.A.; AQUINO NETO, M.R.; MOURA, B.A.; SOUSA, H.L.; LAVOR, E.P.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

STEINBERG, D. Refsum disease. In: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S., VALLE, D. Editores. McGraw-Hill: New York, p. 2351–2369, 1995.

TOMÉ, A.R.; FENG D.; FREITAS, R.M. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidativestress prior to in pilocarpine-induced seizures, **Neurochemical Research**, v. 35, p. 580-587, 2010.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEIROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315-335, 1983.

USA Department of Health and Human Services, Institute of Laboratory Animal Resources. **Guide for the care and use of laboratory animals**, National Research Council, Washington, DC, 1985.

XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidante effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 8, p. 76-79, 2007.

**CAPÍTULO IV: Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas com propriedades ansiolítica e antidepressiva.**

**Pedido de Registro de Patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnológica da Universidade Federal do Piauí.**



## RESUMO

### **“APLICAÇÕES DO FITOL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS COM PROPRIEDADES ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA”**

A presente invenção diz respeito às aplicações farmacêuticas do fitol, em produtos farmacêuticos como agente ansiolítico e antidepressivo. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao potencial ansiolítico e antidepressivo do fitol e a sua utilização na formulação de produtos farmacêuticos em diferentes formas farmacêuticas para a prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente ansiedade e depressão.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento agudo com fitol revelou uma  $DL_{50}$  de aproximadamente  $1153,39 \text{ mg kg}^{-1}$ . Os resultados indicam ausência de toxicidade aguda, uma vez que o fitol não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais em camundongos adultos. O fitol possui atividades psicofarmacológicas incluindo atividades sedativa e ansiolítica, esses efeitos podem ser mediados por transmissão GABAérgica. Este diterpenoíde apresenta atividade anticonvulsivante por modulação dos sistemas de neurotransmissores; No entanto, neste estudo não foi possível determinar os efeitos do fitol nos sistemas colinérgicos e GABAérgicos.

Foi realizado o depósito de pedido de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnológica (UFPI), como o número de registro de 000170.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA  
E TECNOLÓGICA**

- *Artigos Publicados*

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M.; SÁ, C.G.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H.C. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Die Pharmazie**, v. 66, p. 1-5, 2011.

SANTOS,P.S.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 65-71, 2011.

SILVA, F.O.; SILVA, M.G.V.; CERQUEIRA, G.S.; SABINO, E.B.; ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; FREITAS, R.M. Central Nervous System Effects of Iso-6-spectraline Isolated from *Senna Spectabilis* var. *Excelsa* (Schrad) in Mice. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, p. 226-231, 2011.

- *Artigos Aceitos*

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**, 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, W.M ; BENEDITO, R.B; PEREIRA, W.B; TORRES, P.A; RAMOS, C.F.A.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.M. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2012.

JÚNIOR, J.S.C.; ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; SAFFI, J.; FREITAS, R.M. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *P. insignis*. **Pharmaceutical Biology**, 2011.

- *Artigos Submetidos*

COSTA, J.P.; LOURENÇO, N.V.; SANTOS, C.C.M.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, G.F.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das

alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. Submetido à **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.

COSTA, J.P.; ALMEIDA, A.A.C.; SOUSA, D.P.; FENG, D; FREITAS, R.M. Efeito anticonvulsivante do fitol no modelo de pilocarpina em camundongos. Submetido à **Pharmacology Biochemistry and Behavior**.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; SOUSA, D.P.; FENG, D.; FERREIRA, P.M.N; FREITAS, R.M. Um possível mecanismo para os efeitos ansiolíticos do fitol: um composto natural. Submetido à **Neuroscience Letters**.

- *Depósito de pedido de patente*

COSTA, J.P.; SANTOS, C.C.M.P.; SOARES, M.F.R.; FORTES, A.C.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas com propriedades ansiolítica e antidepressiva - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de protocolo: 000170.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

COSTA, JP; COSTA, DA; LOURENÇO, NV; SANTOS, CCMP; TOMÉ, AR; SOUSA, GF; SOUSA, DP; ALMEIDA, RN; FREITAS, RM. **Avaliação da toxicidade aguda e das histopatológicas em camundongos tratados com fitol**. Apresentação Oral na Escola de Verão de Farmacognosia, realizado em Diamantina, MG, no período de 10 a 15 de fevereiro de 2012.

COSTA, J.P.; SANTOS, P.S.; SÁ, C.G.; CAMPELO, L.M.L.; FREITAS, R.M. **Estudo dos Efeitos Antioxidantes (Ácido Ascórbico e  $\alpha$ -Tocoferol) no Modelo de Convulsão Induzido por Pilocarpina**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

COSTA, J.P.; SANTOS, P.S.; CAMPELO, L.M.L.; FREITAS, R.M. **Efeitos da Ubiquinona na concentração de hidroperóxidos e atividades enzimáticas no Modelo de Convulsão Induzido por Pilocarpina**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SANTOS, P.S.; SOUSA, D.M.P.; ALMEIDA, A.A.C; CARDOSO, K.M.F; MARQUES, T.H.C ; COSTA, J.P.; LOPES, L.S ; FREITAS, R.M. **Delineamento farmacêutico de um possível fitoterápico: estudo da toxicidade aguda do óleo essencial de *Citrus limon***. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; COSTA, J.P.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. **Biosproteção do óleo essencial de *Citrus limon* com potencial anticonvulsivante**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SÁ, C.G.; CAMPELO, L.M.L.; COSTA, J.P.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. **Extrato etanólico de *C. limon*: perspectivas para biosproteção de compostos antidepressivos**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; COSTA, J.P.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. **Óleo essencial de *Citrus limon*: um potencial neuroprotetor contra danos neuronais**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SÁ, C.G.; CAMPELO, L.M.L.; COSTA, J.P.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. **O uso do Óleo essencial de *Citrus sinenses* em um possível tratamento do Mal de Alzheimer**. Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SANTOS, P.S.; SOUZA, G.F.; ALMEIDA, A.A.C.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. **Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol**. Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

COSTA, J.P.; SANTOS, P.S.; CAMPELO, L.M.L.; COSTA, D.A.; SABINO, E.B.; MORENO, L.C.G.I.; SILVA, O.A.; FREITAS, R.M. **Ubiquinone effects on**

**histopathological changes after pilocarpine-induced seizures.** Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

SABINO, E.B.; CAMPELO, L.M.L.; COSTA, D.A.; COSTA, J.P.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SOBRINHO, J.L.S.; FREITAS, R.M. **Anxiolytic-like effects of 5TIO1 in mice: open field and elevated plus maze tests.** Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

CAMPELO, L.M.L.; COSTA, J.P.; SABINO, E.B.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R. M. **Antinociceptive effects of essential oil from *Citrus limon*.** Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

# **ANEXOS**



**ANEXO A: Confirmação de submissão à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas  
Básica e Aplicada.**

## **FW: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão**

> To: rivelilson@pq.cnpq.br  
> Subject: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão  
> Date: Thu, 13 Oct 2011 17: 37: 59-0200  
> From: fcfarseer@gmail.com  
>  
> Rivelilson Mendes Freitas,  
>  
> Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Avaliação da toxicidade aguda  
> e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol" para  
> {\$Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada}.  
>  
> URL do Manuscrito:  
> [http://200.145.71.150/seer/index.php/Cien\\_Farm/author/submission/2036](http://200.145.71.150/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/2036)  
> Login: river  
>  
> Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:  
> [rcfba@fcfar.unesp.br](mailto:rcfba@fcfar.unesp.br).  
> Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir  
> ao público seu trabalho.  
>  
> {\$Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda}  
> {\$Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta}  
> {\$Editores}  
> Rivelilson Mendes de Freitas  
> Prof. Dr. Cleópatra da Silva Planeta  
> Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada  
> [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/index](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index)  
> [rcfba@fcfar.unesp.br](mailto:rcfba@fcfar.unesp.br)

## Editor handles PBB-D-12-00013

> From: marends@scripps.edu  
> To: rivmendes@hotmail.com  
> Date: Sun, 8 Jan 2012 18:17:17 +0000  
> Subject: Editor handles PBB-D-12-00013  
>  
> Ms. Ref. No.: PBB-D-12-00013  
> Title: A possible mechanism for anxiolytic effects of phytol: a natural compound  
> Pharmacology, Biochemistry and Behavior  
>  
> Dear Mr Rivelilson Mendes Freitas,  
>  
> Your submission entitled "A possible mechanism for anxiolytic effects of phytol: a natural compound" will be handled by Section Editor Guy Griebel.  
>  
> You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:  
>  
> <http://ees.elsevier.com/pbb/>  
> Your username is: river  
>  
> If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/PBB/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/PBB/automail_query.asp)  
>  
> Thank you for submitting your work to this journal.  
>  
> Kind regards,  
>  
> Pharmacology, Biochemistry and Behavior  
>  
> \*\*\*\*\*

## ANEXO C: Confirmação de submissão à Neuroscience Letters

### **FW: Neuroscience Letters Submission Confirmation**

> From: nsl@elsevier.com  
> To: rivmendes@hotmail.com  
> Date: Wed, 18 Jan 2012 02:15:21 +0000  
> Subject: Neuroscience Letters Submission Confirmation  
>  
> Dear Ph.D. Freitas,  
>  
> Your submission entitled "Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice" has been received for consideration in Neuroscience Letters.  
>  
> You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:  
> <http://ees.elsevier.com/nsl/>  
> Your username is: river  
> If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/nsl/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/nsl/automail_query.asp).  
>  
> Your paper will be given a manuscript number shortly and you will then receive an e-mail with this number for your reference.  
>  
> Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience Letters. Should you have any questions, please feel free to contact our office.  
>  
> Kind regards,  
>  
> Neuroscience Letters  
> Email: nsl@elsevier.com

**ANEXO D: Declaração do depósito de pedido de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnológica na Universidade Federal do Piauí.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA**  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10*  
*Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:12 horas do dia 09/12/2011, sob o número de Protocolo do INPI: 000170, o depósito de pedido de Patente de Invenção intitulada “**Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas com propriedades ansiolítica a antidepressiva**”, desenvolvida pelos inventores:

Rivelilson Mendes de Freitas

Jéssica Pereira Costa

Camila Carolina de Menezes Patrício Santos

Reinaldo Nóbrega de Almeida

Damião Pergentino de Sousa

Monica Felts de La Roca Soares

Amanda Campos Fortes

Dayane Alves da Costa

Teresina (PI), 09 de Dezembro de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Matia Rita de Moraes Chaves Santos', written over a horizontal line.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Matia Rita de Moraes Chaves Santos  
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

# APÊNDICES

**APÊNDICE A: Artigo submetido à Revista Pharmacology Biochemistry and Behavior.**

**A possible mechanism for anxiolytic effects of phytol: a natural compound**

Jéssica Pereira Costa<sup>a</sup>, Antônia Amanda Cardoso de Almeida<sup>a</sup>, Damião Pergentino de Sousa<sup>b</sup>,  
Dejiang Feng<sup>c</sup>, Rivelilson Mendes de Freitas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry of Post-Graduation Program in  
Pharmaceutics Science, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, PI, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe, 49.100-000, São Cristóvão, SE,  
Brazil.

<sup>c</sup>Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado at  
Boulder, Colorado 80309.

Author to whom correspondence should be sent:

\*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/Núcleo de Tecnologia  
Farmacêutica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, Ininga,  
Teresina, CEP 64.049-550, Piauí, Brazil. Phone/Fax: 55-86-3215-5870.

E-mail: [rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

## **Abstract**

Compounds isolated of essential oils from different members of the medicinal plant species are becoming relevant options for the treatment of neurodegenerative diseases. In particular, phytol presents a wide profile of putative therapeutical applications. Here, we report on the behavioral and pharmacological characterization of phytol, a diterpene, member of the fragrance structural group alcohols branched chain unsaturated. In the open-field test, phytol at the doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, after intraperitoneal administration, significantly decreased the number of crossings, grooming, and rearing. When given intraperitoneal, phytol dose-dependently increased the number of entries and the time spent in the open arms of an elevated plus maze and augmented the time spent light space during a light-dark test, indicating an anxiolytic-like effect. In the rota rod test, phytol changed motor coordination, as related to control. All these effects were reversed by the pre-treatment with flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), similarly to those observed with diazepam used as a positive standard. Our results suggest that phytol, has psychopharmacological activities including sedative and anxiolytic activities, and these effects may be mediated by GABAergic transmission.

**Keywords:** Anxiety; Elevated plus maze; Open-field; Phytol; Rota rod.

## **1. Introduction**

Anxiety disorders are considered the most common psychiatric disorders, affecting between 10-30% of the general population, which may cause losses in family, school and social (Wittchen and Hoyer, 2001; Silva and Leite, 2000).

Anxiety is a state of tension as a normal reaction to the moment it starts to cause suffering in the individual (Lent, 2004). There are several types of anxiety and in the last 45 years, the first-line pharmacological treatment of anxiety disorders is to benzodiazepines. However, despite the clinical efficacy, most drugs in this class has many problems, including sedation, muscle relaxation, anterograde amnesia, risk of accidents, vertigo, dysarthria and ataxia with falls (Rex et al., 2002; Mitte et al., 2005). In addition, chronic use can lead to physical dependence and withdrawal syndrome (Rabbani et al., 2008).

Given this information numerous research groups are looking for new forms of pharmacological treatment for anxiety that can replace the conventional ones. In addition, the search for new compounds more effective and safer, with less possibility of adverse reactions is extremely necessary as a large number of users to become dependent on chemical and physical. According to National System for Toxic-Pharmacological (Brazil, 2009), in Brazil, as in most countries, drugs are presented as the main toxic agent, accounting for approximately 27% of cases of human poisoning reported annually, and benzodiazepines drugs, a class of drugs that most poison in our country. Thus, several research groups have explored scientifically several species of medicinal plants both in terms of chemical and pharmacological compounds in the search for new anxiolytics (Sakellarides et al., 2008; Costa et al., 2011; Santos et al., 2012).

Among the medicinal plants, we highlight the different species of herbs that have been used medicinally because of its essential oils. Recent research shows that the vast majority of



biological activities can be attributed to monoterpenes, which are the main chemical components of these oils (Do Amaral et al., 2007; Costa-Souto et al., 2011). In the literature there are several studies that related the actions of monoterpenes on the Central Nervous System (Almeida et al., 2008; De Sousa et al., 2009; Guimarães et al., 2010).

Nevertheless, phytol yet not has been submitted to neuropharmacological evaluation. Since the whole phytol has shown sedative effects, it could be active on neuronal pathways related with psychiatric disorders, such as anxiety. The prevalence index of these diseases is increasing world-wide, in developed and developing countries. The World Health Organization estimates that the prevalence index of these diseases is around 0.1-16.9% (Demyttenaere et al., 2004). These data support investigations oriented to the isolation and identification of new natural products in search of alternative, more specific, and may be costless therapies, looking over natural new anxiolytic drugs (Marques et al., 2012).

Current studies on essential oils and their main components have attracted the attention of many researchers, in order to study their chemical and pharmacological aspects in order to provide subsidies for the development of new psychiatric drugs safer and more effective than currently available drugs (De Sousa, 2011). Thus, the aim of this study was to evaluate the possible anxiolytic effect of phytol in experimental models in adult mice, as well as to clarify their action mechanism responsible for anxiolytic action using the following models: open field, rota rod, elevated plus maze (plus maze) and light-dark.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Male Swiss (*Mus musculus*) albino mice (25-30 g), 2 months of age, from the Central Animal House of the Federal University of Piauí were used in these experiments. The animals

received water and food (Purina® pellets) *ad libitum* and were kept under controlled lighting (12 h dark/light cycle) and temperature ( $26 \pm 1$  °C). Behavioural experiments were conducted from 08:00 to 12:00 am. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Society Policy and was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee at the Federal University of Piauí (CEEAA/UFPI # 013/11).

## 2.2. Drug treatments

Phytol was emulsified with 0.05% Tween 80 (Sigma-USA) and dissolved in saline 0.09%. Animals were treated with the substance at doses of 25, 50 and 50 mg kg<sup>-1</sup>, intraperitoneally, 30 min before the experiments. Controls received vehicle (saline with 0.09% Tween 80) at the same volume (10 ml/kg) administered by the same route as the treated groups. Diazepam (DZP) mg kg<sup>-1</sup> (União Química/Brazil) and Flumazenil (FLU) 25 mg kg<sup>-1</sup> (União Química/Brazil), used as standards, were intraperitoneally injected after dissolution in distilled water.

## 2.3. Experimental protocol

The animals were tested during the light period and observed in a closed room with constant temperature ( $26 \pm 1$  °C). All tests were performed in different days with distinct groups of animals.

## 2.4. Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 × 30 × 15 cm) divided into nine squares of equal area. This apparatus was used to evaluate the exploratory activity of the animal for 5 min, based on the model described by Archer, 1973. The animals were divided into five groups of 7-10 animals each. The different groups were

treated with: vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, i.p.), phytol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment, the following parameters were observed: number of squares crossed with the four paws (spontaneous locomotor activity; ALE) number of grooming behavior (grooming) and the number of surveys (rearing), not lean against the wall, were observed during the time of 5 minutes. After each individual test session, the floor was cleaned using 70% ethanol to remove any traces left behind by the animals.

After this experimental procedure, we perform the evaluation of the possible participation of the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors in the effect of phytol on locomotor activity. For this purpose, three groups of seven male mice were pretreated with flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor, and after 15 minutes were treated with vehicle, doses evaluated in experimental substance, or diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment motor activity of animals was verified by an open field similar to the protocol performed previously.

### *2.5. Motor coordination test (Rota-rod test)*

A rota-rod tread mill device was used for the evaluation of motor coordination and muscle relaxation produced by drugs in animals (Carlini and Burgos, 1979). Mice, 7-10 per group, were divided in five groups and treated with: vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, i.p.), phytol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Thirty minutes after administration of treatments, mice were placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor a rotation of 17 rpm for a period of 3 minutes, for each animal. The time of permanence on the bar and the number of falls was measured with three renewals at most.

After this experimental procedure, we perform the evaluation of the possible participation of the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors in the effect of phytol on muscle relaxant. For this purpose, three groups of seven male mice were pretreated with flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor, and after 15 minutes were treated with vehicle, doses evaluated in experimental substance, or diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment the same parameters described above were analyzed.

#### *2.6. Elevated plus maze test (EPM)*

The purpose of this test was to verify the possible anxiolytic or anxiogenic substances, since anxiolytic drugs lead the animal to increase the number of entries and time spent in open arms, whereas anxiogenic drugs lead to the increase of these parameters in closed arms. Widely used experimental animal model of anxiety (Lister, 1987).

The elevated plus maze test for mice (Lister, 1987) consisted of two perpendicular open arms (30 × 5 cm) and two closed arms (30 × 5 × 25 cm) also in perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform (5×5 cm). For this test we used five groups of 7–10 animals each. The first group was treated with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, i.p.), the second group with diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and the other groups were treated with phytol at doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.). Thirty minutes after administration of treatments, the animal was placed at the center of the plus maze with its nose in the direction of one of the closed arms, and observed for 5 min. The parameters observed were: percentages of entries into open arms (PEOA), number of entries in the open arms (NEOA), time of permanence in open arms (TPOA) and percentage of time of permanence in the open arms (PTOA). After this experimental procedure, we perform the evaluation of the possible participation of the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors in the

anxiolytic effect of phytol. For this purpose, three groups of seven male mice were pretreated with flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor, and after 15 minutes were treated with vehicle, doses evaluated in experimental substance, or diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment the same parameters described above were analyzed.

### 2.7. *Light-dark box test*

Complementing the evaluation of the anxiolytic effect, we performed the light/dark test. This test used five groups with 7-10 mice per group. The groups were treated with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, i.p.), phytol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and diazepam (2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment, the animals were placed one at a time, the equipment described below. The apparatus used is made of acrylic divided into two compartments (box light and dark box) that communicate through a small door (Crawley, 1981). The dark box (black acrylic, 27 x 18 x 29 cm) is poorly lit. The box clear (transparent acrylic, 27 x 18 x 29 cm) is illuminated by ambient light. The animals were observed for 5 minutes and after each test the equipment was cleaned with 70% ethanol solution. The parameter used was the time spent in light box in seconds. A compartment entry was considered valid when the animal's four paws were inside that chamber. After this experimental procedure, we perform the evaluation of the possible participation of the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors in the anxiolytic effect of phytol. For this purpose, three groups of seven male mice were pretreated with flumazenil (FLU, 25 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor, and after 15 minutes were treated with vehicle, doses evaluated in experimental substance, or diazepam (DZP, 2 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). After 30 minutes of treatment the same parameters described above were analyzed.

## 2.8. Statistical analysis

All results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. The data obtained were evaluated using ANOVA followed by *t*-Student-Neuman-Keuls as *post hoc* test. Data were analyzed using the GraphPad Prism software (version 5.0) and experimental groups were compared with the vehicle group. P-values  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Open-field test

PHY, at the doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., showed sedative effects as assessed by the open-field test, in mice (Table 1). Significant effects were detected with the doses tested of PHY which produced similar percentages of inhibition (71, 70 and 69.5%, respectively) in the number of crossings ( $p < 0.01$ ), as related to controls. The number of rearings and groomings ( $p < 0.01$ ) were reduced with PHY 25, PHY 50 and PHY 75 mg kg<sup>-1</sup>, whose results were similar to those observed with diazepam, used as a positive control. Flumazenil was used for evaluating the possible mechanism of action of the sedative effect of PHY. For this, 15 min after the flumazenil injection, PHY (75 mg kg<sup>-1</sup>) was administered, and under these conditions the animals' behavior was similar to that of control, indicating that PHY presents a benzodiazepine-type of sedative effect.

**Table 1:** Effects of phytol in the open field test, in mice.

<b>Groups</b>	<b>Number of squares crossed</b>	<b>Number of Rearing</b>	<b>Number of Grooming</b>
<b>Vehicle</b>	99.13 ± 12.96	45.17 ± 3.85	4.67 ± 0.44
<b>DZP 2</b>	38.13 ± 2.36 <sup>a</sup>	13.13 ± 0.93 <sup>a</sup>	2.44 ± 0.41 <sup>a</sup>
<b>PHY 25</b>	28.89 ± 1.65 <sup>a</sup>	13.40 ± 0.69 <sup>a</sup>	2.75 ± 0.42 <sup>a</sup>
<b>PHY 50</b>	29.78 ± 1.81 <sup>a</sup>	13.35 ± 1.92 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.16 <sup>a</sup>
<b>PHY 75</b>	30.25 ± 1.88 <sup>a</sup>	12.93 ± 1.69 <sup>a</sup>	2.42 ± 0.26 <sup>a</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	100.9 ± 4.20	52.09 ± 2.41	5.27 ± 0.88
<b>FLU 25</b>	100.7 ± 1.71	51.18 ± 3.09	6.27 ± 0.52
<b>FLU 25 + PHY 75</b>	89.20 ± 2.75	41.40 ± 3.11	4.80 ± 0.37

Values are the mean ± S.E.M. for number of squares crossed, rearing and grooming of 7 mice (per group) used in the experiments. <sup>a</sup>p<0.01 (ANOVA followed by *t*-Student-Neuman-Keuls test as *post hoc* test), significantly different from control. PHY = phytol; DZP = diazepam.

### 3.2. Motor coordination test (rota-rod test)

In the rota rod test, used for evaluating motor coordination and presence of any muscle relaxation effect, there was no change after PHY administration (25 and 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), as compared to control (Table 2). Diazepam and PHY (75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) significantly impaired the rota-rod performance of mice. PHY 75 mg kg<sup>-1</sup> and diazepam 2 mg kg<sup>-1</sup> reduced the take-time to fall-down (p<0.01). Phytol-induced muscle relaxation was similar to diazepam (Table 2).

Flumazenil was used for evaluating the possible mechanism of action of the muscle relaxation effect of PHY. For this, 15 min after the flumazenil injection, PHY (75 mg kg<sup>-1</sup>) was administered, and under these conditions the animals' behavior was similar to that of controls, indicating that PHY involves benzodiazepine receptors in your muscle relaxant effect.

**Table 2:** Effects of phytol in the rota rod test in mice.

<b>Groups</b>	<b>Number of falls</b>	<b>Time of permanence (s)</b>
<b>Vehicle</b>	1.40 ± 0.25	178.7 ± 0.56
<b>DZP 2</b>	2.29 ± 0.47 <sup>a</sup>	171.0 ± 1.38 <sup>a</sup>
<b>PHY 25</b>	1.45 ± 0.47	178.9 ± 3.62
<b>PHY 50</b>	1.43 ± 0.63	178.6 ± 1.80
<b>PHY 75</b>	2.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	170.0 ± 3.72 <sup>a</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	1.45 ± 0.33	177.3 ± 0.67
<b>FLU 25</b>	1.50 ± 0.16	177.5 ± 0.65
<b>FLU 25 + PHY 75</b>	1.39 ± 0.51	178.5 ± 1.20

Values are the mean ± S.E.M. of number of falls and time of permanence for 7 mice (per group) used in the experiments. <sup>a</sup>p<0.01 (ANOVA followed by *t*-Student-Neuman-Keuls test as *post hoc* test), significantly different from control. PHY = phytol; DZP = diazepam.

### 3.3. Elevated plus maze test (EPM)

In the elevated plus-maze apparatus, used for evaluating anxiolytic-like effects, there was no change after PHY administration (25 and 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), as compared to control (Table 3). Intraperitoneal administration of phytol (75 mg kg<sup>-1</sup>) significantly increased the number of entries in the open arms and the percentage of entries into open arms, compared with that of vehicle treated group (p<0.01). In addition, there were significant increases in phytol treated group in the percentage of time spent in the open arms and in the time of permanence in the open arms (p<0.01). The effects of phytol are more potent than diazepam (Table 3).

On the other hand, in order to determine whether the anxiolytic-like effects of phytol are exerted via GABAergic systems, PHY treated mice were subjected to a co-treatment with



flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist. The anxiolytic-like effect of phytol was abolished by flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>) (Table 3).

**Table 3:** Effects of phytol on the plus maze test in mice.

<b>Groups</b>	<b>NEOA</b>	<b>PEOA</b>	<b>TPOA</b>	<b>PTOA</b>
<b>Vehicle</b>	10.67 ± 0.74	40.00 ± 2.25	122.5 ± 6.37	40.75 ± 2.16
<b>DZP 2</b>	15.71 ± 0.28 <sup>a</sup>	75.43 ± 2.08 <sup>a</sup>	208.4 ± 3.57 <sup>a</sup>	69.25 ± 1.26 <sup>a</sup>
<b>PHY 25</b>	10.67 ± 0.65	41.33 ± 7.36	123.3 ± 17.58	44.29 ± 5.85
<b>PHY 50</b>	10.37 ± 0.74	42.45 ± 5.60	124.3 ± 8.00	46.86 ± 2.75
<b>PHY 75</b>	18.97 ± 0.47 <sup>a,b</sup>	79.67 ± 2.82 <sup>a,b</sup>	220.4 ± 12.05 <sup>a,b</sup>	80.14 ± 4.00 <sup>a,b</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	11.71 ± 0.82	62.61 ± 1.49	156.0 ± 5.31	41.60 ± 1.71
<b>FLU 25</b>	10.42 ± 0.43	42.01 ± 1.57	121.6 ± 1.28	40.30 ± 1.43
<b>FLU 25 + PHY 75</b>	10.63 ± 0.66	39.92 ± 3.75	121.8 ± 4.67	41.40 ± 2.97

Each values represents mean ± S.E.M. of NEOA, number of entries in the open arms; PEOA, percentage of entries in the open arms; TPOA, time of permanence in the open arms; PTOA, percentage of time in the open arms. Values are the mean ± S.E.M. for 10 mice (per group) used in the experiments. <sup>a</sup>p<0.01 (ANOVA followed by *t*-Student-Neuman-Keuls test as *post hoc* test), significantly different from control. PHY = phytol; DZP = diazepam.

### 3.4. Light-dark box test

The administration of DZP significantly increased (p<0.01) the time spent by mice in the illuminated space. However, no changes were found in the number of entries into this place after treatment with phytol at doses 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.) (p>0.05). In this model, the administration of phytol (75 mg kg<sup>-1</sup>) significantly increased the time spent by mice in the illuminated compartment. This effect was dose dependent and statistically different when compared with the control group, as depicted in Table 4 (p<0.01). The effects of phytol (75 mg kg<sup>-1</sup>) are more potent than diazepam (Table 4). On the other hand, in order to determine

whether the effects of phytol on time spent light space are exerted via GABAergic systems, PHY treated mice were subjected to a co-treatment with flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist. The effect of phytol on time spent light space was abolished by flumazenil (25 mg kg<sup>-1</sup>) (Table 4).

**Table 4:** Effects of phytol on the light-dark test in mice.

<b>Groups</b>	<b>Time spent light space (s)</b>
<b>Vehicle</b>	104.2 ± 3.98
<b>DZP 2</b>	158.1 ± 2.86 <sup>a</sup>
<b>PHY 25</b>	111.2 ± 8.80 <sup>a</sup>
<b>PHY 50</b>	115.6 ± 11.26 <sup>a</sup>
<b>PHY 75</b>	173.8 ± 5.31 <sup>a,b</sup>
<b>FLU 25 + DZP 2</b>	101.3 ± 2.00
<b>FLU 25</b>	106.5 ± 0.65
<b>FLU 25 + PHY 75</b>	105.8 ± 4.51

Values are the mean ± S.E.M. of time spent light space (s) for 7 mice (per group) used in the experiments. <sup>a</sup>p<0.01 (ANOVA followed by *t*-Student-Neuman-Keuls test as *post hoc* test), significantly different from control. PHY = phytol; DZP = diazepam.

#### 4. Discussion

The phytol (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol) is a diterpene belonging to the group of acyclic unsaturated alcohols and long chain branched. In previous studies, we report on the determination of pre-liminary acute toxicity indicated LD<sub>50</sub> values of 1153.39 mg kg<sup>-1</sup> for male mice. In this paper, we evaluated the behavioral effects of phytol using lower doses.

We found that phytol reduces locomotor activity and has sedative and anxiolytic effects in mice.

In this study, the effects of phytol were examined in animal models of anxiety using tests such as the elevated plus-maze, open field, rota rod and light-dark, which are classic models for screening central nervous system activity and providing information about anxiety, sedation and myorelaxant activity (Silva et al., 2007; De Melo et al., 2005).

Anxiety disorders can be characterized by excessive fear and avoid later normally in response to a specified object or situation and the absence of truth danger. Anxiety disorders have the highest overall prevalence rate of psychiatric disorders, with 12 months and lifetime rates of 18.1% and 28.8%, respectively. Anxiety also is a major public health problem, present a significant economic burden, and associated functional disabilities have a substantial negative impact on quality of life (Kessler et al., 2005; Deacon et al., 2010). In the present work, a clear anxiolytic-like activity of phytol has been showed. This diterpene was able to increase significantly the time spent and number of entries of mice in the aversive spaces of the plus-maze and light-dark tests; these results indicate anxiolytic activity comparable with that produced by diazepam, the standard anxiolytic drug. In the case of light-dark test, this effect showed a dose-dependent behavior, indicating that phytol has an anxiolytic-like effect.

Phytol showed anxiolytic-like effects when evaluated in the elevated plus maze. Anxiety, a symptom accompanying various central nervous system disorders and a disorder by itself, is characterized in humans by a tense and exhaustive physical alertness (Jackson and Turkington, 2005). Other species display a variety of defensive reactions in response to predators, some understood as correlated states of anxiety (Rodgers et al., 1995). Rodents exhibit anxiety, fear and curiosity when placed in a new environment, and an overall assessment of behavior could be determined through the observation of freezing, grooming, rearing, head-dips and the number of fecal boluses (Takeda et al., 1998; Nic et al., 2003;

Costa-Campos et al., 2004). The elevated plus maze has been frequently used to detect and evaluate anxiolytic/anxiogenic properties of drugs (Takeda et al., 1998; Pellow and File, 1986; Pellow and File, 1987). Mice generally taken from their home cages will show a pattern of behaviour characterized by open-arm avoidance with a consistent preference for the closed arms. The rank order preference profile is closed > centre > open, indicative of a penchant for relatively secured sections of the maze. This tendency is suppressed by anxiolytics and potentiated by anxiogenic agents (Bourin et al., 2007). The frequency and time spent in the open arms is the major index of the anxiety in the plus-maze model, given the fact that an open area is extremely aversive to rodents (Pellow and File, 1986).

Phytol dose-dependently increased the percentage of open-arms entries and the time spent in those arms. These results suggest that, when given i.p., this diterpene has an anxiolytic-like effect. The reduction in the number of rearings and crossings in the open field test confirms the central activity of phytol, since it is conceded that rearing is a function of the excitability level of the central nervous system (Masur et al., 1971).

To complement the possible anxiolytic effects of phytol, the test box light-dark was also performed. This test is based on the innate aversion of rodents to brightly lit areas and on their spontaneous exploratory behavior in response to a novel environment and to light (Pultrini et al., 2006). After anxiolytic (BDZ) drug treatment, the apparent apprehension of remaining in or moving to the light area is abolished. Since then the test box light-dark test has been widely adopted as an anxiolytic screening test in mice (Costall et al., 1989). Our results indicate that phytol may act on the BDZ site of the GABA receptor in the brain of the mice. Thus, the anxiolytic and sedative effects of phytol could be caused by its combined action on several neurotransmitter receptor systems, including GABA<sub>A</sub> receptors (Silva et al., 2006).

The open field test was used to evaluate the exploratory activity of the animal. This was related through more central zone visitations by phytol-treated animals during the 30 min

before test. From the results of the open field test, we found that the percentages of distance traveled in the central zone and time spent in the central zone were increased by the treatment of phytol or diazepam, indicating the exploratory effect of phytol treatment, similar to the effect shown by diazepam.

Diazepam has been used as a standard anxiolytic and also has been frequently employed in behavioral pharmacology as a reference compound for potentially anxiolytic-acting substances (Herrera-Ruiz et al., 2006). In our preliminary analysis on anxiolytic effects of phytol, we found it was more effective in light-dark test than plus maze test, so was the effect of diazepam, it seems that the method of light-dark test is more sensitive than plus-maze test in evaluation of anxiolytic effects. At the same time, however, typical GABA/benzodiazepine receptor agonists, such as diazepam, have side effects including muscle relaxation and depressive mood (Hertz et al., 2006). Similar to diazepam, phytol showed anxiolytic-like effects without affecting locomotor activity at lower doses, indicating that the diterpene exerts anxiolytic-like and sedative effects.

Sedative and anxiolytic drugs, such as benzodiazepines, facilitate the action of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) upon the GABA<sub>A</sub> receptor. Benzodiazepines have affinity for the GABA<sub>A</sub> subtype, which is the largest system of neuronal inhibition in the CNS. They act on these receptors enhancing the inhibitory effect of GABA and CNS depressants consist of more widely prescribed (Lilly and Tietze, 2000). Clinically, these substances are widely used as sedative and anxiolytic drugs and agree with studies in animal models (Imamura and Prasad, 1998), such as plus-maze and light-dark tests, where the effects of DZP are highly reproducible (Pellow et al., 1985). Based on these findings, it could be supposed that phytol is able to reduce the anxiety of animals exposed to these paradigms through an action mechanism similar to that of the benzodiazepines (Treit, 1985).

Flumazenil reversed not only the diazepam effect but also the phytol effect, indicating that both drugs might present a similar mechanism of action. Our results give support to the idea that phytol interacts with the GABA<sub>A</sub> receptor, probably at the receptor subtypes that mediate benzodiazepines effects, to produce sedative and anxiolytic activities. Additional studies, however, are needed to fully clarify the mechanism of anxiolytic effect of phytol. Furthermore, phytol could manifest these effects at doses not showing either sedative activity, being thus potentially useful in clinical practice.

### **Acknowledgments**

We would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq/Brazil) [grant number 503354/2009-0] and the Research Supporting Foundation of State of Piauí (FAPEPI/Brazil), fellows of RMF, AACA and DPS from CNPq, fellows of JPC from CAPES and Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (UFPI, Department of Biological Sciences, Picos, Piauí) for his help with English editing of the manuscript.

### **References**

- Almeida RN, De Sousa DP, Nóbrega FF, Claudino FS, Araújo DAM, Leite JR, Mattei R. Anticonvulsant effect of a natural compound  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. *Neurosci. Lett* 2008;443:51-55.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim. Behav* 1973;21:205-35.
- Brasil. Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Informação Científica e Tecnológica / Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, 2009. Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento. Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

- Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascoet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:567-74.
- Carlini EA, Burgos V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. *Rev Assoc Bras Psiquiatr* 1979;1:25-31.
- Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M, Elisabetsky E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:481-9.
- Costa M, Flório JC, Gargano AC, De Lima VM, Kohn DO, Costa CARA. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemon grass). *J Ethnopharmacol* 2011;137:828-36.
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:777-85.
- Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15:695-9.
- Deacon BJ, Cisler JM, Olatunji BO. Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy for Anxiety Disorders: A Review of Meta-Analytic Findings. *Psychiatr Clin N Am* 2010;33:557-77.
- Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, et al. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA* 2004;291:2581-90.
- De Melo CT, Monteiro AP, Leite CP, de Araújo FL, Lima VT, Barbosa-Filho JM. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biol Pharm Bull* 2005;29:451-4.
- De Sousa DP. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules* 2011;16:2233-52.

- De Sousa FCF, Silva MIG, Silva MAG, De Aquino MRN, Moura BA, De Sousa HL, et al. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia* 2009;80:506-13.
- Do Amaral JF, Silva MIG, Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, Melo CTV, et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. *Biol Pharmaceut Bull* 2007;30:1217-20.
- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SCH, Antonioli AR, Bonjardim LR, et al. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 2010;107:949-57.
- Herrera-Ruiz M, Jimenez-Ferrer JE, De Lima TCM, Aviles-Montes D, Perez-García D, Gonzalez-Cortazar M, et al. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine* 2006;13:23-8.
- Hertz L, Zhao Z, Chen Y. The Astrocytic GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepine-Like Receptor: The Joker Receptor for Benzodiazepine-Mimetic Drugs? *Recent Pat CNS Drug Discov* 2006;1:93-103.
- Imamura M, Prasad C. Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. *Physiol Behav* 1998;64:415-17.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters, EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:593-602.
- Lilly SM, Tietz EI. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions q Relationship to GABA receptor subunit expression A. *Brain Res* 2000;882:139-48.
- Lister RG. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;25:180-5.



- Jackson MJ, Turkington D. Depression and anxiety in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:45-7.
- Lent R. Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos Fundamentais de Neurociências. Editora Atheneu. 2004; 651-68.
- Marques THC, Melo CHS, Freitas RM. Evaluation antioxidant activity *in vitro* and anxiolytic- and antidepressant-like of the ethanolic extract from *Bellis perennis*. *Rev Bras Farmacogn* 2012; *in press*.
- Masur J, Martz RMW, Carlini EA. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-)  $\alpha$ 9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. *Psychopharmacology* 1971;19:338-97.
- Mitte K, Noack P, Steil R, Hautzinger M. A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2005;25:141-50.
- Nic DBA, Bourin M, Hascoet M. Anxiolytic-like effects of 5-HT<sub>2</sub> ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 2003;140:203-14.
- Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:525-9.
- Pellow S, File SE. Lack of cross-tolerance in mice between the stimulatory and depressant actions of novel anxiolytics in the holeboard. *Behav Brain Res* 1987;23:159-66.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985;14:149-67.
- Pultrini AM, Galindo LA, Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci* 2006;78:1720-5.
- Rabbani M, Sajjadi SE, Mohammadi A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. *eCAM* 2008;5:181-6.

- Rex A, Morgenstern E, Finka H. Anxiolytic-like effects of Kava-Kava in the elevated plus maze test-a comparison with diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:855-60.
- Rodgers RJ, Cole JC, Aboualfa K, Stephenson LH. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:805-13.
- Sakellaridis N, Tarantilis PA, Georgiadou G, Boultadakis A, Pitsikas N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine* 2008;15:1135-9.
- Santos FJB, Lima SG, GS Cerqueira, AMGL Citó, AACM Cavalcante, Marques THC, et al. Chemical composition, anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platypetala*. *Rev Bras Farmacogn* 2012; *in press*.
- Silva AFS, Andrade JP, Bevilaqua LRM, Souza MM, Izquierdo I, Henriques AT, et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:148-54.
- Silva FT, Leite JR. Physiological modifications and increase in state anxiety in volunteers submitted to the Stroop Color-Word Interference Test: A preliminary study. *Physiol & Behav* 2000;70:113-8.
- Silva MI, Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, Amaral JF, Sousa DP. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;88:141-7.
- Souto-Maior, FN, De Carvalho FL, De Morais, LCSL, Netto SM, De Sousa DP, Almeida RN. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;100:259-63.

- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;350:21-9.
- Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 1985;9:203-22.
- Wittchen HU, Hoyer J. Generalized anxiety disorder: nature and course. *J Clin Psychiatry* 2001;62:15-21.

**APÊNDICE B: Artigo submetido à Revista Neuroscience letters.**

**Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice**

J.P. Costa, P.B. Ferreira<sup>1</sup>, D.P. Sousa<sup>2</sup>, D. Feng<sup>3</sup>, P.M.P. Ferreira<sup>1</sup>, R.M. Freitas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry of Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science, Federal University of Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado at Boulder, Colorado 80309.

Author to whom correspondence should be sent:

\*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/Núcleo de Tecnologia Farmacêutica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, Ininga, Teresina, CEP 64.049-550, Piauí, Brazil. Phone/Fax: 55-86-3215-5870.

E-mail: [rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

## **Abstract**

Epilepsy is one of the most common, serious neurological conditions, affecting more than 50 million people worldwide. It remains a continuing health concern despite the increasing availability of newer anticonvulsant drugs. Therefore, the present study investigated the effects of phytol in pilocarpine-induced seizures. The latency for development of convulsions and mortality rate was recorded in this model using mice. The results revealed that in pilocarpine-induced seizures model, phytol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) increased latency to first seizure and decreased the percentage of these seizures. Moreover, these doses of phytol also protected mice against status epilepticus induced by pilocarpine and decreased the mortality rate. In addition, none of phytol effects in the pilocarpine model were blocked by atropine pretreatment, an antagonist of muscarinic receptors. And none of these effects also were reversed by flumazenil, an antagonist of benzodiazepine receptors. It is suggested, phytol has anticonvulsant activity by modulation of neurotransmitter cholinergic and GABAergic systems that need to be investigated, indicating that this diterpene may find clinical application in the treatment of human epilepsy.

**Keywords:** anticonvulsant; mice; seizures; phytol; pilocarpine.

Epilepsy, a common chronic neurological disorder characterized by recurrent spontaneous seizures, is a major health problem that affects 1-2% of the world population [26]. Although seizures in two-thirds of patients can be successfully controlled with anticonvulsant medications, the remaining one-third remains refractory to medical therapy [27]. This fact has stimulated a considerable research for new antiepileptic drugs with higher safety and efficacy than the currently available anticonvulsants. In this regard, medicinal plants have been an important source to the development of new drugs isolated from natural products with anticonvulsant activity [9].

Interestingly, in the last years, a growing body of evidence related that natural products from folk remedies have contributed significantly in the discovery of modern drugs worldwide. Additionally, numerous herbal medicines are active on the central nervous system (CNS), and they have at least a hypothetical potential to affect chronic conditions such as epilepsy that do not respond well to conventional treatments [8,9,11,29].

The search for the treatment of epilepsy has been a constant concern. The need for introduction of new drugs in the treatment of this pathology is essential for the treatment or enhancement of this, always seeking greater safety and efficacy. The search for less toxic alternatives resulted in decreased use of combinations of medicinal plants, and the introduction of substances isolated and/or synthetic in the therapeutics. This notion is supported by previous studies that showed that some monoterpenes present in several essential oils possess anticonvulsant activity in animal experiments, such as thymoquinone [22], citronellol [33], alpha-terpineol [13],  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone [12] and isopulegol [32].

Among the monoterpenes, the phytol is chemically defined as 3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol (Fig. 1). Phytol is a fragrance ingredient used in many fragrance compounds. It may be found in fragrances used in decorative cosmetics, fine fragrances, shampoos, toilet soaps and other toiletries as well as in non-cosmetic products such as

household cleaners and detergents. Its use worldwide is in the region of 0.1-1.0 metric tons per annum [14]. Phytol is a member of the fragrance structural group alcohols branched chain unsaturated. Their common characteristic structural elements are one hydroxyl group per molecule, a C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub> carbon chain with one or several methyl or ethyl side chains and up to four non-conjugated double bonds [4]. However, the effects of this monoterpene on central nervous system have not yet been studied. Thus, the objective of this study was to evaluate the anticonvulsant activity of phytol and to characterize its action mechanism on pilocarpine-induced seizures.

The drugs used flumazenil (FLU), phytol (PHY), pilocarpine hydrochloride (P400), polyoxyethylene-sorbitan monolated (Tween 80) were purchased from Sigma Chemical Co. St. Louis, M., (USA) and diazepam (DZP) from Cristália (Brazil). The dosage of all drugs was expressed at milligrams per kilogram of body weight. Agents were administrated by intraperitoneal (i.p.) route at a dose volume of 0.1 ml/10 g.

Adult male Swiss mice (25-30 g; 2 months old) were maintained in a temperature controlled room ( $26 \pm 1$  °C) with a 12-h light/dark cycle (light from 0800 to 1200 h), with food and water *ad libitum* (Nutrilabor, Campinas, Brazil). All experiments were performed according to the guide for the care and use of laboratory the US Department of Health and Human Services, Washington, DC [37]. Experimental protocols and procedures were approved by the Ethics Committe on Animal Experiments at the Federal University of Piaui (CEEAA/UFPI # 013/11).

Mice were divided into five groups (n=24). The first group served as control and received vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline), and the second group was treated with pilocarpine hydrochloride (400 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). The remaining groups received an injection of phytol (PHY) at doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>. Thirty minutes after drug administration, the mice were treated with pilocarpine (i.p.) at a dose of 400 mg kg<sup>-1</sup> and

observed for at least 1 h to detect the latency to the first seizure, the latency to status epilepticus, the occurrence of wild running, clonuses, tonus, clonic-tonic seizures, the number of animals that seized and number of animals that died after P400 administration [19].

In another series of experiments, 30 min after treatment with vehicle, 75 mg kg<sup>-1</sup> of PHY and 25 mg kg<sup>-1</sup> of atropine, mice (n=24) received pilocarpine (i.p.) at a dose of 400 mg kg<sup>-1</sup> and observed for at least 1 h to detect the latency to the first seizure, the latency to status epilepticus, the occurrence of wild running, clonuses, tonus, clonic-tonic seizures, the number of seized animals and the number of animals that died after pilocarpine administration. Atropine (25 mg kg<sup>-1</sup>), PHY (75 mg kg<sup>-1</sup>) and atropine (25 mg kg<sup>-1</sup>) + PHY (75 mg kg<sup>-1</sup>) were used as reference drugs.

Atropine, a non-selective muscarinic receptor antagonist [1], was administered in one group of twelve mice, 15 min before PHY treatment. Forty-five minutes after the last treatment each animal was injected with pilocarpine. The latency to first seizure, the latency to status epilepticus, the number of animals that seized and number of animals that died were the parameters recorded.

In another series of experiments, 30 min after treatment with vehicle, 75 mg kg<sup>-1</sup> of PHY, 5 mg kg<sup>-1</sup> of diazepam and 25 mg kg<sup>-1</sup> of flumazenil (FLU), mice (n=12) received pilocarpine (i.p.) at a dose of 400 mg kg<sup>-1</sup> and observed for at least 1 h to detect the latency to the first seizure, the latency to status epilepticus, the occurrence of wild running, clonuses, tonus, clonic-tonic seizures, the number of animals that seized and number of animals that died after pilocarpine administration. Diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>) and FLU (25 mg kg<sup>-1</sup>) were used as reference drugs.

FLU, a selective GABA<sub>A</sub>-BZD receptor antagonist [5,6,15,16], was administered in two groups of mice each, 15 min before diazepam or PHY treatments. Thirty minutes after the last treatment each animal was injected with pilocarpine. The latency to first seizure, the



number of animals showing convulsions, latency to installation of the status epilepticus, and number of animals that died were the parameters recorded.

Results of latency to first seizure and status epilepticus were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *t*-Student-Newman-Keuls as *post hoc* test, because these results show a parametric distribution. The number of animals that seized and the number that survived were calculated as percentages (seizures percentage and survival percentage, respectively), and compared with a nonparametric test ( $\chi^2$ ). In both situations statistical significance was reached at *p* less-than-or-equals, slant 0.05. The statistical analyses were performed with the software GraphPad Prism, Version 5.00 for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

After 3-5 min following pilocarpine administration, all the animals showed peripheral cholinergic signs (miosis, piloerection, chromodacriorrhea, diarrhea, masticatory), and stereotyped movements (continuous sniffing, paw licking and rearing) followed by motor limbic seizures in 100% (24/24) of the tested animals (*p*<0.001). The convulsive process persisted and built up to a status epilepticus in 100% (24/24) of these mice, leading to death of all animals (*p*<0.001) (Table 1). All animals pretreated with the phytol selected for this study were observed for 1 h after pilocarpine injection and its manifested alterations in behavior, such as peripheral cholinergic signs, tremors, staring spells, facial automatisms, wet do shakes and rearing.

Phytol administration, 30 min before pilocarpine, significantly caused a dose-dependent protection against pilocarpine-induced seizures and status epilepticus, 25 (58.34%; *p*<0.001), 50 (66.67%; *p*<0.001) and 75 mg kg<sup>-1</sup> (83.34%; *p*<0.001) (Table 1). In addition, phytol significantly caused a dose-dependent protection against mortality rate induced by pilocarpine (Table 1). A clear protector effect against seizures and mortality rate also was

observed with atropine (25 mg kg<sup>-1</sup>) and diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>) used as references drugs (Tables 2 and 3).

Pilocarpine induced the first seizure at  $7.90 \pm 1.68$  min and status epilepticus at  $14.95 \pm 1.57$  min. According table 1, phytol caused an increased of latency to the first seizure induced by P400 at doses of 25 ( $19.10 \pm 3.83$  min), 50 ( $24.25 \pm 5.17$  min) or 75 mg kg<sup>-1</sup> ( $27.50 \pm 6.36$  min) compared with pilocarpine group ( $7.90 \pm 1.68$  min,  $p < 0.001$ ). In addition, phytol produced in a dose-dependent way, an increase of latency to installation of status epilepticus induced pilocarpine at doses of 25 ( $29.20 \pm 3.75$  min), 50 ( $34.10 \pm 3.46$  min) or 75 mg kg<sup>-1</sup> ( $37.50 \pm 4.50$  min) compared with pilocarpine group ( $14.95 \pm 1.57$  min,  $p < 0.001$ ).

However, the dose of 75 mg kg<sup>-1</sup>, selected to the following analyses of action mechanism, showed a higher increase in the seizure's latency compared to the other concentrations ( $p < 0.001$ ). It protected 83.34% (10/12) of the animals against seizures; reduced the occurrence of status epilepticus in 83.34% (10/12); increased the status epileptic's latency by 151% and protected 83.34% (10/12) from death as compared to pilocarpine (Table 1).

Table 1

Effects of phytol on pilocarpine-induced seizures in and lethality in adult mice

<i>Groups</i>	<i>Latency to first seizures (min)</i>	<i>%Seizures</i>	<i>Latency to Status epilepticus (min)</i>	<i>% Survival</i>	<i>N</i>
P400	7.90 ± 1.68	100	14.95 ± 1.57	00	24
PHY 25 + P400	19.10 ± 3.83 <sup>a</sup>	41.66 <sup>d</sup>	29.20 ± 3.75 <sup>a</sup>	58.34 <sup>d</sup>	24
PHY 50 + P400	24.25 ± 5.17 <sup>a,b</sup>	33.33 <sup>d,e</sup>	34.10 ± 3.46 <sup>a,b</sup>	66.67 <sup>d,e</sup>	24
PHY 75 + P400	27.50 ± 6.36 <sup>a,b,c</sup>	16.66 <sup>d,e,f</sup>	37.50 ± 4.50 <sup>a,b,c</sup>	83.34 <sup>d,e,f</sup>	24

Results for latency to first seizure and latency to status epilepticus were expressed as mean ± S.E.M of the number of experiments shown in the table. Result for percentage seizures and percentage survival were expressed as percentages of the number of animals from each experimental group. <sup>a</sup>p<0.05 as compared with P400 group; <sup>b</sup>p<0.05 as compared with PHY 25 + P400 group; <sup>c</sup>p<0.05 as compared with PHY 50 + P400 group (ANOVA and *t*-Student-Newman-Keuls as *post hoc* test); <sup>d</sup>p<0.05 as compared with P400 group; <sup>e</sup>p<0.05 as compared with PHY 25 + P400; <sup>f</sup>p<0.05 as compared with PHY 50 + P400 group ( $\chi^2$ -test). N = Number of animals per group.

Atropine was used for evaluating the possible mechanism of action of the anticonvulsant effect of phytol. For this, 15 min after the atropine injection, phytol (75 mg kg<sup>-1</sup>) was administered, and under these conditions the animals' behavior was similar to that of atropine plus pilocarpine, indicating that phytol not presents a muscarinic-type of anticonvulsant effect (Table 2).

Table 2

Effects of phytol on pilocarpine-induced seizures in and lethality in adult mice

<i>Groups</i>	<i>Latency to first seizures (min)</i>	<i>%Seizures</i>	<i>Latency to Status epilepticus (min)</i>	<i>% Survival</i>	<i>N</i>
P400	7.90 ± 1.68	100	14.95 ± 1.57	00	24
ATR 25	00	00	00	100	24
ATR 25 + P400	00 <sup>a</sup>	00 <sup>b</sup>	00 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	24
PHY 75 + P400	27.50 ± 6.36 <sup>a</sup>	16.66 <sup>b</sup>	37.50 ± 4.50 <sup>a</sup>	83.33 <sup>b</sup>	24
PHY 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + PHY 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + PHY 75 + P400	00	00	00	100	24

Results for latency to first seizure and latency to status epilepticus were expressed as mean ± S.E.M of the number of experiments shown in the table. Result for percentage seizures and percentage survival were expressed as percentages of the number of animals from each experimental group. <sup>a</sup>p<0.05 as compared with P400 group (ANOVA and *t*-Student-Newman-Keuls as *post hoc* test); <sup>b</sup>p<0.05 as compared with P400 group ( $\chi^2$ -test). N = Number of animals per group.

The anticonvulsant effects of phytol are more potent than diazepam (Table 3). On the other hand, in order to determine whether the anticonvulsant effects of phytol are exerted via GABAergic systems, phytol-treated mice were subjected to a co-treatment with flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist. However, the presence of flumazenil did not revert the anticonvulsant effect of phytol, but blocked the effect of diazepam (Table 3). No animals that received injections of 0.05% Tween dissolved in 0.9% saline (control), atropine, flumazenil, diazepam and phytol alone presented seizure activity.

Table 3

Effect of pretreatment with phytol on pilocarpine-induced seizures and lethality in adult mice

<i>Groups</i>	<i>Latency to first seizures (min)</i>	<i>%Seizures</i>	<i>Latency to Status epilepticus (min)</i>	<i>% Survival</i>	<i>N</i>
P400	7.90 ± 1.68	100	14.95 ± 1.57	00	24
DZP 5	00	00	00	100	24
DZP 5 + P400	15.40 ± 3.50 <sup>a</sup>	25 <sup>d</sup>	23.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	75 <sup>d</sup>	24
PHY 75 + P400	27.50 ± 6.36 <sup>a</sup>	16.66 <sup>d</sup>	37.50 ± 4.50 <sup>a</sup>	83.33 <sup>d</sup>	24
FLU 25	00	00	00	100	24
FLU 25 + P400	7.92 ± 0.57	100	14.91 ± 0.57	00	24
FLU 25 + DZP 5 + P400	7.89 ± 0.59 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	14.88 ± 0.43 <sup>b</sup>	00 <sup>c</sup>	24
FLU 25 + PHY 75 + P400	27.42 ± 1.94	16.66	37.45 ± 0.85	83.33	24

Results for latency to first seizure and latency to status epilepticus were expressed as mean ± S.E.M of the number of experiments shown in the table. Result for percentage seizures and percentage survival were expressed as percentages of the number of animals from each experimental group. <sup>a</sup>p<0.05 as compared with P400 group; <sup>b</sup>p<0.05 as compared with DZP 5 + P400 group; <sup>c</sup>p<0.05 as compared with PHY 75 + P400 group (ANOVA and *t*-Student-Newman-Keuls as *post hoc* test); <sup>d</sup>p<0.05 as compared with P400 group; <sup>e</sup>p<0.05 as compared with DZP 5 + P400 ( $\chi^2$ -test). N = Number of animals per group.

The epilepsies are a group of clinical syndromes affecting more than 50 million people worldwide [28]. The pilocarpine model is a useful animal model to investigate the development of neuropathology of seizures and temporal lobe epilepsy [10,17,23]. In this model, the initial precipitating injury is characterized by a prolonged status epilepticus (SE), which causes neuronal loss, gliosis, and typical vacuolar degeneration in the pilocarpine-treated rat hippocampus region [30,31].

Although the mechanism of pilocarpine-induced seizures and SE is not completely understood, it is known that it depends on muscarinic activation and also of alterations in choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) activities in rat hippocampus [20]. Following the toxicity induced by an initial cholinergic phase, a distinct non-cholinergic phase occurs, in which excessive production of  $H_2O_2$ , released during the  $O_2^-$  dismutation can inhibit the superoxide dismutase during this phase of seizures induced by pilocarpine [35].

A high percentage of patients with epilepsy have some comorbidity, and this is an important factor when selecting the most suitable antiepileptic drug. Although the level of scientific evidence concerning epilepsy treatment in patients with other associated diseases is low and rarely supported by clinical trials, there is a need for evaluating available data that support the use of certain antiepileptic drugs in the presence of specific diseases. Thus, this information reinforces the interest in our study that presents an important clinical interest, since we're looking for new ways to treat epilepsy probably with fewer side effects and antioxidant activity capable of reducing oxidative stress-induced seizures in this model.

Pilocarpine-induced seizures produces various dysfunctions in many brain regions (e.g., hippocampus, striatum, frontal cortex others [18]) as a consequence of disruption of neuronal connections between brain regions. The behavioral changes during seizures in rats

have been widely reported. These behaviors are quantifiable replicable and reversed by acute administration of antiepileptic and antioxidants compounds [27,38].

In the present work, the anticonvulsant effects of phytol were studied. Phytol was firstly evaluated in behavioral study which gives a good indication in reduction of seizures' mortality rate. The results showed that phytol was able to significantly decrease the mortality rate after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine.

The phytol is a branched chain fatty acid, which is part of the chlorophyll molecule in fruits and vegetables [34]. The phytol derivatives may activate nuclear hormone receptors and influence gene expression and cell differentiation [7,21,25]. These pharmacological effects attributed to phytol can be responsible by control of neuronal function, influencing neurotransmitter systems and modulating the release and/or synthesis of inhibitory neurotransmitters related to seizure process. Our results confirm the phytol anticonvulsant activity on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus, as revealed by increases in latency to the onset of seizures, in latency of status epilepticus, but also by seizures' mortality rate reduction.

Surprisingly, the combined results related that phytol inhibited the action of pilocarpine, and protected the mice against death induced by seizures. This feature may be of interest when one thinks in a good candidate for a drug designed to cause neuroprotection in response to seizures induced by pilocarpine. The current developments in the availability of new anticonvulsant drug require the appropriate choice of animal models of epilepsy for the identification of anticonvulsant activity as well as new mechanisms of action. Therefore, seizure models in laboratory animals are still the most important prerequisite in preclinical search for new anticonvulsant drugs [24].

The pilocarpine model procedure is of predictive relevance regarding the clinical spectrum activity of the test compounds [3,27]. Furthermore, pilocarpine model assumed to

identify the efficacy of anticonvulsant drugs [2,38]. Results from the present study show that phytol may be effective in blocking generalized tonic-clonic generalized seizures. On the other hand, the genesis of the seizures originated due to pilocarpine action involves the agonistic effect of this drug in muscarinic receptors which would reduce the inhibitory synaptic transmission to promote excitatory neurotransmission [36]. As reported here phytol confers protection against seizures induced by pilocarpine. However, our results suggest that the action mechanism of phytol cannot likely to involve GABAergic and muscarinic receptors, since antagonists of these systems when used in combination with phytol in the treatment of animals before pilocarpine no significant difference between the treated groups only with phytol. Therefore, it is reasonable to suggest that the anticonvulsant activity exerted by phytol may not be associated to modulatory effects on muscarinic and GABAergic systems. Whether phytol activates brain neurotransmitter systems directly and/or indirectly is unknown and needs further investigation.

Although phytol is modestly effective when compared to the standard drugs used in our study (e.g., diazepam and atropine), the observed effects appear to offer a potential advantage over most of anticonvulsant. For example, diazepam is especially effective in preventing the generalized clonic-tonic convulsions induced by pilocarpine. In contrast, the most significant effect of atropine is its ability to block the pattern of pilocarpine-induced seizures.

Herein, we clearly showed that phytol decreased the frequency of pilocarpine-induced seizures and increased the survival rate. In our knowledge, these effects of phytol on mortality rate observed during acute phases of pilocarpine-induced seizures have not been reported before. Thus, these findings might have important implications for understanding the mechanism of epilepsy to promote new advances in the development of selective and targeted antiepileptic drugs. Phytol protected the mice against status epilepticus regularly observed



during seizures. Further investigations of the effects of phytol against oxidative stress, necrosis, apoptosis and/or autophagy observed during the acute phase of this epilepsy model are in progress to confirm its neuroprotective effects.

### **Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq), Brazil. R.M.F, D.P.S and P.S.S are fellows from CNPq. J.P.C is fellow from CAPES. We would like to thank Stenio Gardel Maia for her technical assistance and Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (UFPI, Picos) for his help with English editing of the manuscript.

### **References**

- [1] E.B. Bledsoe, R.S. Porter, R.A. Cherry, Intermediate Emergency Care. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hill, 2004. 260 p.
- [2] D.O. Barros, S.M. Xavier, C.O. Barbosa, R.F. Silva, F.D. Maia, A.A. Oliveira, [3] R.M. Freitas, Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats, *Neurosci. Lett.* 416 (2007) 227-230.
- [4] D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, H. Greim, J.H. Hanifin, A.E. Rogers, J.H. Saurat, I.G. Sipes, H. Tagami, A safety assessment of alcohols with unsaturated branched chain when used as fragrance ingredients, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) S151-S192.
- [5] R.N. Brogden, K.L. Goa, Flumazenil: a preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use, *Drugs* 35 (1988) 448-467.
- [6] R.N. Brogden, K.L. Goa, Flumazenil: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as a benzodiazepine antagonist, *Drugs* 42 (1991) 61-89.

- [7] P.J. Brown, G. Mei, F.B. Gibberd, D. Burston, P.D. Mayne, J.E. McClinchy, M. Sidey, Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease, *J. Hum. Nutr. Diet.* 6 (1993) 295-305.
- [8] L.M.L. Campêlo, C.M. Feitosa, A.R. Tomé, R.M. Freitas. Evaluation of neuroprotective potential of *Citrus limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures, *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 10 (2010) 116-126.
- [9] E.A. Carlini, Plants and the central nervous system, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3 (2003) 501-512.
- [10] E.A. Cavaleiro, M.J. Fernandes, L. Turski, M.G. Naffah-Mazzacoratti, Spontaneous recurrent seizures in rats: Amino acid and monoamine determination in the hippocampus, *Epilepsia* 35 (1994) 1-11.
- [11] T.H. Costa Marques, K.M.F. Cardoso, A.A.C. Almeida, A.R. Tomé, R.M. Freitas. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures, *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 10 (2011) 338-350.
- [12] R.N. De Almeida, D.P. De Sousa, F.F.F. Nóbrega, F.S. Claudino, D.A.M. Araújo, J.R. Leite, R. Mattei, Anticonvulsant effect of a natural compound  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability, *Neurosci. Lett.* 443 (2008) 51-55.
- [13] D.P. De Sousa, J.L. Quintans, R.N. Almeida, Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-terpineol, *Pharm. Biol.* 45 (2007) 69-70.
- [14] IFRA (International Fragrance Association). Use Level Survey, August 2004.
- [15] S.E. File, R.G. Lister, D.J. Nutt, The anxiogenic actions of benzodiazepine antagonists, *Neuropharmacology* 21 (1982) 1033-1037.
- [16] [S.E. File, S. Pellow, Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788, *Psychopharmacology* 88 (1986) 1-11.

- [17] R.M. Freitas, F.C.F. Sousa, S.M.M. Vasconcelos, G.S.B. Viana, M.M.F. Fonteles, Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 (2004) 327-332.
- [18] R.M. Freitas, F.C.F. Souza, S.M.M. Vasconcelos, G.S.B. Viana, M.M.F. Fonteles, Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats, *FEBS J.* 272 (2005) 1307-1312.
- [19] R.M. Freitas, The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures, *Neurosci. Lett.* 455 (2009) 140-144.
- [20] R.M. Freitas. Lipoic acid increases hippocampal choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities and improvement memory in epileptic rats, *Neurochem. Res.* 35 (2010) 162-170.
- [21] R.P. Hansen, Occurrence of phytanic acid in rumen bacteria. *Nature* 210 (1966) 841.
- [22] H. Hosseinzadeh, S. Parvardeh, M. Nassiri-Asl, M.T. Mansouri, Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppress epileptic seizures in rats, *Med. Sci. Monit.* 11 (2005) 106-110.
- [23] P. Kwan, M.J. Brodie, Early identification of refractory epilepsy, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 314-319.
- [24] W. Loscher, D. Schmidt, Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations, *Epilepsy Res.* 2 (1988) 145-181.
- [25] J.T. Mackie, B.P. Atshaves, H.R. Payne, A.L. McIntosh, F. Schroeder, A.B. Kier, Phytol-induced hepatotoxicity in mice, *Toxicol. Pathol.* 37 (2009) 201-208.

- [26] E.D. Martin, A. Araque, W. Buno, Synaptic regulation of the slow  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol.* 86 (2001) 2878-2886.
- [27] G.C.G. Militão, P.M.P. Ferreira, R.M. Freitas, Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures, *Neurochem. Int.* 56 (2010) 16-20.
- [28] M. Patel, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1951-1962.
- [29] L.J. Quintans Jr, D.A Silva, J.S. Siqueira JS, M.F.V. Souza, R.N. Almeida, R.G.C. Silva-Júnior, Anticonvulsant properties of the total alkaloid fraction of *Rauvolfia ligustrina* Roem. et Schult. in male mice, *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (2007) 152-158.
- [30] L.F.L. Santos, R.L.M. Freitas, S.M.L. Xavier, G.B. Saldanha, R.M. Freitas, Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89 (2008) 1-5.
- [31] Í.M.S. Santos, R.L.M. Freitas, E.P. Silva, C.M. Feitosa, G.B. Saldanha, G.F. Souza, A.R. Tomé, D. Feng, R.M. Freitas. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures, *Brain Res.* 1315 (2010) 33-40.
- [32] M.I. Silva, M.A. Silva, M.R. Aquino Neto, B.A. Moura, H.L. Sousa, E.P. Lavor, P.F. Vasconcelos, D.S. Macêdo, D.P. Sousa, S.M.M. Vasconcelos, F.C.F. Sousa, Effects of isopulegol on pentylentetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity, *Fitoterapia* 80 (2009) 506-513.
- [33] D.P. Sousa, J.C.R. Gonçalves, L. Quintans-Júnior, J.S. Cruz, D.A.M. Araújo, R.N. Almeida, Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents, *Neurosci. Lett.* 401 (2006) 231-235.

- [34] D. Steinberg, Refsum disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, Eds.), pp. 2351–2369. McGraw-Hill, New York. (1995).
- [35] A.R. Tome, D. Feng, R.M. Freitas. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidativestress prior to in pilocarpine-induced seizures, *Neurochem. Res.* 35 (2010) 580-587.
- [36] W.A. Turski, E.A. Cavalheiro, M. Schwartz, S.J. Czuczwar, Z. Kleinrok, L. Turski, Cholonimimetic produce seizures and brain damage in rats, *Experientia* 39 (1983) 1408-1411.
- [37] US Department of Health and Human Services, Institute of Laboratory Animal Resources. *Guide for the care and use of laboratory animals*, National Research Council, Washington, DC, 1985.
- [38] S.M. Xavier, C.O. Barbosa, D.O. Barros, R. F. Silva, A.A. Oliveira, R.M. Freitas, Vitamin C antioxidante effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine, *Neurosci. Lett* 8 (2007) 76-79.