



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

**Estudos Neuroquímicos do (-)- Mirtenol e seu Complexo de Inclusão com  $\beta$ -  
Ciclodextrina como Contribuições Tecnológicas para o Desenvolvimento de Novos  
Medicamentos**

**OSKAR ALMEIDA SILVA**

Teresina – Piauí

2015

**OSKAR ALMEIDA SILVA**

**Estudos Neuroquímicos do (-)- Mirtenol e seu Complexo de Inclusão com  $\beta$ -  
Ciclodextrina como Contribuições Tecnológicas para o Desenvolvimento de Novos  
Medicamentos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros.

Co-orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2015

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

**S586e** Silva, Oskar Almeida.  
Estudos Neuroquímicos do (-)- Mirtenol e seu Complexo de Inclusão com  $\beta$ -Ciclodextrina como contribuições tecnológicas para o desenvolvimento de novos medicamentos / Oskar Almeida Silva. – Teresina: 2015.  
111 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2015.  
Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Freire de Medeiros.  
Co-orientação: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

1. Anticonvulsivante. 2. Complexo de Inclusão. 3. (-)-Mirtenol. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

Nível: Mestrado



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro do ano de dois mil e quinze, às 9:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado composta pelos Professores, Maria das Graças Freire de Medeiros - Universidade Federal do Piauí (Orientadora/Presidente), Francisco das Chagas Alves Lima – Universidade Estadual do Piauí (Examinador Interno), Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos – Universidade Federal do Piauí (Examinadora Externa), perante o qual **Oskar Almeida Silva** aluno regularmente matriculado no Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, defendeu em sessão pública, para preenchimento do requisito de Mestre, sua Dissertação intitulada "ESTUDOS NEUROQUÍMICOS DO (-) - MIRTENOL E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO COM B-CICLODEXTRINA COMO CONTRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS". A defesa da referida dissertação de mestrado ocorreu, das 9:00 horas às 11:35 horas, tendo o mestrando sido submetido à arguição, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o mestrando Aprovado (aprovado/reprovado) por unanimidade.

Eu, Maria das Graças Freire de Medeiros, que presidi a Banca de Defesa da Dissertação, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina, 28 de janeiro de 2015.

*Maria das Graças Freire de Medeiros*  
Prof. Dra. Maria das Graças Freire de  
Medeiros

Universidade Federal do Piauí  
(Orientadora/Presidente)

*Francisco das Chagas Alves Lima*  
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima  
Universidade Estadual do Piauí  
(Examinador Interno)

*Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos*  
Prof. Dra. Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos  
Universidade Federal do Piauí  
(Examinadora Externa)

**OSKAR ALMEIDA SILVA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

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

Prof. Dr. Pedro Vilarinho castelo Branco

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

“As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces.”

**Aristóteles**

## DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Cícero, por me proporcionarem o dom da vida, sempre indicando o caminho da bondade, justiça e honestidade, meus irmãos Oreste e Orácio pela amizade, cumplicidade em todos os momentos que superamos juntos, a minha namorada Géssica pelo companheirismo e amor verdadeiro”*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus pela proteção e força proporcionada em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus pais Ana e Cicero por sempre proporcionarem o melhor possível para minha educação.*

*Aos amigos e amigas pela compreensão nos momentos de ausência Rodrigo, Mário Sérgio, Lincoln, Aliny, Janete.*

*Aos amigos de pesquisa, pela longa caminhada ao meu lado: Katrícia, Cássio, Amanda, Rusbene, Ana Carolina, Guilherme, George, Jurandy.*

*Aos meus amigos do PPGCF pelo companheirismo, união e apoio incondicional.*

*Aos colegas de laboratório do LAPNEX, LPNEX, LAPCON e LAPGENIC.*

*A minha orientadora Graça Medeiros, pela compreensão, sábios conselhos e total disponibilidade e disposição que foram determinantes ao longo do nosso trabalho.*

*Ao meu co-orientador professor Rivelilson Mendes por todas as contribuições na minha vida de pesquisa, sempre contribuindo para minha formação acadêmica como pesquisador e como pessoa.*

*A banca examinadora que aceitaram gentilmente o convite.*

*A UFPI pela estrutura para realização dos experimentos.*

*A FAPEPI/Cnpq pelo financiamento da bolsa de mestrado.*



## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos.....	20
Referências.....	21
<b>3. CAPÍTULO I: Utilizações e propriedades de um monoterpeneo natural: uma prospecção científica e tecnológica</b> .....	23
Resumo .....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos .....	27
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão.....	38
Referências.....	39
<b>4. CAPÍTULO II: Obtenção e caracterização do complexo de inclusão (-)-mirtenol- β-ciclodextrina</b> .....	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	48
Conclusão.....	55
Referências.....	56
<b>5. CAPÍTULO III: Avaliação da toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol-β-ciclodextrina em ratos Wistar</b> .....	59
Resumo .....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62

Materiais e Métodos.....	64
Resultados.....	67
Discussão .....	76
Conclusão.....	79
Referências.....	80
<b>6. CAPÍTULO VI: Atividade antiepilética e avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e fígado de ratos <i>Wistar</i> tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol-<math>\beta</math>-ciclodextrina.....</b>	<b>85</b>
Resumo .....	86
Abstract.....	87
Introdução.....	88
Materiais e Métodos.....	90
Resultados.....	97
Discussão.....	103
Conclusão.....	106
Referências.....	107
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>CAT</b>	Catalase
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CIP</b>	Classificação Internacional de Patentes
<b>DSC</b>	Calorimetria Exploratória Diferencial
<b>DTG</b>	Termogravimetria diferencial
<b>EM</b>	Espectrometria de massa
<b>E.P.M</b>	Erro padrão da média
<b>EPO</b>	European Patent Office
<b>ERNs</b>	Espécies reativas derivadas de nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas derivadas de oxigênio
<b>eV</b>	Elétron volts
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GSH</b>	Glutathiona Reduzida
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
<b>IV-TF</b>	Infravermelho com transformada de Fourier
<b>JPO</b>	Japan Patent Office
<b>KIPRIS</b>	Korea Intellectual Property Rights Information Service
<b>m/z</b>	Massa/carga
<b>MF</b>	Mistura física
<b>MIR</b>	Mirtenol
<b>SIPO</b>	State Intellectual Property Office of the P.R.C
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TG</b>	Termogravimetria
<b>USPTO</b>	United States Patentand Trademark
<b>WIPO</b>	World Intellectual Property Organization
<b><math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -Ciclodextrina

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1:** Palavras pesquisadas nas principais bases de busca de patentes..... 29

**Tabela 02:** Principais inovações propostas pelas patentes depositadas..... 32

**Tabela 3:** Artigos encontrados e selecionados de acordo com os critérios adotados..... 36

### Capítulo 3

**Tabela 1:** Avaliação do *Screening hipocrático* em ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão na dose de  $2\text{g kg}^{-1}$  observados durante 14 dias..... 68

### Capítulo 4

**Tabela 1:** Avaliação do efeito anticonvulsivante do mirtenol no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em ratos..... 97

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1:** Esquema da prospecção científica e tecnológica nas bases de dados utilizadas..... 28
- Figura 2:** Número de depósitos de patentes em função dos países depositantes..... 30
- Figura 3:** Patentes de acordo com a classificação internacional de patente (CIP)..... 31
- Figura 4:** Número de registo de depósitos de patentes em função do ano..... 31
- Figura 5:** Artigos publicados em suas respectivas bases..... 35

### Capítulo 2

- Figura 1:** Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina, e suas ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, *ACD/Labs ChemSketch Free Hardware*..... 45
- Figura 2:** Método de obtenção do complexo mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina..... 46
- Figura 3:** Leitura espectrofotométrica do (-)-mirtenol..... 48
- Figura 4:** Curva de calibração do (-)-mirtenol..... 48
- Figura 5:** Diagrama de solubilidade de (-)-mirtenol em presença de  $\beta$ -CD..... 49
- Figura 6:** Espectros de IV das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF)..... 51
- Figura 7:** Termogramas de DSC das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF)..... 52
- Figura 8:** Curvas de TG das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF)..... 53
- Figura 9:** Curvas de DTG das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol 54

(MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF).....

### Capítulo 3

**Figura 1:** Animais utilizados no estudo (Ratos *Wistar*)..... 64

**Figura 2:** Estrutura do mirtenol, *ACD/Labs ChemSketch Free Hardware*..... 64

**Figura 3.** Animal submetido ao teste do campo aberto..... 66

**Figura 4:** Animal submetido ao teste da barra giratória..... 67

**Figura 5:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e Complexo de inclusão (B) em relação a alteração do peso corpóreo..... 69

**Figura 6:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em relação ao consumo de ração..... 70

**Figura 7:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em relação ao consumo de água..... 71

**Figura 8:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em e, relação a produção de excretas..... 74

**Figura 9:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol e complexo de inclusão em relação ao tempo de permanência (A) e do número de quedas (B) sobre a barra giratória..... 73

**Figura 10:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol e complexo de inclusão em relação ao o número de cruzamentos (A), levantamento (*rearing*)(B) e número de movimentos de autolimpeza (*grooming*) (C) ..... 74

**Figura 11:** Análise morfológica macroscópica dos principais órgãos de ratos *Wistar* adultos tratados com (-)-mirtenol e com seu complexo de inclusão..... 76

### Capítulo 4

**Figura 1:** Receptor GABA<sub>a</sub>, vista a partir da face extracelular da membrana e a localização aproximada das suas subunidades, e locais de ligação de GABA e benzodiazepínicos (BZ)..... 88

**Figura 2:** Protocolo experimental crises epiléticas induzidas por pilocarpina..... 91

<b>Figura 3:</b> Protocolo experimental para a investigação da participação do (-)-mirtenol em receptores benzodiazepínicos.....	91
<b>Figura 4:</b> Protocolo experimental do isolamento mitocondrial.....	92
<b>Figura 5:</b> Protocolo de determinação dos níveis de peroxidação lipídica.....	93
<b>Figura 6:</b> Protocolo de determinação do teor de nitrito.....	94
<b>Figura 7:</b> Protocolo de determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)...	95
<b>Figura 8:</b> Protocolo de determinação da atividade da catalase (CAT).....	95
<b>Figura 9:</b> Protocolo de determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH)	96
<b>Figura 10:</b> Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto aos níveis de peroxidação lipídica.....	98
<b>Figura 11:</b> Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) isoladas de ratos <i>Wistar</i> tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão, quanto aos níveis de produção de nitrito.....	99
<b>Figura 12:</b> Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto aos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase.....	100
<b>Figura 13:</b> Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto a atividade enzimática da enzima catalase.....	101
<b>Figura 14:</b> Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto a concentração de glutatona reduzida.....	103

**ESTUDOS NEUROQUÍMICOS DO (-) - MIRTENOL E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO COM B-CICLODEXTRINA COMO CONTRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS. OSKAR ALMEIDA SILVA.** Orientador (a): Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros. Dissertação de Mestrado. 111 p. Programas de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2014.

### RESUMO

O mirtenol é um monoterpreno de função álcool natural de cadeia cíclica e ramificada. Devido as suas propriedades aromáticas é amplamente utilizado em artigos de higiene pessoal e produtos de limpeza. Porém poucos estudos relatam propriedades terapêuticas, o que reduz seu uso na indústria farmacêutica. Nesta perspectiva o presente trabalho busca avaliar a possível atividade em nível do sistema nervoso central do (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina em modelos experimentais de crises epiléticas em ratos e a obtenção e caracterização do complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina, utilizando métodos termogravimétricos. A busca de anterioridade realizada por meio da prospecção científica e tecnológica nas principais bases de dados de patentes e artigos científicos com a finalidade de verificar as principais utilizações do mirtenol, evidenciou uma quantidade reduzida de depósito de patente e publicação de artigos científicos, mostrando a necessidade da realização de novos estudos a fim de investigar todo o potencial farmacológico do mirtenol, favorecendo estudos futuros. Para a avaliação da toxicidade aguda do mirtenol em ratos *Wistar* albinos de ambos os sexos, por via intraperitoneal e oral, foi utilizando dose única de 2000 mg kg<sup>-1</sup>, segundo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 2013. O estudo demonstrou que o (-) -mirtenol e seu complexo de inclusão não apresentaram sinais de toxicidade aguda, tendo assim níveis de segurança aceitáveis para sua utilização em estudos futuros. Para a investigação da atividade anticonvulsivante e a avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e fígado de ratos *Wistar* albinos, foram pré-tratados com (-) -mirtenol nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup> e complexo de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup>, antes da indução de crises epilética provocadas por pilocarpina. Em todas as doses os animais pré-tratados com (-) -mirtenol e complexo de inclusão tiveram reduzidas significativamente o número de crises epiléticas e o aumentou a taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle convulsivo (pilocarpina). Na avaliação do estresse oxidativo reduziram significativamente os níveis de peroxidação lipídica, a concentração da produção de nitrito, porém não alteraram a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e diminuiu as concentrações de glutathione reduzida. De acordo com os resultados obtidos o (-) -mirtenol e seu complexo de inclusão são substâncias promissoras como anticonvulsivante e antioxidante *ex vivo*, diminuindo os danos neurais causados após indução de crises epiléticas promovendo neuroproteção. A obtenção de um complexo de inclusão do (-)-mirtenol com  $\beta$ -ciclodextrina proporciona uma maior estabilidade. A complexação foi obtida utilizando o método de secagem por *spray drying* com rendimento de 63,53 %, e caracterizado por Calorimetria Exploratória Diferencial, Termogravimetria, Termogravimetria Diferencial e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier. Os resultados da caracterização demonstram diferenças nas propriedades físico-químicas do (-) -mirtenol e seu complexo com  $\beta$ -ciclodextrina, sugerindo a formação do complexo de inclusão. Os resultados obtidos fornecem subsídios para o desenvolvimento de um possível fitofármaco com propriedades anticonvulsivantes e neuroprotetoras, bem como a formação de seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina proporcionando uma forma mais estável, possibilita o desenvolvimento de diversas formas farmacêuticas.

**Palavras-chave:** Anticonvulsivante, Complexo de Inclusão, (-)-Mirtenol, Prospecção Científica e Tecnológica, Toxicidade.



**NEUROCHEMICAL STUDIES OF (-) - MYRTENOL AND ITS COMPLEX WITH INCLUSION OF B-CYCLODEXTRIN CONTRIBUTIONS AS TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF NEW PHYDRUGS. OSKAR ALMEIDA SILVA.** Adviser (a): Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros. Master's Thesis. 111 p. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, UFPI, 2014.

### **ABSTRACT**

The myrtenol is a monoterpene alcohol natural function of cyclic and branched. Due to its aromatic properties is widely used in toiletries and cleaning products. But few studies have reported therapeutic properties, which reduces their use in the pharmaceutical industry. In this perspective the present study sought to determine the possible activity in the central nervous system of (-) - myrtenol and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in experimental models of epileptic seizures in rats and obtaining and characterization of inclusion complex (-) - mirtenol- $\beta$ -cyclodextrin using thermogravimetric methods. The prior art search conducted through scientific and technological foresight in the main patent databases and scientific articles in order to verify the main uses of myrtenol, showed a reduced amount of patent filing and publication of scientific papers, showing the need of new studies to investigate all the pharmacological potential of myrtenol, favoring future studies. To evaluate the acute toxicity of myrtenol in albino Wistar rats of both sexes, by intraperitoneal and oral routes, was using a single dose of 2000 mg kg<sup>-1</sup>, according to the recommendations of the National Health Surveillance Agency, 2013. The study showed that the (-) -mirtenol and its inclusion complex showed no signs of acute toxicity, thus having acceptable safety levels for use in further studies. To evaluate the anticonvulsant activity, and the evaluation of oxidative stress in isolated mitochondria from brain and liver of Wistar rats were pre-treated with (-) -mirtenol at doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup> and inclusion complex 25 mg kg<sup>-1</sup>, before induction of epileptic seizures caused by pilocarpine. At all doses the animals pretreated with (-) and - mirtenol inclusion complex had significantly reduced the number of seizures and increased the survival rate relative to the control group seizure (pilocarpine). The evaluation of oxidative stress significantly reduced the levels of lipid peroxidation, the concentration of nitrite production, but did not alter the activity of superoxide dismutase and catalase and decreased the reduced glutathione concentrations. According to the results, (-) -mirtenol and its inclusion complex are promising as an anticonvulsant and ex vivo antioxidant, reducing neuronal damage after induction of seizures by promoting neuroprotection. Obtaining an inclusion complex of (-) - myrtenol with  $\beta$ -cyclodextrin provides enhanced stability. The complex was obtained using the method of drying by spray drying in a yield of 63.53%, and characterized by differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, differential thermogravimetry and Infrared Spectroscopy Fourier transform. The characterization results demonstrate differences in the physicochemical properties of (-) -mirtenol and its complex with  $\beta$ -cyclodextrin, suggesting the formation of the inclusion complex. The results provide information for the development of a possible phytochemical with anticonvulsant and neuroprotective properties, and the training of its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin providing a more stable form, enables the development of various pharmaceutical forms.

**Keywords:** Anticonvulsant, Inclusion Complex, (-)-myrtenol, Scientific researches and Technological toxicity.

## 1- INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pelo homem no tratamento de doenças é tão antiga quanto a sua própria existência (FÉLIX-SILVA et al., 2012). Pesquisas demonstram que 82% da população brasileira utilizam produtos à base de espécies vegetais (MELO FILHO; MARACAJA; SILVA, 2014; PASCOAL et al., 2011; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). Porém, por falta de orientação correta, essas práticas podem se tornar bastante perigosa, pois muitas plantas apresentam difícil identificação, composição química variável ou ainda relativa toxicidade (DIAS; MIGUEL, 2005; FÉLIX-SILVA et al., 2012; SIMOES, 2001).

Com o advento da modernidade a medicina vem alcançando grandes avanços, no entanto as plantas medicinais ainda desempenham importante papel na saúde mundial, aproximadamente 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (SOUSA et al., 2008). Fato preocupante, pois tais insumos possuem características peculiares para cada planta como, heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica, e dificuldade de multiplicação comprometendo sua utilização com propósitos farmacêuticos. Na presente problemática, torna-se necessário a realização de estudos mais aprofundados para investigação farmacológica, terapêutico e agrônômico, para possibilitar a conservação e a produção em larga escala destas espécies (CALIXTO, 2005; MORAIS et al., 2012).

Acima de qualquer outro setor, a indústria farmacêutica mundial é a que mais investe em pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I), cerca de 20% do seu faturamento das vendas, contra 6% da indústria eletrônica, 5% das indústrias de telecomunicações e 4% da indústria automobilística. Principalmente em função do longo tempo de desenvolvimento, dos altos custos e dos riscos envolvidos no desenvolvimento de um novo medicamento (estimado atualmente em mais de 1 bilhão de dólares), essas pesquisas ficam restritas a poucos países desenvolvidos (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

Na indústria farmacêutica os extrativos vegetais obtidos em diversas espécies de plantas possuem grande relevância na viabilidade do desenvolvimento de novas fontes terapêuticas. Como a utilização de substâncias ativas como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos, adjuvantes em formulações farmacêuticas ou na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2003; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

De acordo com a literatura há uma infinidade de plantas com ação no sistema nervoso central (SNC) (CARLINI, 2003), inclusive com propriedades anticonvulsivante /

antiepiléptico, (SHARMA et al., 2013) tendo em vista que a epilepsia é terceira doenças mais comuns que acometem o SNC (VEZZANI et al., 2011) afetando em torno de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, esta doença neurodegenerativa pode acometer sem distinção todas as faixas etárias, sexo, raça ou classe social (DESFORGES; SCHEUER; PEDLEY, 1990).

A epilepsia é uma doença neurodegenerativa caracterizada por crises epiléticas recorrentes, provocada devido à atividade neuronal excessiva e síncrona anormal no cérebro, causado por uma ruptura do delicado equilíbrio entre a excitação e inibição (CLYNEN et al., 2014; DICHTER, 1994) seu tratamento por meio da prescrição de drogas antiepiléticas, enfrenta muitos desafios devido à existência de vários efeitos adversos (como sonolência, náuseas e tonturas) associados a um grau considerável de toxicidade (EDDY; RICKARDS; CAVANNA, 2012). A epilepsia é a grave mais comum distúrbio neurológico, afetando 50-60 milhões de indivíduos em todo o mundo (LI et al., 2014). Por esse motivo vários grupos de pesquisa vêm buscando novas tecnologias para o tratamento da epilepsia, com foco na busca de novos constituintes naturais, extratos vegetais, frações isoladas e compostos ativos isolados com ações antiepiléticos. Com finalidade o desenvolvimento de fitoterápicos, que seriam mais baratos e com menos efeitos colaterais que as drogas existentes atualmente (ZHU et al., 2014). Sendo essa uma das principais justificativas para a realização desta dissertação de mestrado intitulado “Estudos Neuroquímicos do (-)- Mirtenol e seu Complexo de Inclusão com  $\beta$ -Ciclodextrina como Contribuições Tecnológicas para o Desenvolvimento de Novos Medicamentos” pretende fornecer subsídios, para o desenvolvimento de fitofármacos com ação anticonvulsivante e neuroprotetora.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar a atividade em nível do sistema nervoso central do (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina em modelos experimentais de crises epiléticas em ratos.

### 2.2 Específicos

- Realizar a investigação da atividade farmacológica das substâncias propostas para a possível atividade anticonvulsivante e antioxidante no Sistema Nervoso Central.
- Obter o complexo de inclusão (-)-mirtenol com  $\beta$ -ciclodextrina.
- Caracterizar o complexo de inclusão utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), termogravimetria diferencial (DTG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF).
- Investigar a toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo em modelos experimentais.

### 3- REFERÊNCIAS

- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, n. 1, 2008.
- CARLINI, E. Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.
- CLYNEN, E. et al. Neuropeptides as Targets for the Development of Anticonvulsant Drugs. *Molecular neurobiology*, p. 1-21, 2014.
- DESFORGES, J. F.; SCHEUER, M. L.; PEDLEY, T. A. The evaluation and treatment of seizures. *New England Journal of Medicine*, v. 323, n. 21, p. 1468-1474, 1990.
- DIAS, J. F.; MIGUEL, M. D. ESTUDO ALELOPÁTICO APLICADO DE ASTER LANCEOLATUS, WILLD. *Visão Acadêmica*, v. 6, n. 1, 2005.
- DICHTER, M. A. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. *Epilepsia*, v. 35, n. s4, p. S51-S57, 1994.
- EDDY, C. M.; RICKARDS, H. E.; CAVANNA, A. E. Behavioral adverse effects of antiepileptic drugs in epilepsy. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 32, n. 3, p. 362-375, 2012.
- FÉLIX-SILVA, J. et al. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. 2012.
- LI, X. et al. Neighborhood, family, and childhood and adolescent epilepsy: A nationwide epidemiological study from Sweden. *Seizure*, v. 23, n. 1, p. 62-68, 2014.
- MELO FILHO, J. S. D.; MARACAJA, P. B.; SILVA, R. A. D. O ETNOCONHECIMENTO DAS PLANTAS MEDICINAIS NO MUNICÍPIO DE CATOLÉ DO ROCHA, PARAÍBA. Programa de Pós Graduação em Sistemas Agroindustriais (Dissertações e Teses), v. 3, n. 1, 2014.
- MORAIS, T. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- PASCOAL, A. C. et al. Essential Oil from the Leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk.(Myrtaceae): Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activity. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, n. 5, p. 34-37, 2011.
- SCHENKEL, E. P. et al. Produtos de origem vegetal eo desenvolvimento de medicamentos. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, v. 5, p. 371-400, 2003.

SHARMA, J. et al. Ethnomedicinal plants used for treating epilepsy by indigenous communities of sub-Himalayan region of Uttarakhand, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 1, p. 353-370, 2013.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E. A pesquisa ea produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMOES, C. M. O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SOUSA, F. C. et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: A scientific review of bioactivity and potential benefits in the anxiety disorders in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHU, H. L. et al. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. *Epilepsia*, v. 55, n. 1, p. 3-16, 2014



**3- Capítulo 1: Utilizações e propriedades de um monoterpeno natural: uma prospecção científica e tecnológica**

## Utilizações e propriedades de um monoterpeno natural: uma prospecção científica e tecnológica

Oskar Almeida Silva<sup>1</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1</sup>; Maria das Graças Freire Medeiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

### Resumo

Com a importância dos produtos de origem natural para terapêutica e a grande variedade de plantas disponíveis em nosso país, a presente prospecção científica e tecnológica busca conhecer a utilização do monoterpeno natural, (-)-mirtenol ( [3.1.1] hept-2-eno-2-metanol, 6,6 - dimetil-; 6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-eno-2-metanol) um monoterpeno de função álcool, fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$ , massa molecular 152,24, encontrado no óleo essencial de várias espécies vegetais principalmente as da família *Mirtaceae*. Com intuito de investigar todo o potencial farmacológico do (-)-mirtenol, mostrando um vasto leque de possibilidade de novas pesquisas a respeito desse monoterpeno. Foram realizadas buscas nas bases de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), no *European Patent Office* (EPO), na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), na base *Derwent Innovations Index*, que é um produto da Thomson Reuters (DERWENT), na *Japan Patent Office* (JPO), na *State Intellectual Property Office of the P.R.C* (SIPO) e na *Korea Intellectual Property Rights Information Service* (KIPRIS). Os artigos científicos foram pesquisados nas bases de dados *Web of Science*, *Science Direct*, *PubMed*, *Scielo* e *LILACS*. O resultado das buscas, mostra uma quantidade de registro de depósito de patente e publicação de artigos científicos reduzidas, evidenciando a necessidade da realização de novas pesquisas com esta substância. Este estudo foi realizado para contribuir com o desenvolvimento tecnológico e de inovação, a respeito desta tecnologia, norteando futuras pesquisa para desvendar novas utilizações e propriedades do (-)-mirtenol.

**Palavras - Chave:** (-)-mirtenol, Prospecção científica, Prospecção tecnológica.



## Uses and properties of a natural monoterpene: a scientific and technological forecasting

### Abstract

With the importance of natural products for therapeutic and the wide variety of plants available in our country, the present scientific and technological prospection investigates the use of natural monoterpene, (-) - myrtenol ([3.1.1] hept-2 ene-2-methanol, 6,6 - dimethyl; 6,6-dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene-2-methanol) one monoterpene alcohol function, molecular formula  $C_{10}H_{16}O$ , molecular weight 152.24, found in the essential oil of various plant species mainly of Mirtaceae family. To investigate all the pharmacological potential of (-) - myrtenol, showing a wide range of possibility for further research on this monoterpene. Search the databases of patents from the National Institute of Industrial Property (INPI), were conducted in United States Patent and Trademark Office (USPTO), the European Patent Office (EPO), the World Intellectual Property Organization (WIPO), in Derwent Innovations base Index, which is a product of Thomson Reuters (DERWENT), the Japan Patent Office (JPO), the State Intellectual Property Office of the PRC (SIPO) and the Korea Intellectual Property Rights Information Service (KIPRIS). The papers were searched in the databases Web of Science, Science Direct, PubMed, SciELO and LILACS. The result of the search, shows a number of patent filing registration and publication of scientific articles reduced, highlighting the need to conduct further research with this substance. This study was conducted to contribute to technological development and innovation, regarding this technology, guiding future research to uncover new uses and properties of (-) - myrtenol.

**Keywords:** (-)-myrtenol, Scientific and technological forecasting.

## INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, o homem tem utilizado as plantas com finalidades medicinais, como nos achados do papiro de Ebers que data de cerca de 1500 a.C., listando espécies de planta utilizada até hoje (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Com o desenvolvimento tecnológico, a utilização de plantas medicinais acaba por ficar em segundo plano em um mercado dominado por produtos de base sintética. Porém ao longo dos anos vem ocorrendo um grande interesse em produtos de origem natural; pesquisas recentes apontam uma expansão em todo mundo do uso desses produtos, desenvolvendo um mercado promissor (MELO FILHO; MARACAJA; SILVA, 2014).

*Mirtácea* é a maior família da ordem Myrtales representada por cerca de 140 gêneros e mais de 3000 espécies, sendo encontrada na Austrália, sudeste da Ásia, América tropical e temperada, e poucas espécies encontradas na África (GOMES et al., 2009).

Dentre as espécies da família das Mirtáceas encontradas no Brasil, destacamos a *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. conhecida pelo nome vulgar de "gabirola". Utilizada na medicina popular, principalmente suas folhas e casca do caule, por possuírem propriedades anti-inflamatórias, antipiréticos, gastroprotetora e antidiarreico (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004). Em nosso país pode ser encontrada no Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul, nos domínios do Cerrado e da Mata Atlântica (VIGNOLI-SILVA; BANDEIRA; LANDO, 2013).

A *Campomanesia xanthocarpa* por se tratar de uma planta aromática, através do processo de hidrodestilação por arraste de vapor, pode-se obtido seu óleo essencial, no qual está presente o monoterpeno (-)-mirtenol em quantidades variáveis, nos frutos in natura em diferentes estágios de amadurecimento com 3,4% da composição centesimal (VALLILO et al., 2008) e também encontrado no óleo essencial das folhas com 24,7% da composição centesimal (PASCOAL et al., 2011).

O (-)-mirtenol é um monoterpeno de função álcool de cadeia cíclica e ramificada, devido suas propriedades aromáticas e amplamente utilizado em artigos de higiene pessoal (xampus, sabonetes) e produtos de limpeza (detergentes, desinfetantes). Porém há existência de poucos estudos investigativos das propriedades terapêuticas deste bioproduto restringe seu uso na indústria farmacêutica como incipiente (MOREIRA et al., 2013). Alguns estudos prévios demonstram a ação do (-)-mirtenol sobre o sistema nervoso central, necessitando de avaliações mais aprofundadas para a elucidação de suas propriedades farmacológicas, bem como seu mecanismo de ação (DE SOUSA et al., 2007; MOREIRA et al., 2014).

O conhecimento técnico sobre óleos essenciais evoluiu a partir do século XVIII, quando se iniciaram estudos para a sua caracterização química, culminando atualmente como um crescente número de plantas conhecidas, como fontes de óleos essenciais de interesses econômicas (VITTI; BRITO, 2003).

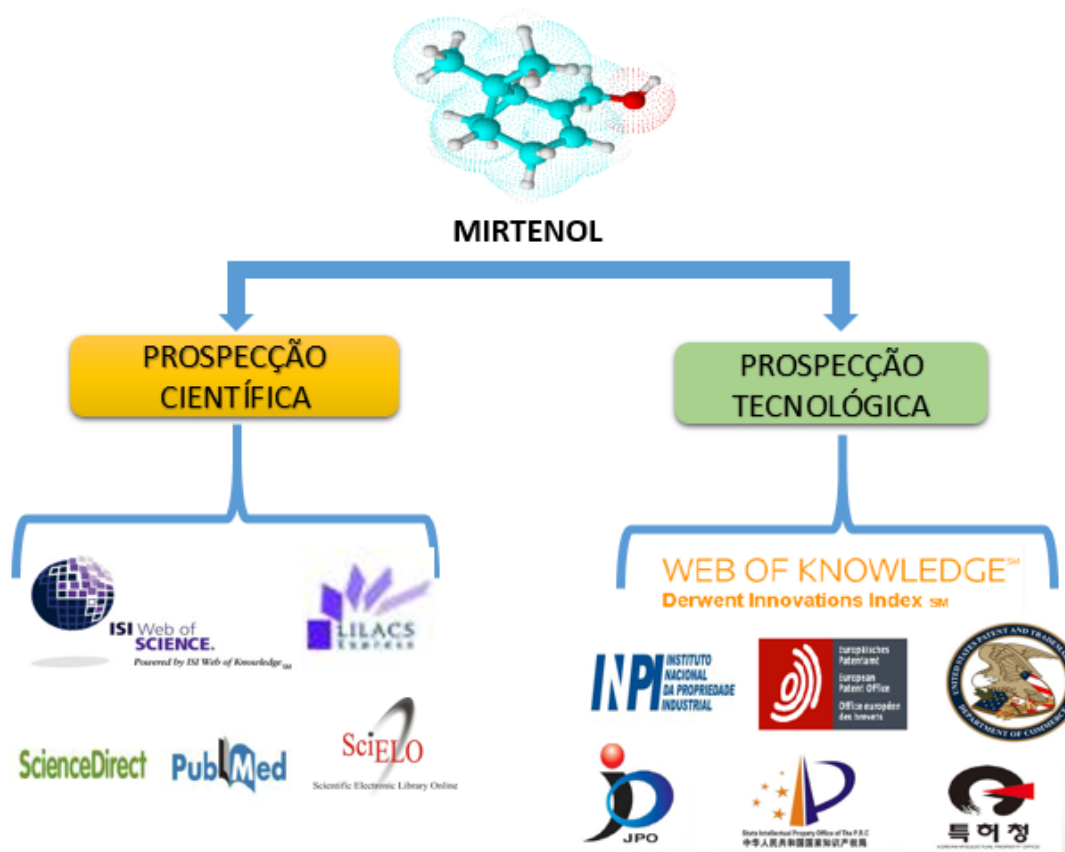
A presente prospecção científica e tecnológica nas principais bases de dados de patentes e artigos científicos tem como objetivo verificar as principais utilizações do (-)-mirtenol, tendo em vista que a realização de buscas de informações específicas sobre um tema de interesse torna-se necessário para mapear de forma confiável as vertentes do desenvolvimento científico. Sugerindo a necessidade da realização de novos estudos a fim de investigar todo o potencial farmacológico do (-)-mirtenol, mostrando um vasto leque de possibilidade de novas pesquisas a respeito desse monoterpene por conta do reduzido número de pedidos de depósitos de patente e artigos científicos.

## **Materiais e Métodos**

### **Pesquisa nas bases de patentes e artigos**

Para o desenvolvimento do presente estudo prospectivo científico e tecnológico, a respeito do monoterpene (-)-mirtenol, foram pesquisados os termos descritos na **Tabela 1**, no título das patentes, referente às suas propriedades e utilizações. Também foi realizada busca de artigos científicos, nas principais e mais completas bases de dados de periódicos, o esquema resumido da prospecção realizada pode ser observado na **Figura 1**.

**Figura 1:** Esquema da prospecção científica e tecnológica nas bases de dados utilizadas.



Foram realizadas buscas nas bases de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), no *European Patent Office* (EPO), na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), na base Derwent Innovations Index, que é um produto da Thomson Reuters (*DERWENT*), na Japan Patent Office (JPO), na State Intellectual Property Office of the P.R.C (SIPO) e na Korea Intellectual Property Rights Information Service (*KIPRIS*). Estas foram utilizadas por serem bases de busca de patentes gratuitas, de fácil acesso e utilização e bastante abrangentes contendo as principais informações sobre a tecnologia de interesse.

Os artigos publicados com a palavra “mirtenol” ou “*myrtenol*” no título relacionada a qualquer utilização e propriedades farmacológicas foram pesquisados nas bases de dados *Web of Science*, *Science Direct*, *PubMed*, *SciELO* e *LILACS* para avaliar a relevância do assunto na comunidade científica.

Além disso, foi verificado o conteúdo do texto das patentes, investigando quais finalidades o (-)-mirtenol é utilizado, coincidindo ou não com os resultados publicados nos periódicos científicos.

As buscas de patentes e artigos científicos foram realizadas nos meses de Janeiro a Junho de 2014, em seguida foram realizadas as análises dos resultados e organizadas na forma

de gráficos para melhor compreensão. Foram “realizadas pesquisas com os termos “mirtenol” ou ‘myrtenol” no título e abstract, a partir resultados foi realizado a análise prospectiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### a) PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Os resultados de número de patentes encontradas nas pesquisas da base de dados do INPI, USPTO, EPO, WIPO, DERWENT, JPO, SIPO e KIPRIS, estão apresentados na **Tabela 1**. A base de dados *Derwent Innovations Index* foi a que apresentou a maior quantidade de pedido de depósito de patentes, totalizando oito patentes publicadas. A quantidade pode ser explicado pelo fato dessa base internacional de patentes possuir mais 16 milhões de registros de invenções práticas, ser atualizada semanalmente e por ser uma base produzida pela da Thomson Reuters, uma multinacional especializada em fornecer dados no setor de negócios (COSTA; NUNES, 2014), desta forma possibilitando uma maior visibilidade as invenções e possíveis comercializações das mesmas.

Obteve-se mais dois achados de depósito de patente, um depósito no escritório de patentes mundial (WIPO) e outra no escritório de patente da Coreia (*KIPRIS*). A quantidade de achados de depósitos de patentes evidencia a falta de investimentos e novas pesquisas a respeito do (-)-mirtenol, mostrando uma molécula promissora passível de proteção.

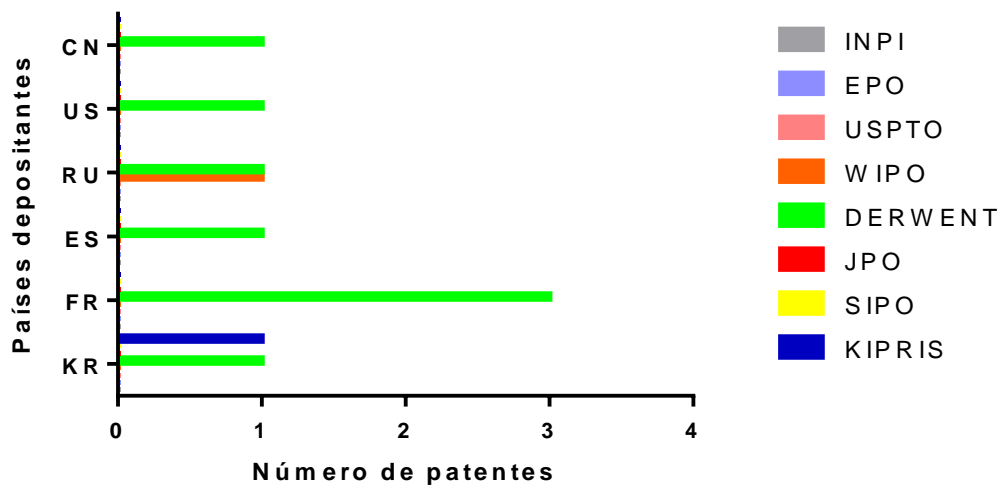
**Tabela 1:** Palavras pesquisadas nas principais bases de busca de patentes.

Bases Pesquisadas	Mirtenol ou <i>myrtenol</i>
<i>INPI</i>	0
<i>EPO</i>	0
<i>USPTO</i>	1
<i>WIPO</i>	0
<i>DERWENT</i>	8
<i>JPO</i>	0
<i>SIPO</i>	0
<i>KIPRIS</i>	1

Na **Figura 2** pode ser observado a distribuição das patentes depositadas por países detentores com suas tecnologias. A França foi o país com o maior número de patentes relacionadas ao (-)-mirtenol (três), seguido pelos outros países China, Estados Unidos da América, Rússia e Coreia do Sul cada um com um registro de depósito de patente.

Assim é constatado a necessidade sistemática da necessidade de proteger suas invenções, reconhecendo sua propriedade, valorizando todo o potencial do inventor como também do país no qual a tecnologia foi desenvolvida (MACEDO; BARBOSA, 2000).

**Figura 2:** Número de depósitos de patentes em função dos países depositantes.

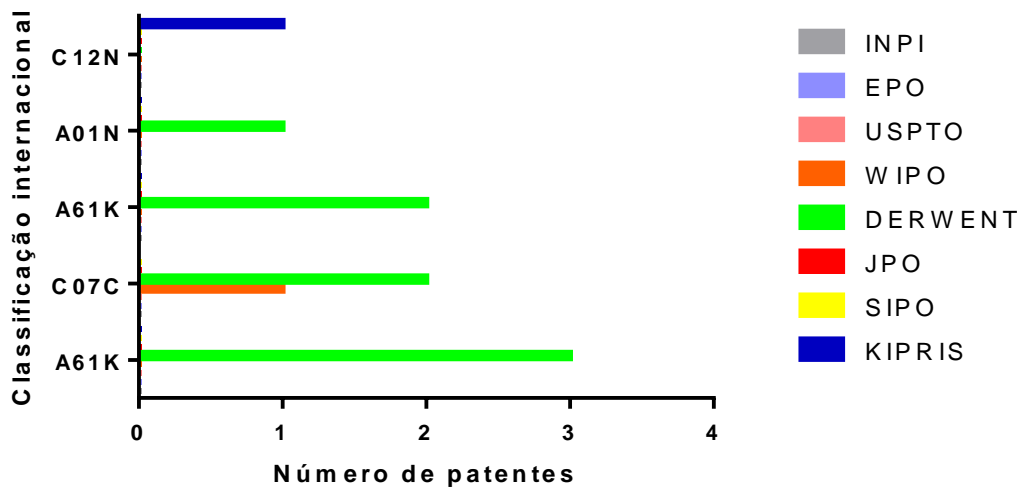


Legenda: CN: Cina, US: Estados Unidos da America, RU: Russia, ES: Espanha, FR; França, KR: Koreaia.

A Classificação Internacional de patentes está organizada em seções, deste modo facilitando a organização e busca de patentes já que estão classificadas de acordo com seu campo de atuação. As seções são divididas em: Seção A (necessidades humanas); Seção B (operações de processamento e transporte); seção C (química e metalurgia); seção D (têxteis e papel); seção E (construções fixas); seção F (engenharia mecânica, iluminação, aquecimento, armas e explosão); seção G (física) e seção H (eletricidade). Se uma patente possuir mais de uma classificação, considera-se a primeira e assim sucessivamente (PERUCCHI; MUELLER, 2014).

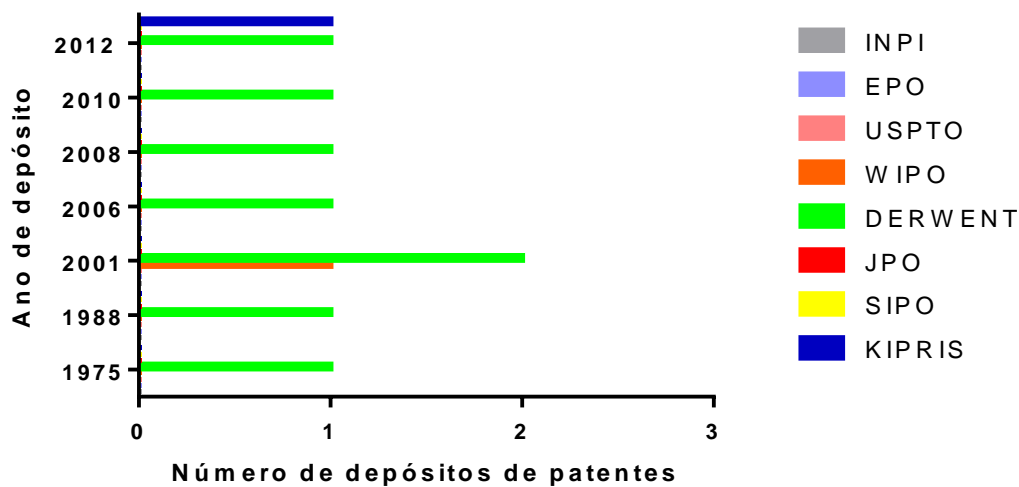
Analisando a Classificação Internacional de Patentes (CIP), a maioria das patentes (seis) apresentavam registro na Seção A, que tratam de necessidades humanas, foi encontrado quarto registros de depósito de patentes, enquadradas na classe A61K que abrange conservantes, biocidas, repelentes ou atrativos para pestes. Na Seção C, Química; Metalurgia foram agrupadas quatro patentes, três pertencentes à classe C07C que compreende compostos acíclicos ou carboxílicos e uma na classe C07C representando os micro-organismos, enzimas, suas composições e meios de cultura (**Figura 3**).

**Figura 3:** Patentes de acordo com a classificação internacional de patente (CIP).



Analisando o número registrado de depósitos de patentes por ano podemos observar que o primeiro depósito de uma patente usando (-)-mirtenol foi registrado no ano 1975 e o último no ano de 2012 (duas patentes), transcorrendo um período de 37 anos do primeiro depósito, sugerindo que não houve interesse ou investimentos para o desenvolvimento de pesquisas com esta tecnologia. A **Figura 4** é a representação da estagnação da pesquisa científica no tempo, mostrando também a ausência de consciência de necessidade da proteção da propriedade intelectual desenvolvida.

**Figura 4:** Número de registro de depósitos de patentes em função do ano.



Na **tabela 2** temos os resumos das patentes encontrada com suas principais características, bem como as inovações propostas na utilização desse monoterpeneo natural.

Podemos observar que três das dez patentes encontradas trata de aplicabilidade de uso médico ou cosmético do (-)-mirtenol, para o tratamento de problemas respiratório e infecções virais. E as outras patentes protegem a síntese, produção, utilização como controle de insetos em lavouras e ainda outra como componente de isolamento elétrico.

Portanto fica evidente dentro do campo da pesquisa visando à inovação tecnológica tem grandes possibilidades de desenvolvimento de novos estudos científicos nas mais diversas áreas do conhecimento.

De acordo com o apresentado na **tabela 2** a versatilidade e importância da realização de pesquisas para desvendar utilizações e propriedade do (-)-mirtenol, principalmente farmacológicas, pois como podemos observar esse potencial ainda não foi amplamente protegido, por meio de depósitos de patentes e que nenhuma patente foi encontrada com utilização farmacológica aplicada ao sistema nervoso central.

**Tabela 02:** Principais inovações propostas pelas patentes depositadas.

<i>Número da Patente</i>	<b>Inovações</b>	<b>Títulos</b>	<b>Proprietários e/ou depositários</b>
<i>KR2012036052-A</i>	Utilização de cânfora / mirtenol para uso médico ou cosméticos, sintetizado por bactérias <i>Stereum hirsutum</i> .	Camphor/myrtenol compound for use in cosmetic or medical material, is prepared by growing <i>Stereum hirsutum</i> bacteria in culture medium and applying alpha-pinene on culture medium, where pinene applied culture medium is utilized as substrate	LEE SY; KIM SH; HONG CY; LEE JJ; CHOI IG
<i>CN101716209-A</i>	Utilização do óleo essencial de Artemisia que possui mirtenol em sua composição, para o tratamento de problemas respiratório.	Artemisia dalailamae volatile oil used for treating respiratory illness comprises alcohol, alkyl, alkene, and ketone including myrtenol, encalyptol, 1,3-dimethyl-5-ethyl benzene, myrcene, and (Z)-3,7-dimethyl-1,5,7-ocatrien-3-ol	LUO Z, MEI L, SHAO Y, TAO Y, ZHANG X



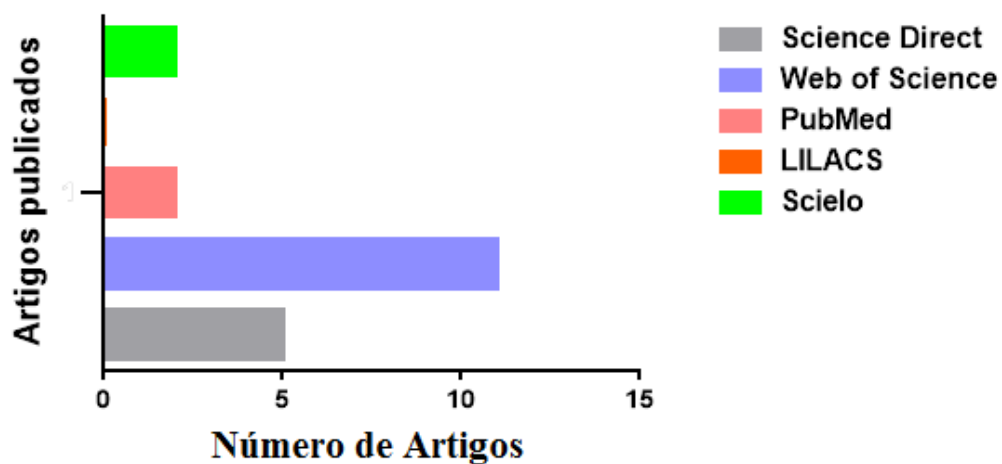
<i>FR2904728-A1</i>	Utilização do mirtenol e outros compostos para a produção de camadas de isolamento eléctrico.	Porogenic precursors for forming solid-free cavities in dielectrics of the matrix precursor type, e.g. for interlayer dielectrics in integrated circuits, comprise ethyl chrysanthemate, jasmone, myrtenol or mesitylene	VAUTIER M; SANDRE E
<i>WO2006087039-A1 ES2173816 A1</i>	Utilização do mirtenol e outros compostos provenientes de óleos essenciais de plantas no Tratar de infecções virais.	Treating a viral infection comprises administering a reengineered essential oil composition comprising a molecules e.g. monoterpenes and sesquiterpenes and a substance e.g. myrtenol and ethyl hexanoate	RODRIGUEZ-GONZA
<i>RU2176994-C1</i>	Síntese do mirtenol, através da oxidação do alfa-pineno com dióxido de selênio.	Method of preparing myrtenol, involves oxidizing alpha pinene with selenium dioxide to distill off highly volatile products with steam, stirring, filtering, distilling and reducing with alkali metal boron hydride of myrtenal	KUCHIN AV; FROLOVA LL; DREVAL IV; PANTELEEVA MV;
<i>US6203786-B1</i>	Composição a bases de alfa-pineno, notrans-verbenol juntamente com mirtenol, com finalidade de atrair e capturar besouros.	Composition for attracting pine shoot beetles comprises alpha-pinene and trans-verbenol together with myrtenol, nonanal and/or alpha-pinene oxide	TEALE SA; CZOKAJLO D;

<i>FR2623809-A1</i>	Utilização do mirtenol na síntese de uma nova substância (35,34)-7-hidroxi-delta-6-tetra um derivado do hidro-canabinol, que possui atividade analgésicos, antieméticos e anti: atividade glaucoma.	New (35,34)-7-hydroxy-delta-6-tetra:hydro-cannabinol derivs. - with analgesic, antiemetic and anti:glaucoma activity, prepd. in several steps from ortho-protected myrtenol	MECHOULAM R, FEIGENBAUM J, SREBNIK M, LANDER N
<i>FR2267296-A1</i>	O mirtenol e produzido por isomerização do beta-pineno epóxido em presença de reagente fortemente básico.	Myrtenol synthesis - by isomerisation of beta-pinene epoxide	ANVAR AGENCE NAT VALORIZAÇÃO
<i>KR1011812430000</i>	Um método de bioconversão incluindo do alfa-pineno para a cânfora ou mirtenol utilizando bactérias <i>Stereum hirsutum</i> .	Use of <i>Stereum hirsutum</i> from $\alpha$ -pinene as a substrate to camphor or myrtenol, a method for biological conversion to camphor or myrtenol, and cosmetic or medical low materials thereof	LEE, SU-YEON   KIM, SEON- HONG
<i>RU02176994</i>	Um método para a produção de mirtenol. O método envolve a oxidação de $\alpha$ -pineno com produtos voláteis de dióxido de selênio por destilação com vapor.	Method of preparing myrtenol	KUCHIN A.V.

## b) PROSPECÇÃO CIENTÍFICA

Para correlacionar os achados das patentes, que obtiveram apenas pedidos de depósito referente ao (-)-mirtenol, o estudo prospectivo foi feito uma busca nas principais bases de artigos pesquisando a palavra-chave “mirtenol” e “myrtenol” nos títulos dos principais periódicos científicos: Science Direct, Web os Science, PubMed, Scielo e LILACS onde foram encontrados um total de 17 artigos (**Figura 5**).

**Figura 5:** Artigos publicados em suas respectivas bases.



Podemos observar que a Web of Science foi a base que teve uma maior quantidade de artigos publicados totalizando 11, seguida pela Science Direct com 5 artigos, isso pode ser explicado pelo fato dessas bases serem as mais abrangentes e as que possuem a maior quantidade de periódicos indexados, essa quantidade reduzida de artigos científicos publicados evidência a lacuna que existe no desenvolvimento da pesquisa o que elucida a necessidade da realização de novas pesquisas para desvendar utilizações e propriedades do (-)-mirtenol em diversas áreas de aplicação, contribuindo ainda com a pesquisa de desenvolvimento de fitoterápico, uma vez que os óleos essenciais de várias espécies principalmente da família das *Myrtaceae* tem mirtenol como componente majoritário.

**Tabela 3:** Artigos encontrados e selecionados de acordo com os critérios adotados.

<b>Base de dados</b> <b>Palavra pesquisada</b>	<b>Science Direct</b>	<b>Web os Science</b>	<b>PubMed</b>	<b>Scielo</b>	<b>LILACS</b>
<b>Myrtenol</b>	5	11	2	1	0
<b>Artigos Excluídos</b>	0	3	1	1	0
<b>Artigos Repetidos</b>	1	4	1	0	0
<b>Artigos Selecionados</b>	4	4	0	0	0
<b>Total</b>			8		

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão adotados, os artigos encontrados nas bases de dados pesquisados, apenas 8 artigos mostram informações relevantes a respeito do (-)-mirtenol. Abordado suas utilizações e propriedade físico-químicas. Sendo cinco artigos relacionados a síntese de novos compostos ou grupos de composto a partir do (-)-mirtenol, dois artigos de revisão mostrando as principais características desse monoterpene, e o estudo de Kenney e Fisher descrevendo a síntese do (-)-mirtenol por meio da oxidação de  $\alpha$ -pineno.

Nos estudos de Bhatia e colaboradores (2008) e Ford (1992) descrevem as principais características do (-)-mirtenol; utilização, propriedades físicas, aspectos organolépticos, obtenção e estudos de toxicidade. O (-)-mirtenol a temperatura ambiente é um líquido quase incolor com odor herbáceo, possui ponto de ebulição 224 °C, pressão de vapor 0,006 mmHg (20 °C) (BHATIA et al., 2008; FORD, 1992)

A principal utilização do (-)-mirtenol descrita pelos artigos selecionados é como matéria prima em processos de sínteses orgânica, como a síntese de amins secundárias utilizando nanopartículas de ouro como catalisador, na presença de diferentes óxidos de metais ( $ZrO_2$ ,  $MgO$ ,  $Al_2O_3$ ,  $CeO_2$ ,  $La_2O_3$ ) com rendimento de 52%, um processo de aminação seletivo com grande interesse prático para o desenvolvimento de novos produtos com propriedades farmacêuticas (DEMIDOVA et al., 2013). Síntese de fenóis lipofílicos com atividades biológicas, através da alquilação do (-)-mirtenol na presença de fenóxido de alumínio e isopropóxido de alumínio a 120-160 °C (KOROLEVA et al., 2011). Também a síntese de cetonas pró-quirais catalisada por hidreto de alumínio e lítio a partir do (-)-mirtenol como precursor, com rendimento de 57-98% (LU; LIU, 1994).

Além de ser precursor de vários grupos de composto, o (-)-mirtenol é substrato para a síntese de novas substâncias, como o mirtenil metacrilato, um novo monômero metacrilato

com propriedades biocidas (LEPOITTEVIN et al., 2011) e a síntese do 2-hidroxitetra triciclo a partir da reação de hidroformilação (SIROL et al., 1999).

No entanto apenas um artigo descreve um processo de obtenção do (-)-mirtenol, nos estudo de Kenny e Fisher, os autores propõe sua síntese pela oxidação do  $\alpha$ -pineno usando clorofila naturais, sob a forma de extratos de folha com 92% de pureza e 65% de rendimento de (-)-mirtenol (KENNEY; FISHER, 1973). Um método relativamente simples e com um rendimento satisfatório possibilitando um fácil obtenção do (-)-mirtenol.

Nos artigos encontrados foram observados um quantidade reduzida de trabalhos realizados utilizando o (-)-mirtenol, evidenciando a necessidade da investigação de seu potencial, pesquisas que pode ser fundamentas nas propriedades descritas na literatura.

## CONCLUSÃO

A presente prospecção revelou uma quantidade reduzida de patentes que não evoluíram com o passar dos anos, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de pesquisas seguidas de pedidos de proteção de suas tecnologias desenvolvidas, também uma quantidade reduzida de artigos científicos publicados mostrando a deficiência da realização de pesquisas científicas, evidenciando a necessidade da realização de novos investimentos, para investigar todo o potencial farmacológico do (-)-mirtenol. Favorecendo um panorama geral para estudos futuros, tendo em vista que o (-)-mirtenol é um constituinte químico pouco explorado, mas com potencial promissor baseado nos estudos já realizados.

## REFERÊNCIAS

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, Supplement, p. S237-S240, 2008.

COSTA, T. M.; NUNES, M. A. S. PROSPECÇÃO DE PATENTES DE PERSONALIDADE NOS JOGOS. **Cadernos de Prospecção**, v. 7, n. 1, p. 50, 2014.

DE SOUSA, D. P. et al. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. **ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C**, v. 62, n. 7/8, p. 563, 2007.

DEMIDOVA, Y. S. et al. One-pot myrtenol amination over Au nanoparticles supported on different metal oxides. **Applied Catalysis A: General**, v. 464, p. 348-356, 2013.

FORD, R. Myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, Supplement 1, n. 0, p. 93-94, 1992.

GOMES, S. M. et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

KENNEY, R.; FISHER, G. Preparation of trans-Pinocarveol and Myrtenol. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 12, n. 4, p. 317-319, 1973.

KOROLEVA, A. et al. Alkylation of phenol by myrtenol. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 4, p. 556-565, 2011.

LEPOITTEVIN, B. et al. Radical polymerization and preliminary microbiological investigation of new polymer derived from myrtenol. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 9, p. 1842-1851, 2011.

LU, T. J.; LIU, S. W. Asymmetric Reduction Using Lithium Aluminum Hydride Modified with Chiral Ligand Prepared from (1R)-(-)-Myrtenol. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 41, n. 2, p. 205-208, 1994.

MACEDO, M. F. G.; BARBOSA, A. F. Patentes, pesquisa e desenvolvimento. Fiocruz, 2000.

MARKMAN, B. E.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 1, p. 55-7, Sep 2004.

MELO FILHO, J. S. D.; MARACAÇA, P. B.; SILVA, R. A. D. O ETNOCONHECIMENTO DAS PLANTAS MEDICINAIS NO MUNICÍPIO DE CATOLÉ DO ROCHA, PARAÍBA. Programa de Pós Graduação em Sistemas Agroindustriais (Dissertações e Teses), v. 3, n. 1, 2014.

MOREIRA, M. R. C. et al. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO MIRTENOL: UM MONOTERPENO COM ATIVIDADE FARMACOLÓGICA SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL. Anais do Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica-SIMTEC, v. 1, n. 1, 2013.

MOREIRA, M. R. C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol, a monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, 2014.

PASCOAL, A. C. R. F. et al. Essential Oil from the Leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 34-37, 2011/09/01 2011.

PERUCCHI, V.; MUELLER, S. P. M. Estudo com as patentes produzidas eo perfil dos inventores dos Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia. **RDBCI**, v. 12, n. 1, p. 191-213, 2014.

SIROL, S. et al. Determination by 1D NOE studies of the stereochemistry of a tricyclic 2-hydroxytetrahydrofuran derivative obtained by hydroformylation of (1R)-(-)-myrtenol. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 127-132, 1999.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. D. L. Popular phytotherapy: the instrumental search as therapy. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VIGNOLI-SILVA, M.; BANDEIRA, G. C.; LANDO, V. R. *Campomanesia xanthocarpa* (MYRTACEAE): DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DE METABÓLITOS ATIVOS NOS FRUTOS FRESCOS, CONGELADOS E EM GELEIA. 2013.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, 2003.





**Capítulo 2: Obtenção e caracterização do complexo de inclusão (-)-  
mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina**

## Obtenção e caracterização do complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina

Oskar Almeida Silva<sup>1</sup>; Márcio dos Santos Rocha<sup>2</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1</sup>; Maria das Graças Freire Medeiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Geoquímica Orgânica – LAGO, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

### Resumo

O (-)-mirtenol é monoterpene de função alcoólica, encontrados nos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas e por se tratar de uma substância volátil, de baixa estabilidade em temperatura ambiente, sendo necessária o uso de ferramentas de estabilização de moléculas, neste caso a formação de complexo utilizando polímeros derivados de moléculas de glicose, a  $\beta$ -ciclodextrina. Para a obtenção do complexo de inclusão mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina, foi utilizado o método de secagem por *spray drying*. Para caracterização dos complexos foram utilizados Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG/DTG) e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF). De acordo com as ferramentas de caracterização utilizadas podemos inferir a formação do complexo de inclusão entre o (-)-mirtenol com  $\beta$ -Ciclodextrina utilizando método de secagem por *spray drying* de acordo com as diferenças nas propriedades físico-químicas do (-)-mirtenol e seu complexo obtido.

**Palavras-Chave:**  $\beta$ -ciclodextrina, Complexo de inclusão, (-)-mirtenol.

## **Preparation and characterization of $\beta$ -cyclodextrin-(-)-myrtenol inclusion complex**

### **Abstract**

The (-) - myrtenol monoterpene alcohol function is found in essential oils of plants and some aromatic since it is a volatile substance of low stability at room temperature, requiring the use of tools stabilizing molecules, in this case complex formation using derivatives of glucose molecules polymers, the  $\beta$ -cyclodextrin. To obtain the complex myrtenol- $\beta$ -cyclodextrin inclusion was used method of drying by spray drying. For characterization of the complexes were used Differential Scanning Calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG / DTG) and Infrared Spectroscopy Fourier transform (FT-IR). According to the characterization tools used to infer formation of an inclusion complex between the (-) - myrtenol with  $\beta$ -cyclodextrin drying using a spray drying method according to the differences in the physicochemical properties of (-) - myrtenol and its complex obtained.

**Keywords**  $\beta$ -cyclodextrin, inclusion complex, (-) - myrtenol.

## INTRODUÇÃO

O (-)-mirtenol é um monoterpreno de função álcool encontrado nos óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas, é amplamente utilizado na indústria cosmética e de produtos de limpeza. São consumidos cerca de 0,1 toneladas de (-)-mirtenol por ano em todo mundo (BHATIA et al., 2008). Assim como outros constituintes dos óleos essenciais também apresenta a característica de muito volátil, possui aspecto claro, quase incolor com um odor herbáceo (FORD, API; LETIZIA, 1992).

Os Estudos vêm mostrando, ao longo do tempo, que o (-)-mirtenol possui ação no sistema nervoso central, ao mesmo tempo evidencia a carência de uma investigação mostrando as propriedades farmacológicas desse monoterpreno e possíveis mecanismos de ação e viabilização de um produto farmacêutico, disponibilizado no mercado (DE SOUSA et al., 2007; KESSLER et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

Outro entrave demonstrado na literatura, diz respeito às suas propriedades físico-química, na qual a sua volatilidade inviabiliza sua manipulação direta de transformação numa forma farmacêutica e conseqüentemente a conservação. No entanto faz-se necessário à utilização de ferramentas de estabilização de moléculas voláteis objetivando melhorias na sua solubilidade e estabilidade (ASTRAY et al., 2009).

A estabilização dos óleos essenciais e monoterprenos tem sido de grande relevância para o desenvolvimento de matérias-primas para as indústrias de perfumaria, alimentos e farmacêutica, através da formação de complexos de inclusão com ciclodextrina (CD), apresenta-se como um meio efetivo de protegê-los, tornando-os, desta forma, mais estáveis física e quimicamente (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; HADARUGA et al., 2007; LOFTSSON; DUCHENE, 2007; MARQUES, 2010).

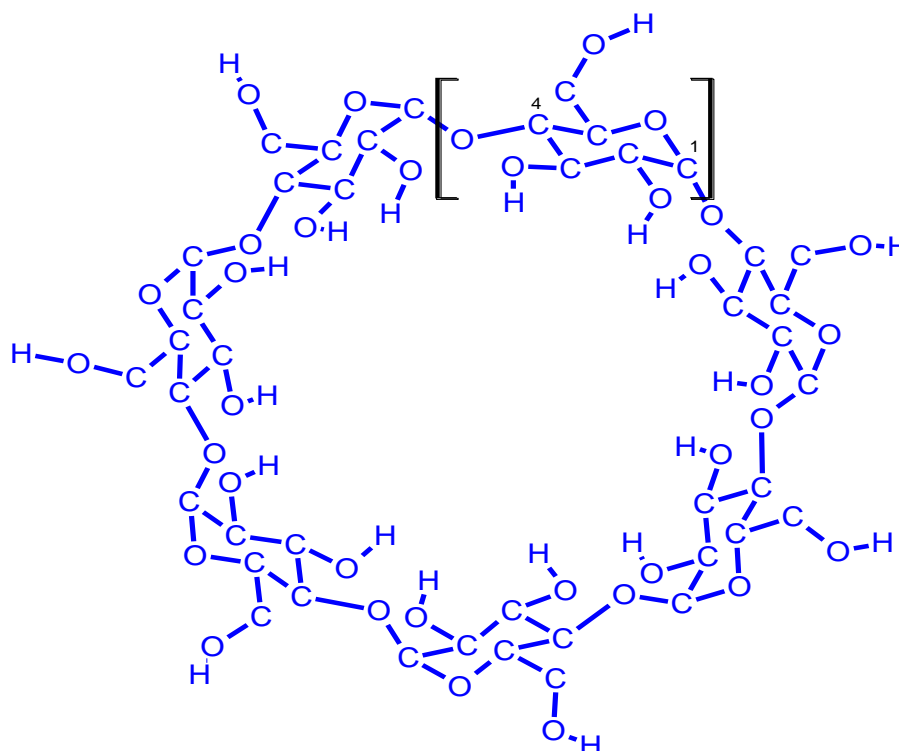
Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais, compostos voláteis como várias propriedades biológicas descritas pela literatura; a maioria destes efeitos são atribuído à monoterprenos (SILVA et al., 2014).

As ciclodextrinas são classificadas em naturais ou semissintéticas, utilizadas em formulações e como carreadores de fármacos. Sua importância pode ser explicada, pelo aumento do número de medicamentos disponíveis no mercado que utilizam CD como adjuvante e principalmente como complexante (GIORDANO,NOVAK; MOYANO, 2001; GÓRNAS et al., 2009).

A  $\beta$ -ciclodextrina, que é um oligossacarídeo cíclico natural formado por sete unidades de d-glicose articulado por ligações  $\alpha(1,4)$  - glicosídicas (**Figura 1**), com formato tronco

cônico oco. Possui capacidade anfifílica, hidrofóbica na parte exterior da cavidade e hidrofóbico na cavidade interior, possibilitando a formação de complexos de inclusão com vários compostos orgânicos (XU,SONG; WANG, 2008).

**Figura 1:** Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina, e suas ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, *ACD/ Labs ChemSketch Free Hardware*.



Fonte: Autoria própria.

A complexação de óleos essenciais e componentes voláteis com ciclodextrinas são bastante convenientes, reduz a volatilidade e efeitos biológicos indesejáveis como toxicidade, além de aumentar a estabilidade térmica, tornando-os mais estáveis e modificando as propriedades físico-químicas, transformando um produto líquido numa forma sólida, tornando-os mais adequados a manipulação, além de aumentar a solubilidade em água (LOFTSSON E DUCHÊNE, 2007; HADARUGA, et al., 2010).

Os complexos de inclusão, quando formados, entre molécula hóspede e hospedeira sofrem mudanças nas suas propriedades físico-químicas, as quais podem ser usadas para identificar a formação do complexo de inclusão.

O presente trabalho tem como objetivo a estabilizar o (-)-mirtenol através da formação de complexo de inclusão do monoterpene (-)-mirtenol com  $\beta$ -ciclodextrina, utilizando o

método de secagem com *spray drying* para retirada do solvente e obtenção do complexo na forma de pó.

O complexo foi caracterizado por métodos espectroscópicos e termogravimétricos. A complexação é de extrema importância para a viabilidade do desenvolvimento de futuros medicamentos, por se tratar de uma substância volátil e com solubilidade reduzida em água.

## MATÉRIAS E MÉTODOS

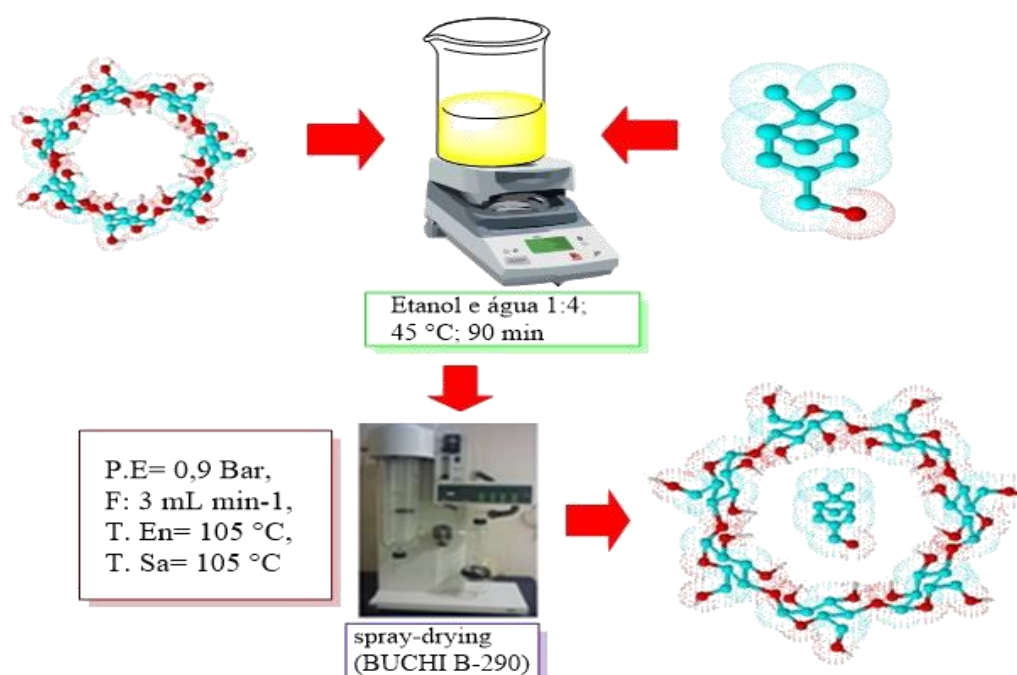
### Substâncias

O (-)-mirtenol, ((1R)-6,6-Dimethylbicyclo[3.1.1] hept-2-ene-2-methanol) e  $\beta$ -ciclodextrina foram obtidos na Sigma Aldrich<sup>®</sup> com o grau de pureza de 98% .

### Método de preparação do complexo de inclusão (MIR- $\beta$ CD)

Quantidades equimolares de MIR e  $\beta$ -CD foram solubilizadas em etanol PA e em água destilada aquecida a 45 °C, respectivamente. As duas soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético, por 90 minutos, a solução foi injetada no aparelho *spray-drying* de bancada (BUCHI B-290) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, com um fluxo da amostra de 3 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de entrada de 105 °C e temperatura da amostra de 60 °C. Foi calculado o rendimento do pó em seguida foi armazenado em dessecado até a realização das análises.

**Figura 2:** Método de obtenção do complexo mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina.



### *Mistura física*

A MF foi obtida por homogeneização durante 20 min em grau de porcelana com auxílio de pistilo na proporção 1:1 (mol:mol). Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250  $\mu\text{m}$  e armazenados em dessecador até a realização da análises.

### *Diagrama de Solubilidade do (-)-mirtenol*

O estudo de solubilidade foi realizado conforme o método descrito por HIGUCHI e CONNORS (1965), adicionando-se excesso de (-)-mirtenol nos tubos de ensaio contendo soluções aquosas com concentrações crescentes de  $\beta$ -CD (0 – 10 mM). As amostras foram mantidas em agitação constante durante 72 horas. Alíquotas foram retiradas, filtradas e diluídas em água destilada. O conteúdo foi determinado em espectrofotômetro em 205 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A constante de estabilidade ( $K_c$ ) foi calculada com os dados obtidos da equação da ciclodextrina, usando a seguinte fórmula:  $K_c = \text{Inclinação} / S_0 (1 - \text{Inclinação})$  onde,  $S_0$  corresponde à solubilidade intrínseca do (-)-mirtenol.

### **Caracterização do complexo de inclusão**

#### *Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)*

Nas amostras MIR-CD, MF,  $\beta$ -CD e o MIR utilizou-se o método FTIR-ATR com capacidade de análise e acessibilidade  $4\text{cm}^{-1}$ , 16 escaneamentos com variação de 500 a 4000.

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

Cinco miligramas (5,0 mg) das amostras MIR-CD, MF,  $\beta$ -CD e o MIR foram colocadas em uma porta de alumínio, analisadas por uma taxa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  entre 0 e  $500^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $40\text{mL}/\text{min}$ .

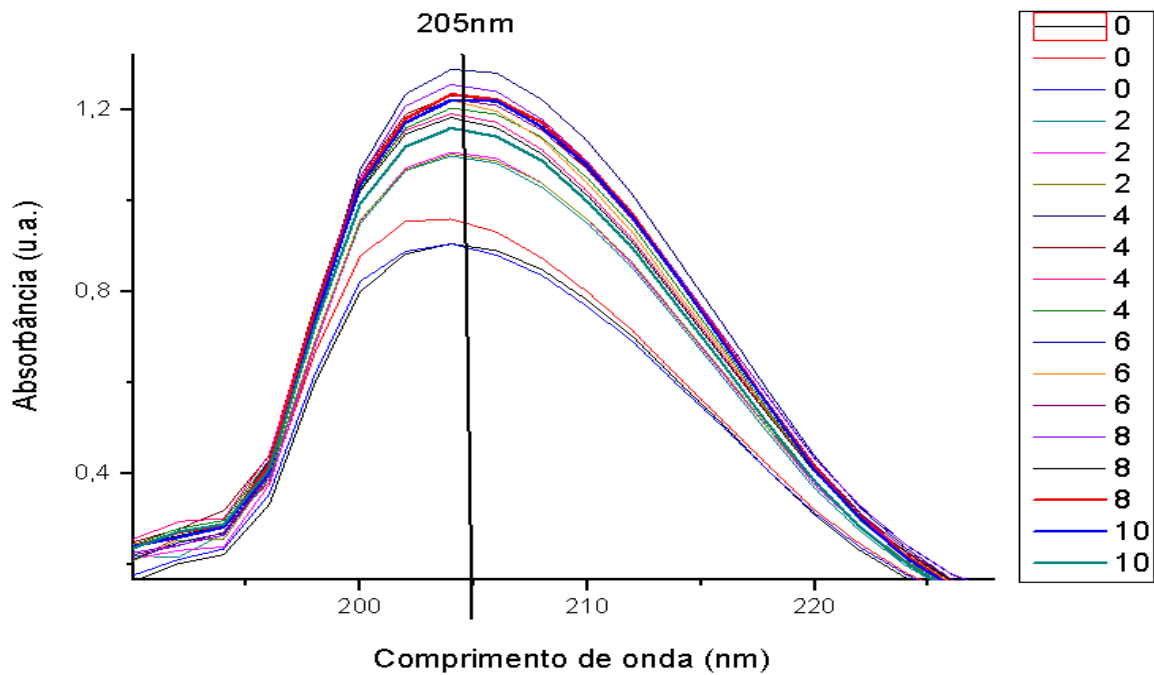
#### *Termogravimetria (TG/DTG)*

A caracterização termo analítica através de TG e DTG foram realizadas em duplicata por meio de termo balança, modelo TGA Q50, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de  $50\text{mL}/\text{min}$ , sendo a massa da amostra equivalente a cerca de  $2,0\text{ mg} (\pm 0,2)$ , acondicionadas em cadinho de alumina e analisadas na faixa de temperatura de 0 a  $600^\circ\text{C}$  na taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

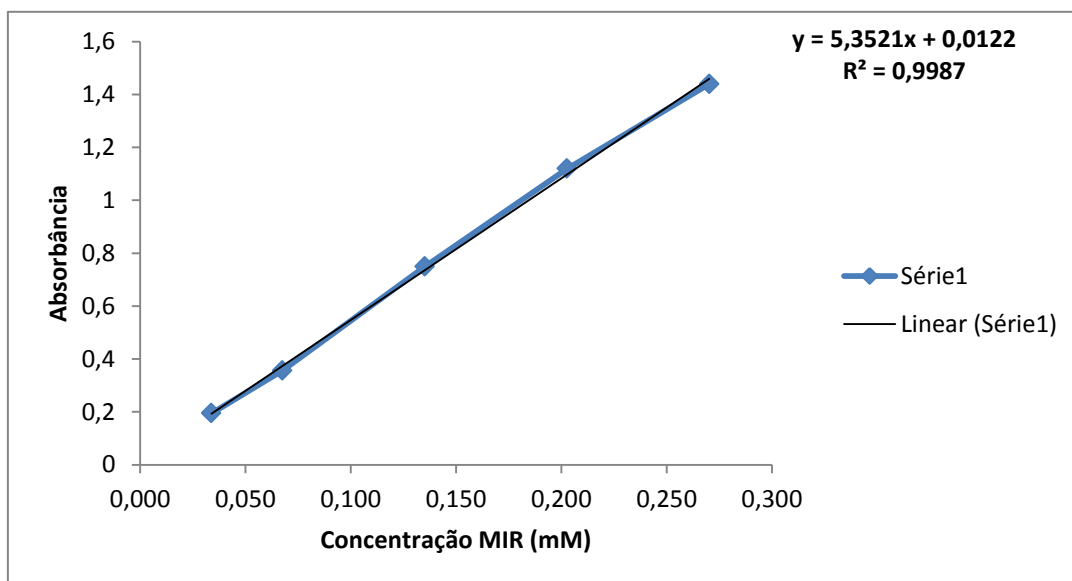
## RESULTADOS e DISCUSSÃO

Por meio da leitura espectrofotométrica observou-se que o (-)-mirtenol tem um pico máximo de absorvância em 205 nm em etanol. A curva de calibração do (-)-mirtenol foi construída em 205 nm e a equação foi  $y = 0,0362x + 0,0122$  (**Figura 3**). A correlação foi 0,9987, onde X é a concentração de (-)-mirtenol (mM), e Y era a absorvância a 205 nm.

**Figura 3:** Leitura espectrofotométrica do (-)-mirtenol.



**Figura 4:** Curva de calibração do (-)-mirtenol.

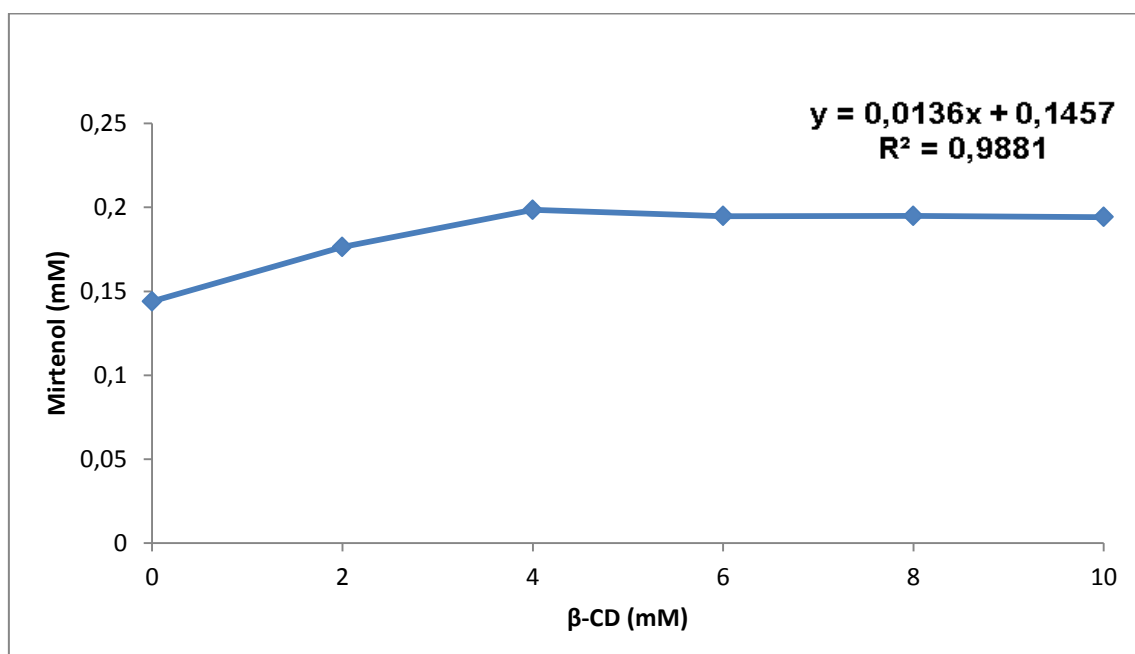




Na determinação da constante de estabilidade através do método de solubilidade consiste em adicionar quantidades em excesso de moléculas hóspedes em soluções de CD em várias concentrações, submetida à agitação e temperatura constante. Ao final do processo de agitação é atingido um estado de equilíbrio, onde a fase solúvel é analisada para a determinação de da quantidade de moléculas hóspedes. Foi obtido um diagrama de solubilidade do tipo B correspondendo a formação de complexos de solubilidade limitada e inferior à da ciclodextrina ou um composto de inclusão com uma solubilidade definida (DUCHÊNE, 1987).

O diagrama de solubilidade obtido a partir da  $\beta$ -CD demonstrou inicialmente um aumento linear da solubilidade do (-)-mirtenol até um certo ponto atingindo-se o seu valor limite de solubilidade, caracterizando-o como um diagrama do tipo Bs (**Figura 5**). Neste tipo de diagrama a adição de mais ciclodextrina resulta na formação de mais complexo com consequente precipitação e a concentração do (-)-mirtenol não complexado é mantida constante pela sua solubilização (VEIGA et al., 1996; RIBEIRO, 2008).

**Figura 5:** Diagrama de solubilidade de (-)-mirtenol em presença de  $\beta$ -CD.



A constante de estabilidade ( $K_c$ ) geralmente está compreendida entre os valores de 0 e  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , sendo que quando a constante obtida com o valor igual a zero o fármaco é incapaz de formar um complexo de inclusão com ciclodextrina (STELLA; RAJEWSKI, 1997). Quanto maior a constante de dissociação, mais forte será a ligação entre fármaco e ciclodextrina e consequentemente mais lenta a cinética de dissociação (STELLA et al., 1999).

A constante de estabilidade ( $K_c$ ) do sistema (-)-mirtenol com  $\beta$ -ciclodextrina obtido foi de  $95 \text{ M}^{-1}$ , indicando a existência de uma interação entre os mesmos. Apesar da determinação de uma constante de dissociação na faixa de aceitabilidade para a ocorrência da complexação, estudos posteriores são necessários que corrobore com os resultados obtidos, como simulação computacional e análises de RMN.

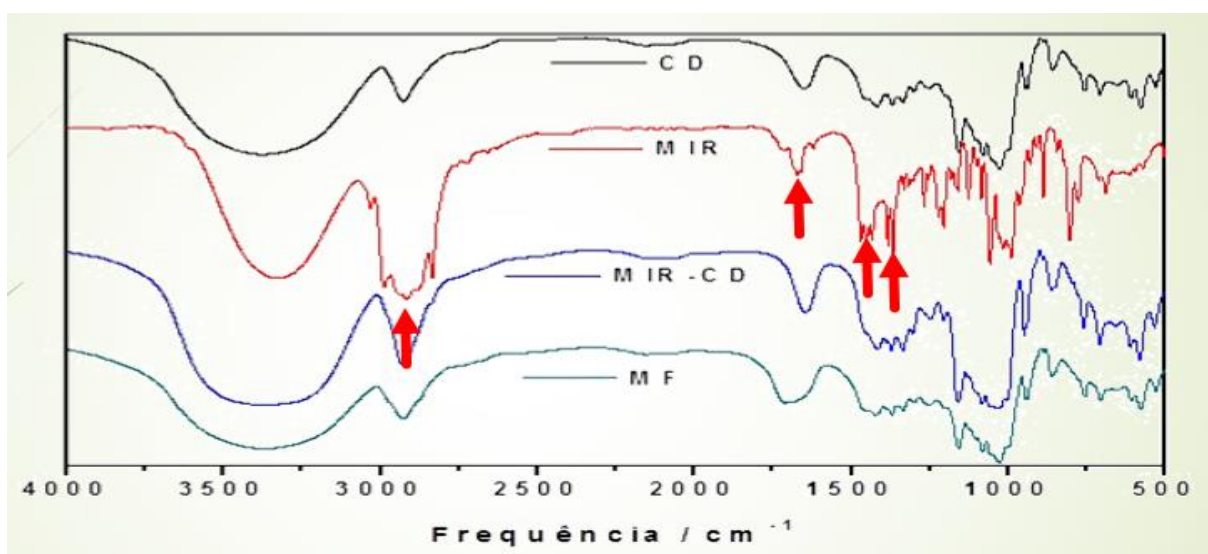
#### *Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)*

A espectroscopia de infravermelho é um método analítico utilizado para verificação da formação de complexos na fase sólida através da interação entre diferentes moléculas, onde é comparado os espectros de infravermelho da substância hospede e dos complexos obtidos (SPRICIGO et al., 2008; MACEDO, 2010).

Na análise dos espectros são observados as interações moleculares, mudanças de forma e posição das faixas de absorvâncias referente a cada grupo funcional e estrutura da molécula analisada (LYRA et al., 2010), quando comparamos os espectros da mistura física normalmente é observado a sobreposição dos espectros da CD e da molécula hospede, as mudanças de bandas na posição, diminuição ou desaparecimento na molécula hospede indicam a formação do complexo de inclusão (CORTI et al., 2007).

Nos espectros de infravermelho da  $\beta$ -ciclodextrina, foram observadas bandas de absorção de  $3351 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H),  $2918 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H),  $1162 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O),  $1033 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O-C). No espectro de IV do (-)-mirtenol observamos banda de absorção características dessa molécula de  $3034$  a  $2832 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H, referente aos CH do ciclo),  $1616 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C) e  $1366$  e  $1433 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H, referente as metilas). No espectro do complexo MIR-CD as bandas de  $3034$  a  $2832 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H) e  $1366$ ;  $1433 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H, referente as metilas) do (-)-mirtenol foram deslocadas, a banda  $1616 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C) desaparece do IV do complexo. É observado uma forte semelhança com o espectro da  $\beta$ -ciclodextrina, esta semelhança indica uma grande possibilidade da ocorrência da complexação e a comprovação que suas ligações estão diretamente envolvidas na formação do complexo (**Figura 6**).

**Figura 6:** Espectros de IV das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF).

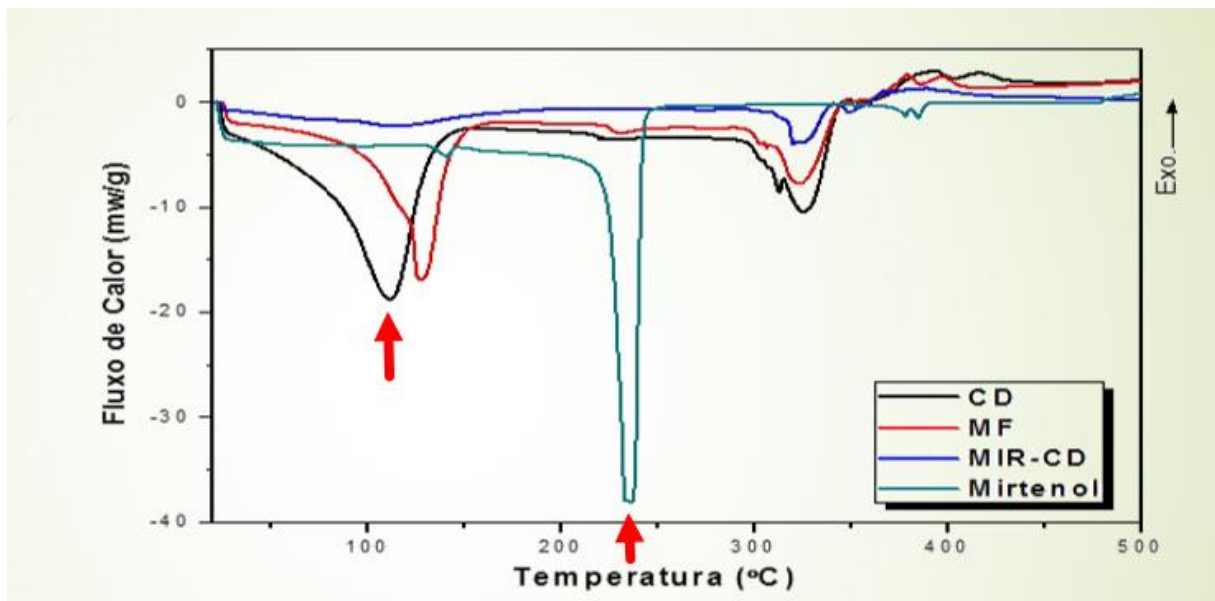


#### *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

A técnica de DSC indica a formação de um complexo de inclusão através do desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações de entalpia da molécula hospedeira ou complexada (FIGUEIRAS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). É uma técnica secundária normalmente complementar as técnicas de identificação espectroscópica (MILLER, CARRIER; AHMED, 2007).

O pico endotérmico de 120 °C  $\beta$ -CD e na MF indica a saída da molécula de água na cavidade hidrofóbica. Este pico desaparece no complexo indicando que o deslocamento das moléculas de água pelas de (-)-mirtenol, confirmando a formação do complexo. O pico exotérmico a 230 °C do (-)-mirtenol desaparecendo no termograma do complexo indica a maior estabilidade do (-)-mirtenol no complexo quando comparado com a forma livre (**Figura 7**).

**Figura 7:** Termogramas de DSC das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF).



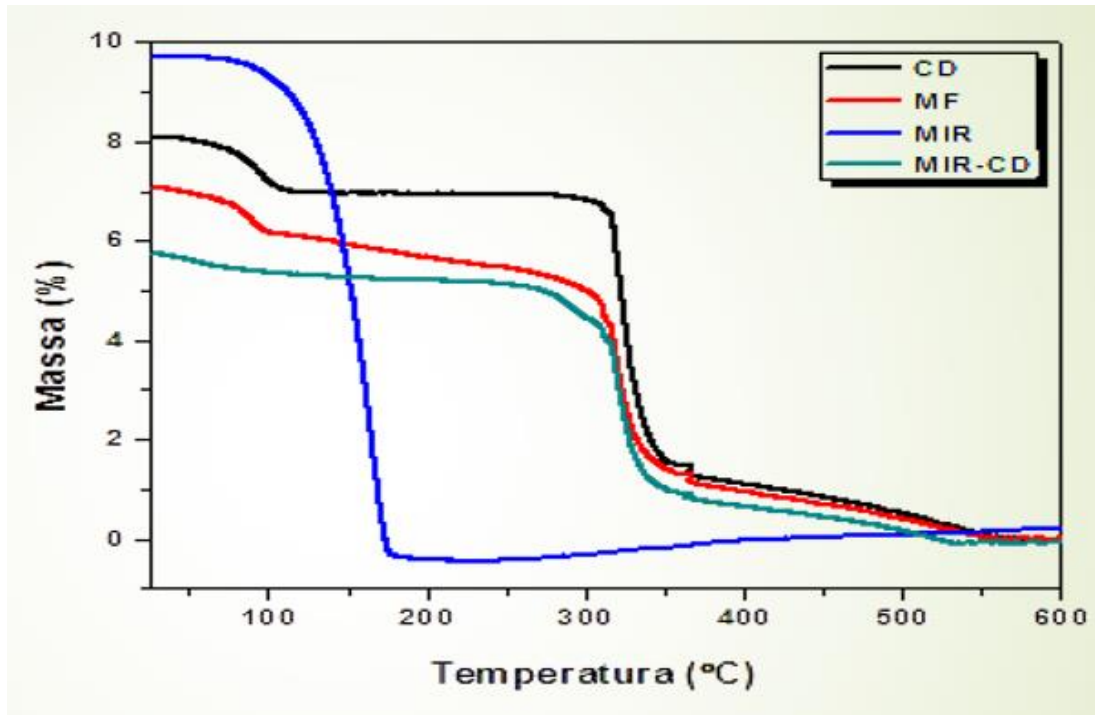
#### *Termogramas TG/DTG*

Uma das formas mais usadas para a investigação de interações entre moléculas hospedes e ciclodextrina em sistemas sólidos é a análise térmica, pois proporciona uma visão geral a respeito da estabilidade do sistema e sua cristalinidade e informações quantitativas sugerindo o grau de complexação. Como toda técnica apresenta suas limitações e necessita de técnicas complementares para um estudo completo da formação de um complexo (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2009).

A utilização da técnica de termogravimetria (TG), é possível detectar a formação de complexos de inclusão, através da comparação da temperatura de início da degradação da molécula hospede com o do provável complexo. Na possibilidade da formação do complexo, a degradação da molécula hospede acontecerá em temperaturas superiores a da molécula livre sugerindo uma proteção da mesma pela molécula de ciclodextrina (CANOTILHO,SOUZA; PINTO, 1992; TAKAHASHI, 2009).

Nas curvas de TG das espécies livres e complexadas verifica-se que a decomposição térmica do complexo MIR-CD ocorre em 280 °C, uma temperatura superior à da decomposição das espécies livres, onde o MIR apresenta temperatura de decomposição de 120 °C e a CD de 325 °C. Isto evidencia um ganho de estabilidade térmica para a substância complexada, provavelmente como resultado de interações do (-)-mirtenol com a cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina (**Figura 8**).

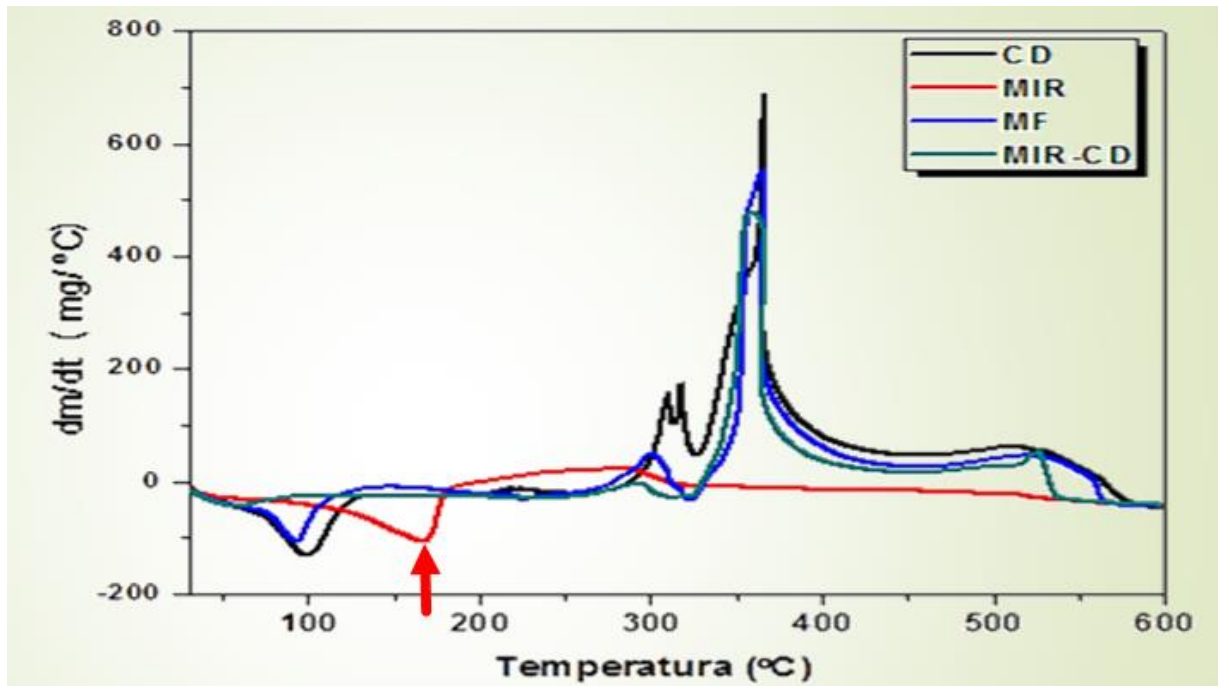
**Figura 8:** Curvas de TG das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF).



A análise térmica diferencial (DTA) e uma técnica térmica de quantificação da diferença de fluxo de calor entre a amostra e uma amostra de referência, onde é programado a temperatura (aquecimento ou resfriamento) a qual as amostras serão submetidas, juntamente com a verificação da velocidade de alteração da massa (CANOTILHO, SOUZA et al., 1992; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Foi verificado nas curvas de DTG um evento endotérmico associado a ebulição do (-)-mirtenol em 168,49 °C, que não foi verificado na curva do complexo, evento associado a formação do complexo de inclusão. Este fato pode sugerir que as moléculas de (-)-mirtenol migraram para o interior da cavidade da  $\beta$ CD (**Figura 9**).

**Figura 9:** Curvas de DTG das moléculas de ciclodextrina (CD), (-)-mirtenol (MIR), complexo (MIR-CD) e mistura física (MF).



Nos resultados obtidos podemos observar diferenças físico-químicas entre o (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão, esses achados são fortes indícios da formação do complexo, porém é necessário a realização de estudos complementares para avaliar estabilidade do complexo. A diferença entre as amostras são determinantes para comprovar que trata se de comportos diferentes, sendo assim seguramente houve a formação do complexo de inclusão.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos inferir a formação do complexo de inclusão entre (-)-mirtenol com  $\beta$ -Ciclodextrina pelo método de secagem por *spray drying*, possibilitando uma melhor estabilidade por tratar-se de uma molécula volátil. Os resultados da espectroscopia de IV, DSC e TG/DTG demonstram diferenças nas propriedades físico-químicas do (-)-mirtenol e seu complexo, confirmando a formação do mesmo e aumento da estabilidade térmica.

## REFERÊNCIAS

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, 2009.

BHATIA, S.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.; API, A. Fragrance material review on myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S237-S240, 2008.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

CANOTILHO, J.; SOUZA, A.; PINTO, J. Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica. **Rev. Port. Farm**, v. 42, n. 4, p. 5-12, 1992.

CORTI, G.; CAPASSO, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.

CUNHA-FILHO, M.; SÁ-BARRETO, L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.

DE SOUSA, D. P.; RAPHAEL, E.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. **ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C**, v. 62, n. 7/8, p. 563, 2007.

DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their industrial uses. Editions de santé, 1987. ISBN 2864110199.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R. A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; VEIGA, F. J. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 2, p. 531-539, 2007.

FORD, R.; API, A.; LETIZIA, C. Monographs on fragrance raw materials. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 30, p. 1S, 1992.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.



GÓRNAS, P.; NEUNERT, G.; BACZYŃSKI, K.; POLEWSKI, K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 190-196, 2009.

HADARUGA, D. I.; HADARUGA, N. G.; RIVIS, A.; GRUIA, A.; PINZARU, I. A. Thermal and oxidative stability of the *Allium sativum* L. bioactive compounds/alpha- and beta-cyclodextrin nanoparticles. **Revista De Chimie**, v. 58, n. 11, p. 1009-1015, 2007.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instrum**, v. 4, n. 2, p. 117-212, 1965.

KESSLER, A.; SAHIN-NADEEM, H.; LUMMIS, S. C.; WEIGEL, I.; PISCHETSRIEDER, M.; BUETTNER, A.; VILLMANN, C. GABAA receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 4, p. 851-862, 2014.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

LYRA, M. A.; MARQUES, D.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MACEDO, O. D. Preparação e caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina. 2010. 81 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313-326, 2010.

MILLER, L. A.; CARRIER, R. L.; AHMED, I. Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 7, p. 1691-1707, 2007.

MOREIRA, M. R. C.; SALVADORI, M. G. D. S. S.; ALMEIDA, A. A. C. D.; SOUSA, D. P. D.; JORDÁN, J.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M. D.; ALMEIDA, R. N. D. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol, a monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, 2014.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. Análise térmica de materiais. São Paulo: Editora, p. 113-115, 2002.

RIBEIRO, A. Preparação, Caracterização e Aplicação de Complexos de Inclusão de Miconazol com Metil- $\beta$ -ciclodextrina: Administração Bucal (Master Tesis). Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A.; SANTOS, D.; VEIGA, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102-1109, 2008.

SILVA, R. O.; SALVADORI, M. S.; SOUSA, F. B. M.; SANTOS, M. S.; CARVALHO, N. S.; SOUSA, D. P.; GOMES, B. S.; OLIVEIRA, F. A.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.

SPRICIGO, R.; BOTELHO, K. C.; CONSIGLIERI, V. O.; SERRA, C. H. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 5, p. 645-53, 2008.

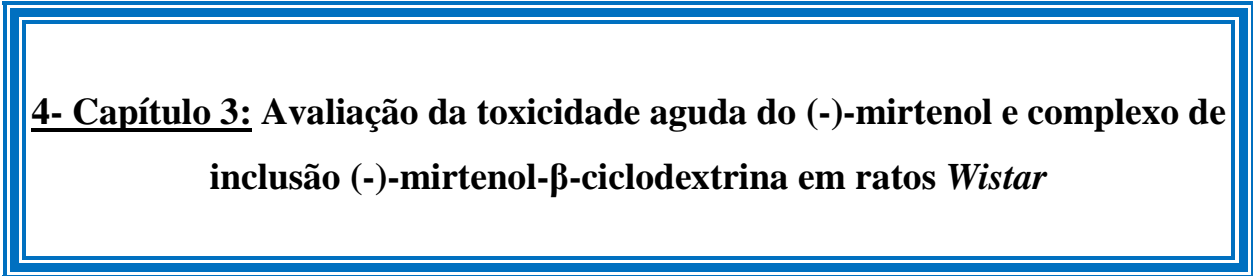

STELLA, V.; RAJEWSKI, R. Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 5, p. 556-567, 1997.

STELLA, V. J.; RAO, V. M.; ZANNOU, E. A.; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 3-16, 1999.

TAKAHASHI, A. I. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J.; KEDZIEREWICZ, F.; SOUSA, A.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International journal of pharmaceutics**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1996.

XU, P.; SONG, L. X.; WANG, H. M. Study on thermal decomposition behavior of survived  $\beta$ -cyclodextrin in its inclusion complex of clove oil by nonisothermal thermogravimetry and gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry analyses. **Thermochimica Acta**, v. 469, n. 1-2, p. 36-42, 2008.



**4- Capítulo 3: Avaliação da toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina em ratos *Wistar***

## **Avaliação da toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina em ratos *Wistar***

**Oskar Almeida Silva<sup>1</sup>; Aline Jeane Costa Sousa<sup>2</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1</sup>; Maria das Graças Freire Medeiros<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

### **RESUMO**

O (-)-mirtenol é um monoterpene com viabilidade farmacológica comprovada, com ação no sistema nervoso central, atividades anti-inflamatórias e antioceptiva. Representa uma fonte promissora para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas ligada a ação no SNC. O presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda do (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina testadas em modelos experimental em ratos adultos, tratados com a dose única de 2 g kg<sup>-1</sup>. Foram utilizados ratos *Wistar* albinos, pesando entre 250 a 300 g divididos em grupos de machos e fêmeas, com três animais por grupo. Os animais foram tratados por via intraperitoneal e oral, com (-)-mirtenol e complexo (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina em única dose de 2 g kg<sup>-1</sup> seguindo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do ano de 2013. A toxicidade avaliou as respostas comportamentais, bem como a taxa de mortalidade, peso corpóreo, consumo de água e ração, produção de excretas durante o período de 14 dias. Após o período de observação, os animais foram sacrificados e realizado a análise morfológica e macroscópica dos principais órgãos. Os resultados do *Screening* hipocrático mostrou à ausência de mortalidade e apresentou sinais clínicos discretos. Como estudo preliminar de toxicidade, não foi observado sinais de toxicidade aguda para o (-)-mirtenol e também para o complexo de inclusão, tendo assim, um nível de segurança aceitável, possibilitando a viabilidade e segurança para o desenvolvimento de novas pesquisas e futuros fitofármacos.

**Palavras chave:** Órgãos, *Screening* hipocrático, Segurança.

## Acute toxicity evaluation of (-) - myrtenol and inclusion complex of (-) - myrtenol- $\beta$ -cyclodextrin in rats

### ABSTRACT

The (-) - myrtenol is a monoterpene with proven pharmacological viability acting on the central nervous system, anti-inflammatory and antinoceptiva activities. Represents a promising source for the development of new therapeutic tools attached action in the CNS. This study aims to evaluate the acute toxicity of (-) - myrtenol and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin tested in experimental models in adult rats treated with a single dose of 2 g kg<sup>-1</sup>. Albino Wistar rats, weighing 250 to 300 g divided into groups of males and females, with three animals per group. The animals were treated intraperitoneally and orally with (-) - myrtenol complex and (-) - myrtenol- $\beta$ -cyclodextrin in a single dose of 2 g kg<sup>-1</sup> following the recommendations of the National Regulatory Agency 2013. Toxicity evaluated behavioral responses, as well as the mortality rate, body weight, water consumption and feed, excreta production during the period of 14 days. After the observation period, the animals were sacrificed and done morphological and macroscopic analysis of the major organs. The results of the screening showed Hippocratic the absence of discrete mortality and clinical signs presented. As a preliminary toxicity study, no significant signs of acute toxicity (-) - myrtenol and also the inclusion complex, and consequently an acceptable safety level enabling the feasibility and safety for the development of further research and future phytochemicals.

**Key word:** Organs, Hippocratic Screening, Security.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais por falta de acesso a outros tratamentos (SANTOS et al., 2013), porém muitas delas apresentam toxicidade relacionadas a constituintes presentes em sua composição (COAN; MATIAS, 2014) desta forma é de fundamental importância a realização de estudos toxicológicos a respeito da planta e de seus constituintes ativos, para garantir a qualidade, eficácia, segurança e conhecimento de seus efeitos adversos (SACHETTI et al., 2009).

Dentre as plantas medicinais podemos destacar as aromáticas, ricas em óleos essenciais, evocadas como fontes relevantes de produtos naturais (JÚNIOR, GRAÇA; SCHEFFER, 2004; BAKKALI et al., 2008). Nas flores e folhas das plantas aromáticas podemos encontrar os monoterpenos, que são metabolitos secundários constituintes dos óleos essenciais de várias destas espécies (CHAUDHARY et al., 2013). Estudos tem demonstrado que os monoterpenos possuem diversas propriedades farmacológicas (NAKAMURA et al., 1999; FRAGOSO et al., 2008; SILVA et al., 2014), porém triagens toxicológicas são importantes para garantir a segurança da utilização dessas substâncias (NANDHAKUMAR, PURUSHOTHAMAN; SACHDANANDAM, 2014).

A utilização de modelos animais para experimentação é de suma importância na pesquisa científica, principalmente para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre todas as espécies de animais utilizadas durante os últimos anos, a ordem dos roedores são os de maior destaque por possuírem características favoráveis para a prática científica como tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, precocidade, nutrição variada, fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e sociabilidade (LIMA et al., 2014).

Os roedores contemplam as espécies mais comumente utilizada na avaliação da toxicidade aguda de extratos ou constituintes isolados (PAUMGARTTEN et al., 1989; DE ALMEIDA et al., 2012; KOUADIO et al., 2014; XU et al., 2014), possibilitando a verificação do potencial toxicológico de novas substâncias e produtos que possam causar danos à saúde humana, bem como classificar essas substâncias de acordo com seu grau de letalidade ou toxicidade (VALADARES, 2007).

Desta forma o presente estudo busca conhecer o grau de toxicidade do mirtenol ([3.1.1] hept-2-eno-2-metanol, 6,6 - dimetil-; 6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-eno-2-metanol) um monoterpeno de função álcool, fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$ , massa molecular 152,24 (SIGMA ALDRICHBRASIL LTDA, 2014) encontrado também no óleo essencial de várias

espécies vegetais, principalmente na família Mirtaceae (AGOSTINI et al., 2005; DIAS; MIGUEL, 2005; POTZERNHEIM,BIZZO; VIEIRA, 2006; NOGUEIRA, DIAZ; SAKUMO, 2009) e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina.

O (-)-mirtenol tem uso consagrado na indústria cosmética, como componentes de perfumaria e produtos de higiene pessoal, exemplos de perfumes finos, xampus, produtos de limpeza e detergentes (BHATIA et al., 2008). Segundo o *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, concluiu que a substância é segura para a utilização como agente aromatizante (JOINT,ADDITIVES; ORGANIZATION, 2002) e reconhecida geralmente como seguro para sua utilização como ingredientes alimentícios pela *Flavor and Extract Manufacturers' Association (FLAVOR; ASSOCIATION, 1965)*, o que nos possibilita inferir uma margem de segurança para sua utilização, considerando o amplo espectro de uso nas indústrias alimentícia e cosmética.

Desta forma o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina em ratos adultos de ambos os sexos após tratamento com a dose única de  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , por via oral e intraperitoneal, com intuito de verificar o grau de segurança na utilização desta substancias de interesse.

## MATERIAIS E METÓDOS

### *Animais*

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* 18 machos e 18 fêmeas albinos, divididos em 12 grupos com 3 animais por cada grupo, pesando entre 250 a 300 g, todos com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6 h às 18 h. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI - CEEA/UFPI sob protocolo número 013/11.

**Figura 1:** Animais utilizados no estudo (Ratos *Wistar*).

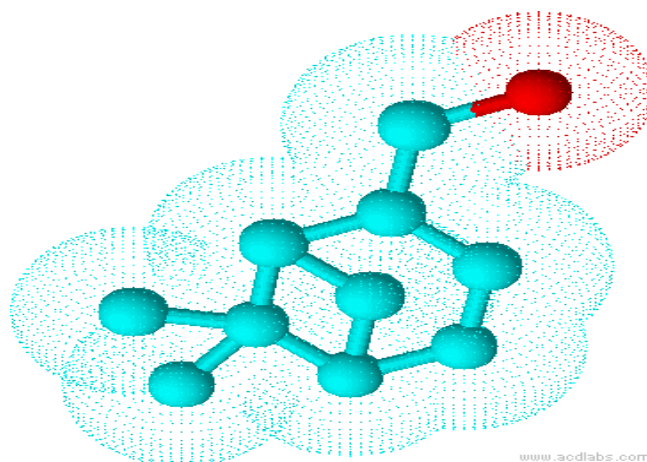


Fonte: Foto do arquivo pessoal, 2014.

### *Preparação da substância*

O (-)-mirtenol pode ser obtido através da extração de várias espécies de plantas da flora brasileira, dentre elas a família das *Mirtaceae* (VIGNOLI-SILVA, BANDEIRA; LANDO; VALLILO et al., 2008; PASCOAL et al., 2011), porém para esses testes, o monoterpeno utilizado foi adquirido da Sigma Aldrich<sup>®</sup> com grau de pureza de 99%, e emulsionado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo), o complexo de inclusão foi obtido através da secagem por spray dryer utilizando quantidade equimolares de (-)-mirtenol e  $\beta$ -ciclodextrina (FERNANDES et al., 2009).

**Figura 2:** Estrutura do mirtenol, ACD/ Labs ChemSketch Free Hardware.



Fonte: arquivo pessoal.

*Método de preparação do complexo de inclusão com mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina (MIR- $\beta$ CD)*



Quantidades equimolares de (-)-mirtenol e  $\beta$ -ciclodextrina foram solubilizadas em etanol PA e em água destilada aquecida a 45 °C, respectivamente. As duas soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético, por 90 minutos, a solução foi injetada no aparelho spray-drying de bancada (BUCHI B-290) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, com um fluxo da amostra de 3 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de entrada de 105 °C, temperatura de saída 62 °C e temperatura da amostra de 60 °C.

#### *Protocolo de Tratamento dos grupos experimentais*

Os animais foram tratados por via intraperitoneal e oral, com solução de (-)-mirtenol e complexo (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina em única dose de 2 g kg<sup>-1</sup> de acordo com a resolução da ANVISA de 31 de Janeiro de 2013. Para estudo de toxicidade aguda em dose única, o grupo controle foi tratado com Tween 80 (0,05%) dissolvido em solução salina 0,9% (veículo). Após trinta minutos da administração os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, divididos em grupo de três animais por gaiola e observados durante quatro horas continuamente a fim de avaliar possíveis alterações comportamentais, e após 24 horas, foram observados uma vez ao dia durante os 14 dias, a fim de registrar possível mortalidade provocada pelas substâncias teste. Os animais foram avaliados e observados por meio de estudos comportamentais, bem como o peso corpóreo, consumo de água e ração e produção de excretas durante os 14 dias de observação. Após esse período, os animais foram pesados, anestesiados com xilazina/cetamina e sacrificados para análise morfológica macroscópica dos principais órgãos.

#### *Screening hipocrático*

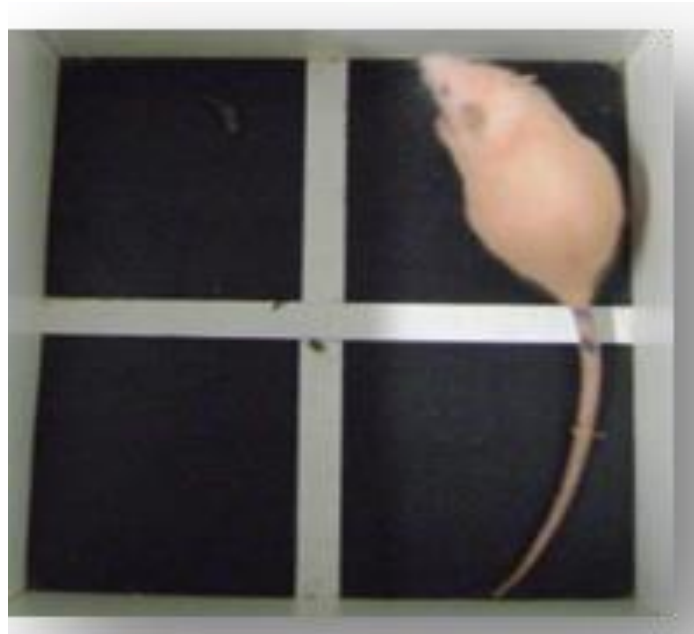
O *Screening* hipocrático possibilita a avaliação geral da toxicidade das substâncias teste sobre a disposição geral do animal, avalia a atividade e coordenação do sistema motor, estado de consciência, reflexos e atividades sobre os sistemas nervoso central e autônomo (MALONE, 1983; BÉJAR; MALONE, 1993).

Após a administração do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina nos grupos experimentais, foram observados os seguintes parâmetros: atividade geral, anestesia, ataxia, cianose, contorção, crise epiléticas, calda em *straub*, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, reflexo de endireitamento, tônus muscular, força para agarrar, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, hipnose, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, hiperemia, morte (SANTANA et al., 2013).

### *Teste de campo aberto*

O campo aberto é uma caixa de acrílico com paredes transparentes e piso preto, dividido em nove quadrados de área igual. Este teste é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal como número de cruzamentos de quadrantes e números de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e número de levantamentos sem encostar-se nas paredes (*rearing*) (ARCHER, 1973; SOUSA et al., 2007).

**Figura 3.** Animal submetido ao teste do campo aberto.



Fonte: arquivo pessoal.

### *Teste da barra giratória*

O teste da barra giratória consiste em colocar o animal com as quatro patas em uma barra giratória a uma velocidade constante de 12 rpm, para avaliar uma possível ação relaxamento muscular ocasionado pela administração das substâncias testadas. Os parâmetros observados são o número de quedas (até três quedas) e o tempo de permanência na barra de 1 min (DUNHAM; MIYA, 1957; GUIMARÃES et al., 2010; BARTH; MODY, 2014).

**Figura 4:** Animal submetido ao teste da barra giratória.



Fonte: arquivo pessoal.

#### *Análises Estatísticas*

Os resultados foram expressos como a média e erro padrão ou percentagem e submetidos a análise estatística utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação (*one-way*), seguido do teste de *Newman-Keuls* como *post hoc teste*, considerados significantes quando apresentaram  $p < 0,05$ . Para esses cálculos foram utilizados o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software Incorporated™, San Diego, USA versão trial).

## **RESULTADOS**

### **Aviação da toxicidade aguda com doses únicas**

De acordo com a avaliação da toxicidade aguda com dose única nenhuma mortalidade foi registrada após a administração do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina na dose única de  $2 \text{ g/kg}^{-1}$  via i.p e v.o, durante 14 dias de observação após o respectivo tratamento (**Tabela 1**).

#### *Screening hipocrático*

Após avaliação do *Screening* hipocrático todos os animais dos diferentes sexos (macho e fêmea) e diferentes vias (oral e intraperitoneal), que receberam a dose única de  $2 \text{ g kg}^{-1}$  das substâncias teste, não foram observadas nenhuma taxa de mortalidade (**Tabela 1**), na

via intraperitoneal nos animais tratados com (-)-mirtenol, foram observados alteração na respiração dita ofegante, sinais de anestesia e diminuição do reflexo corneal, enquanto que os animais tratados com o complexo (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina não apresentaram nenhuma alteração (**Tabela 1**). Este tipo de avaliação fornece uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida, principalmente sua influência no estado de consciência e disposição, coordenação motora, reflexos, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema neurovegetativo dos animais testados (SILVA et al., 2007).

**Tabela 1:** Avaliação do *Screening hipocrático* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão na dose de  $2\text{g kg}^{-1}$  observados durante 14 dias.

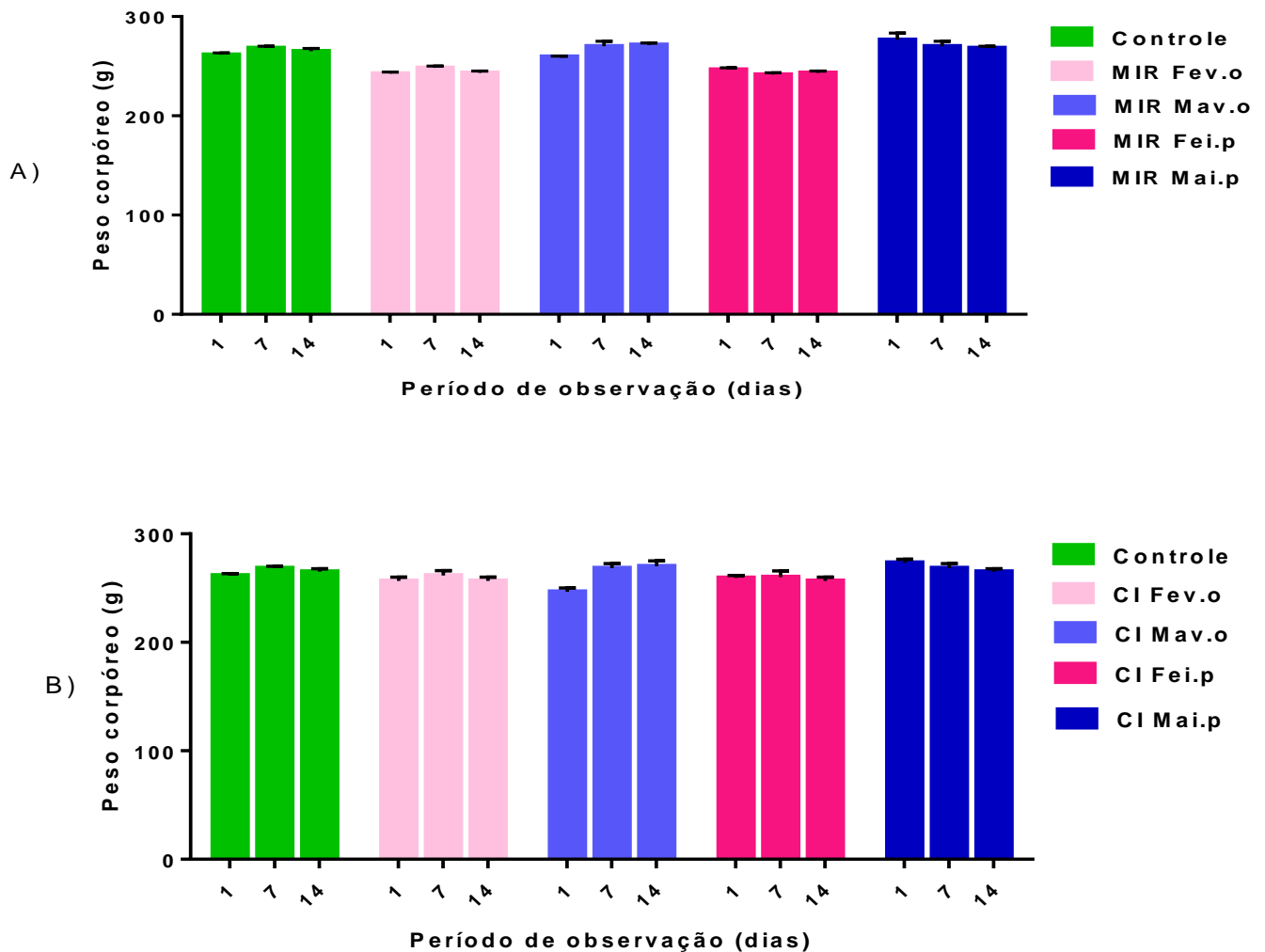
Grupos	Dose ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Via	Sexo	Mortalidade	Sinais e sintomas de toxicidade
<b>Veículo</b>	-	i.p	Fêmea	0/3	Sem alterações
-	-	v.o	Macho	0/3	Sem alterações
<b>Mirtenol</b>	2	i.p	Fêmea	0/3	Respiração ofegante, anestesia e diminuição do reflexo corneal.
-	2	i.p	Macho	0/3	Respiração ofegante, anestesia e diminuição da força de agarrar.
-	2	v.o	Fêmea	0/3	Sem alterações
-	2	v.o	Macho	0/3	Sem alterações
<b>CI</b>	2	i.p	Fêmea	0/3	Sem alterações
-	2	i.p	Macho	0/3	Sem alterações
-	2	v.o	Fêmea	0/3	Sem alterações
-	2	v.o	Macho	0/3	Sem alterações

Legenda: i.p: via intraperitoneal, v.o: via oral, CI: complexo de inclusão.

#### *Pesos corpóreo e consumo de alimentos dos animais*

Verificando a alteração do peso corpóreo dos animais, os resultados demonstraram que não houve mudanças estatisticamente significativas com relação ao grupo controle, no período decorrido de 14 dias de observação (**Figura 5**).

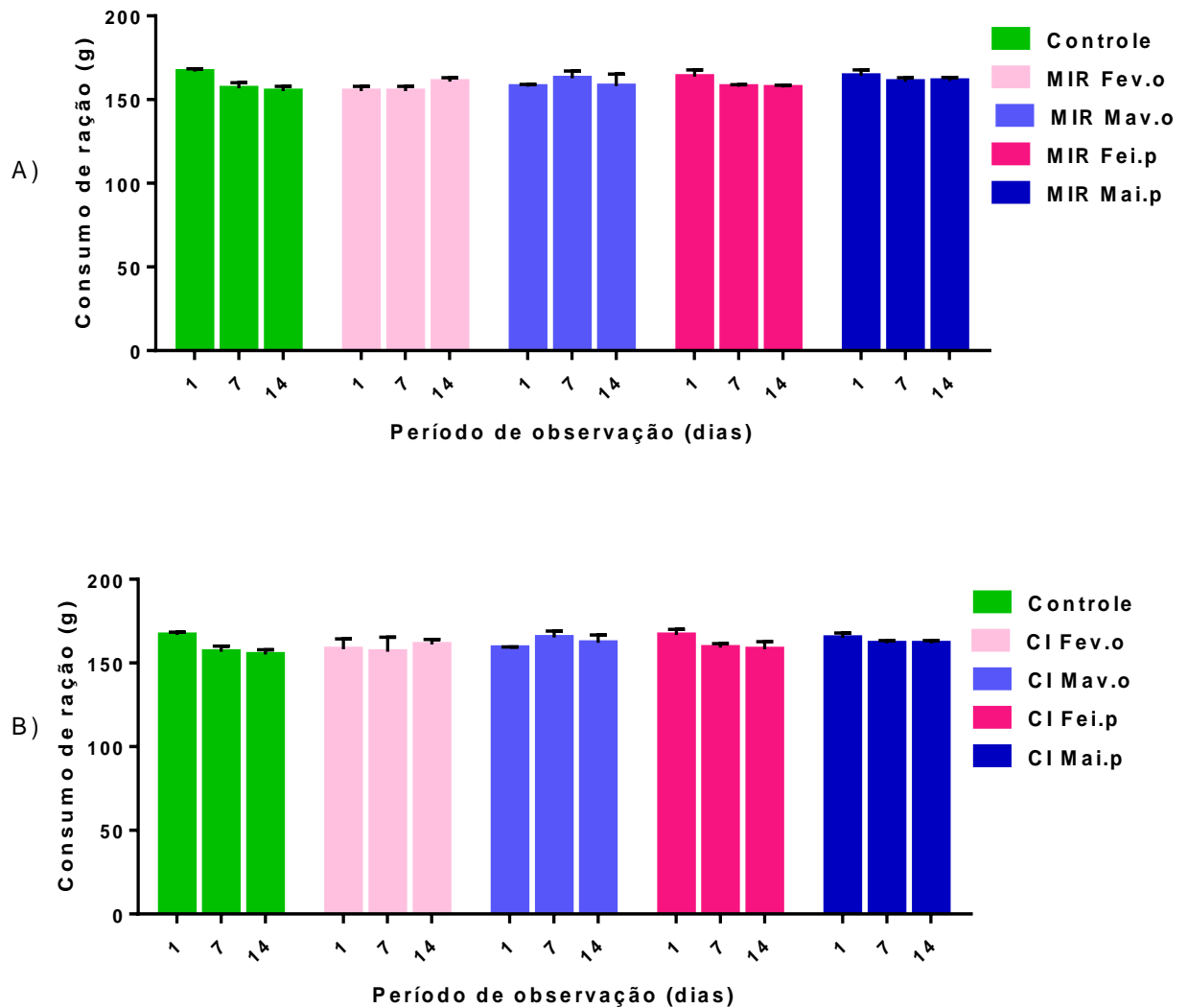
**Figura 5:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e Complexo de inclusão (B) em relação a alteração do peso corpóreo.



Legenda: MIR Fev.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), MIR Mav.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), MIR Fei.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), MIR Mai.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal), CI Fev.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), CI Mav.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), CI Fei.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), CI Mai.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal).

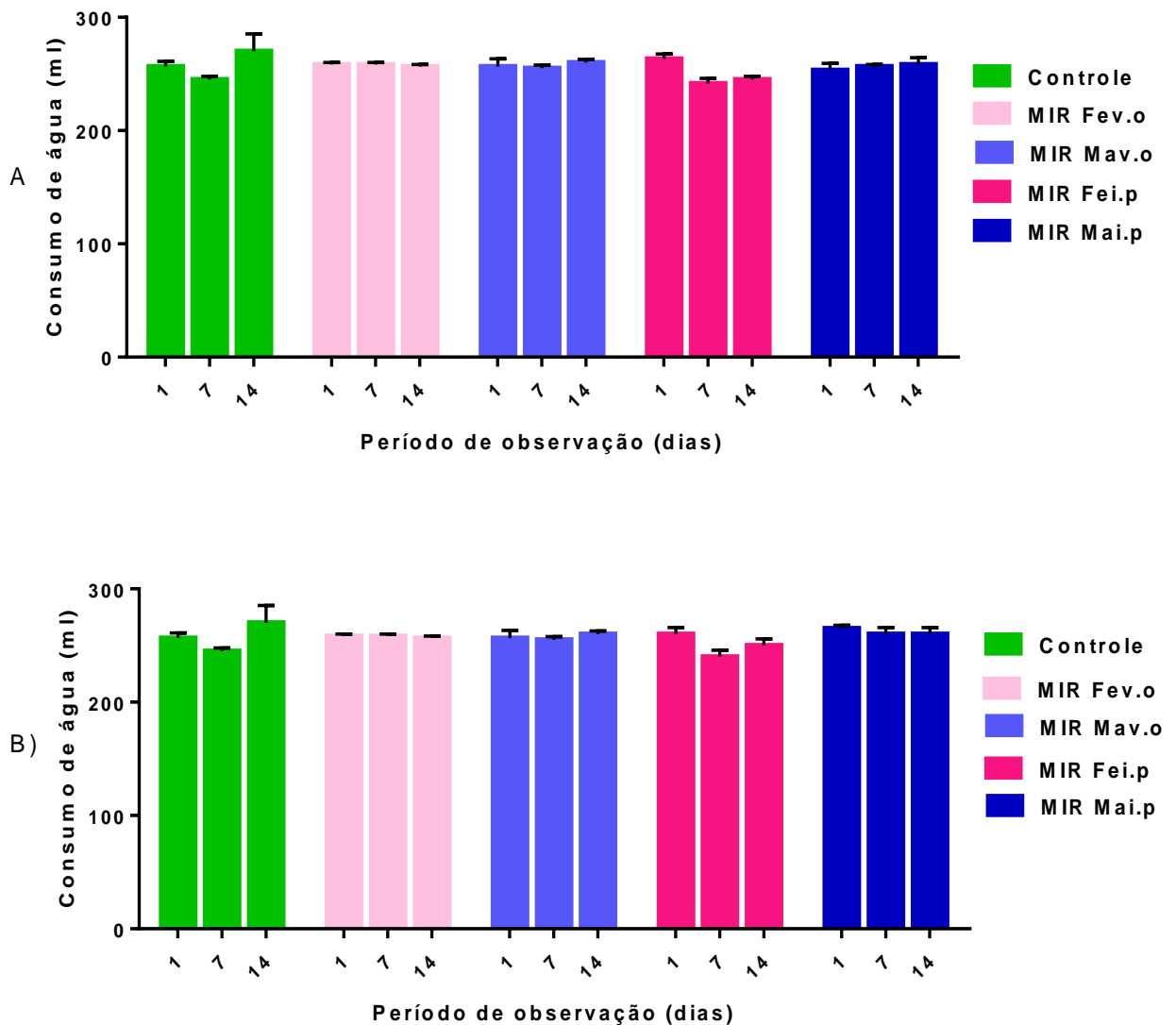
Analisando o consumo de água (**Figura 6**) e ração dos animais (**Figura 7**), que tiveram acesso aos mesmos à vontade num ciclo de claro escuro de 12 horas, não foi encontrado nenhuma diferença estatísticas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos testado, durante o período de observação.

**Figura 6:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em relação ao consumo de ração.



Legenda: MIR Fev.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), MIR Mav.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), MIR Fei.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), MIR Mai.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal), CI Fev.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), CI Mav.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), CI Fei.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), CI Mai.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal).

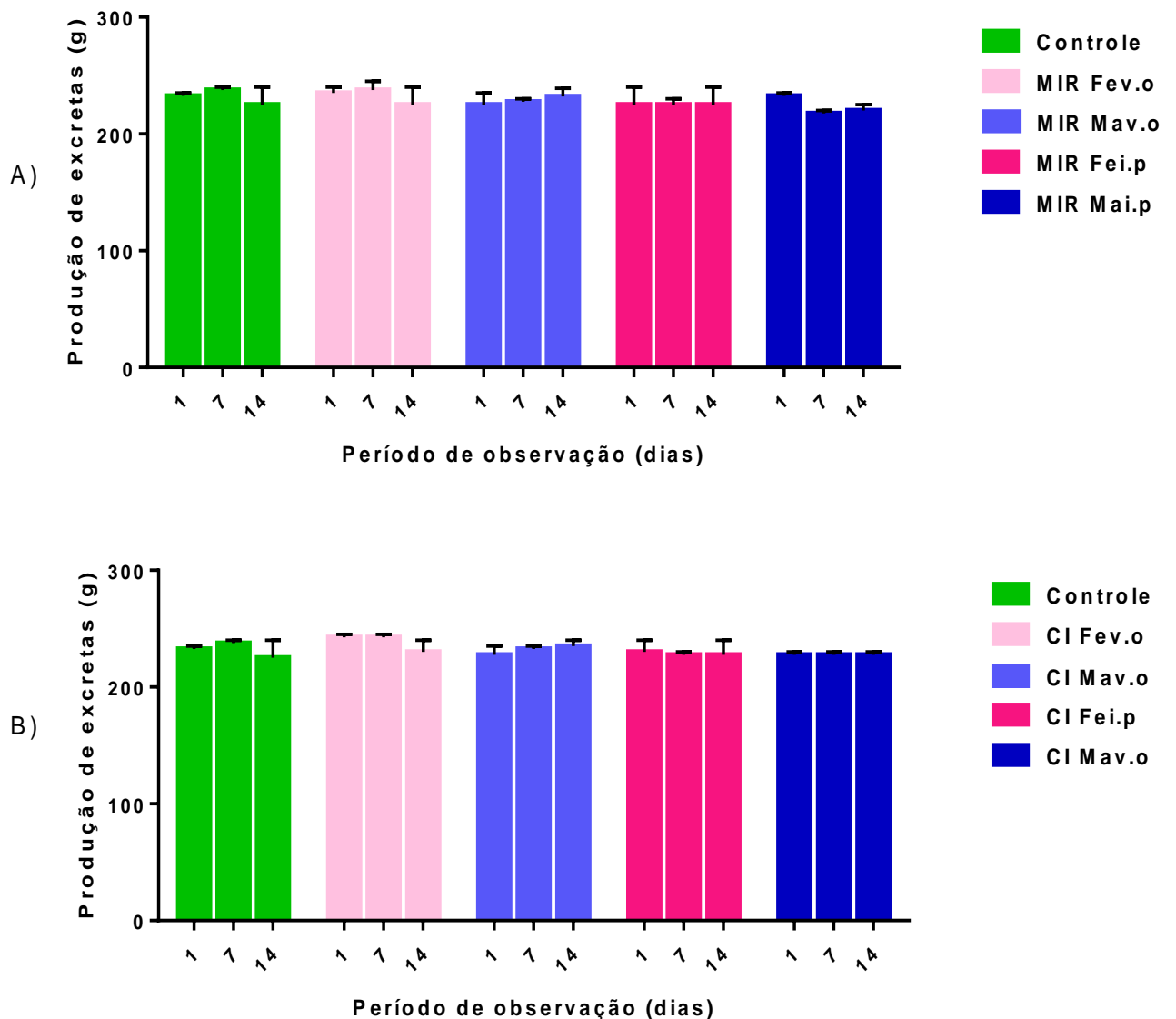
**Figura 7:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em relação ao consumo de água.



Legenda: MIR Fev.o (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via oral), MIR Mav.o (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via oral), MIR Fei.p (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via intraperitoneal), MIR Mai.p (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via intraperitoneal), CI Fev.o (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via oral), CI Mav.o (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via oral), CI Fei.p (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via intraperitoneal), CI Mai.p (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via intraperitoneal).

Quanto a produção de excretas dos animais foram monitorados, onde não foram observadas alterações significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle nesse parâmetro (**Figura 8**), apesar das oscilações ocorridas durante o período do tratamento.

**Figura 8:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol (A) e complexo de inclusão (B) em e, relação a produção de excretas.



Legenda: MIR Fev.o (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via oral), MIR Mav.o (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via oral), MIR Fei.p (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via intraperitoneal), MIR Mai.p (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via intraperitoneal), CI Fev.o (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via oral), CI Mav.o (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via oral), CI Fei.p (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via intraperitoneal), CI Mai.p (complexo de inclusão: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via intraperitoneal).

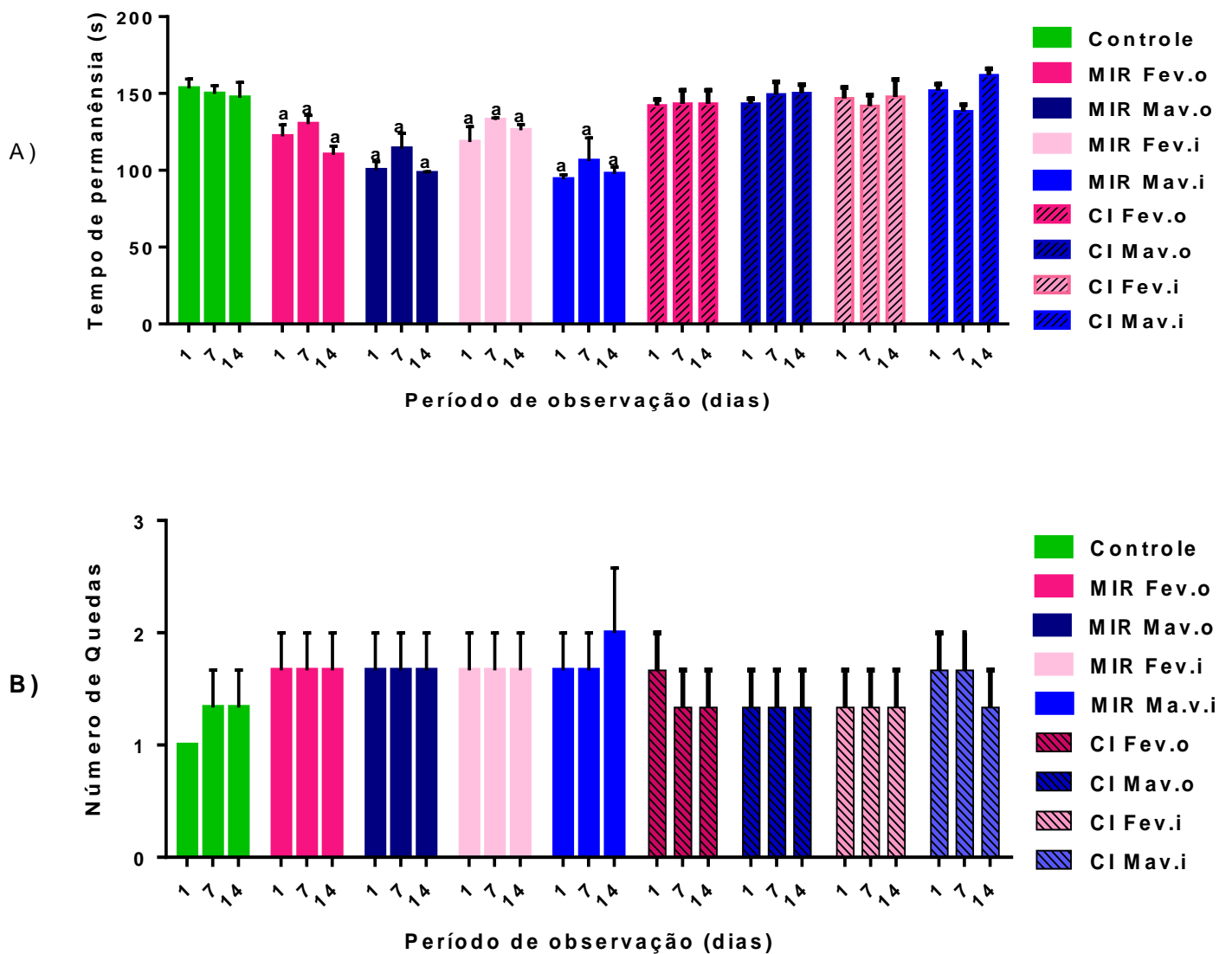
#### *Teste da barra giratória*

No teste da barra giratória, foi observada uma redução significativa no tempo de permanência na barra de 31,65; 41,1; 28,8 e 43,8 %, nos grupos tratados com (-)-mirtenol respectivamente MIR FeV.O (mirtenol 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via oral; 120,7 ± 5,8), MIR MaV.O (mirtenol: 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via oral; 104,0 ± 5,0), MIR FeV.I.P (mirtenol 2 g kg<sup>-1</sup>, fêmeas via

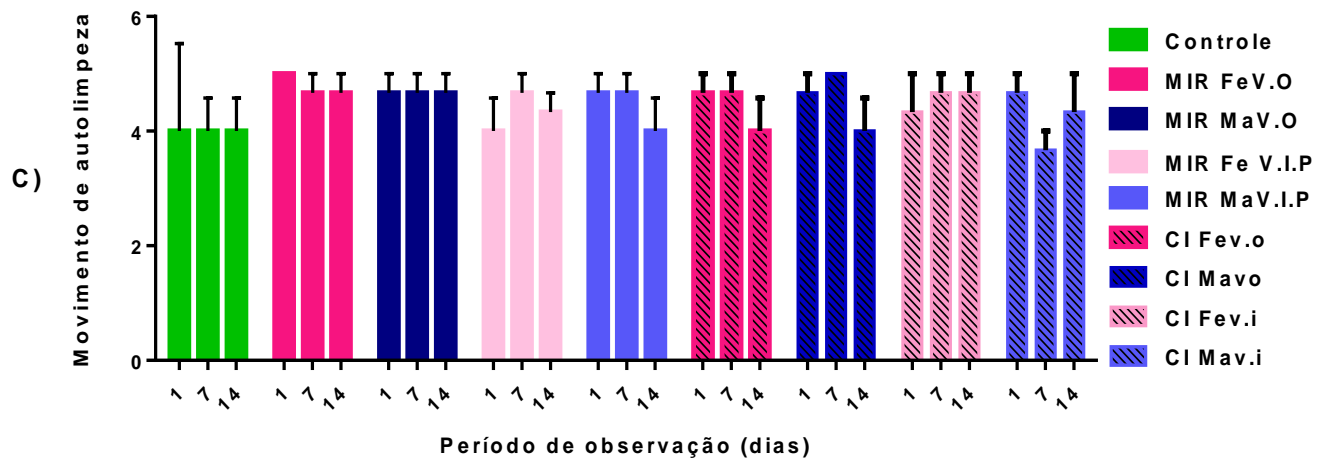


intraperitoneal;  $125,7 \pm 4,1$ ) e MIR MaV.O (mirtenol 2 g kg<sup>-1</sup>, machos via intraperitoneal;  $99,2 \pm 3,5$ ) quando comparados com o com o veículo (controle negativo;  $170,6 \pm 0,949$ ;  $p < 0,05$ ;) (**Figura 9**) sugerindo um possível efeito sedativo, não foi observado diferenças significativas no tempo de permanência na barra giratória dos animais tratados com o complexo de inclusão. Quanto a verificação ao número de quedas dos animais tratados com mirtenol e complexo de inclusão, também não foram observados diferenças em relação ao grupo controle.

**Figura 9:** Efeito da administração via intraperitoneal e oral do (-)-mirtenol e complexo de inclusão em relação ao tempo de permanência (A) e do número de quedas (B) sobre a barra giratória.





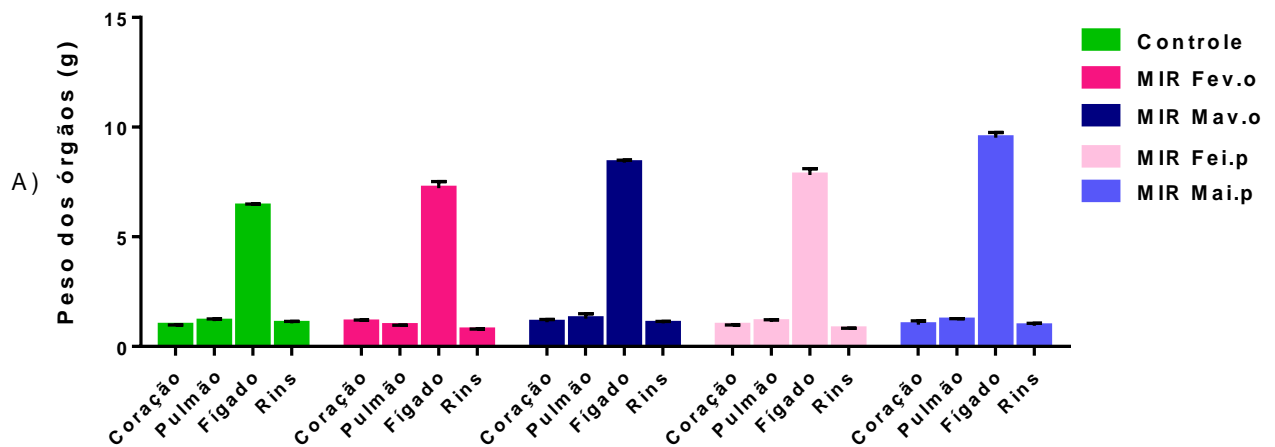


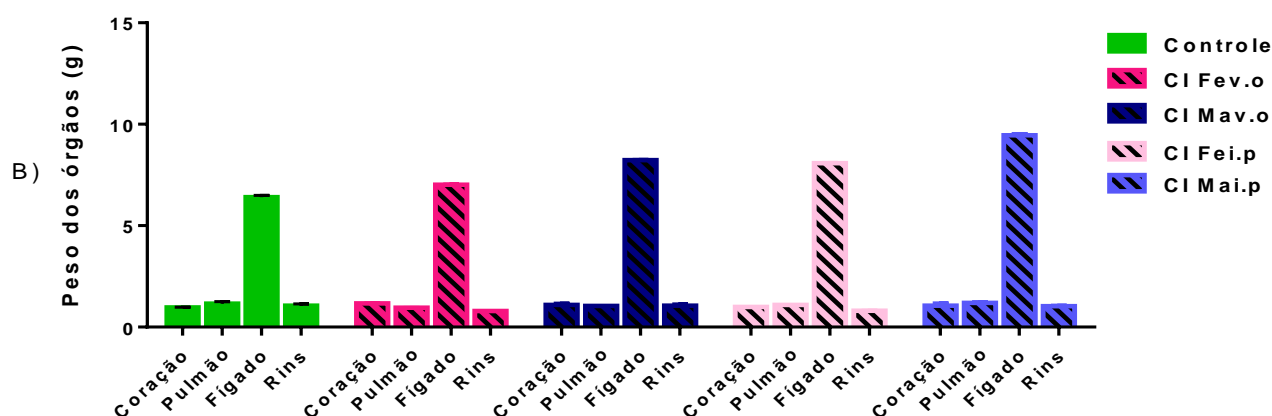
Legenda: MIR Fev.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), MIR Mav.o (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), MIR Fei.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), MIR Mai.p (mirtenol:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal), CI Fev.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via oral), CI Mav.o (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via oral), CI Fei.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , fêmeas via intraperitoneal), CI Mai.p (complexo de inclusão:  $2 \text{ g kg}^{-1}$ , machos via intraperitoneal).

#### Análise morfológica macroscópica dos principais órgãos

Na análise morfológica macroscópica dos órgãos removidos dos animais após o final do tratamento de 14 dias, os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M e expressos em termos de massa relativa g/100 g. As vísceras foram removidas após a dissecação tiveram suas massas úmidas determinadas em balança analítica., não foram observadas alterações visuais comparados com o grupo controle e nem danos aparentes em todos os órgãos dos grupos analisados. Comparado estatisticamente o peso dos principais órgãos não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle.

**Figura 11:** Análise morfológica macroscópica dos principais órgãos de ratos *Wistar* adultos tratados com (-)mirtenol e com seu complexo de inclusão.





## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo indicam que tanto o (-)-mirtenol quanto seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina, não proporcionaram a mortalidade dos animais até 14 dias após administração da dose testada, sugerindo uma baixa toxicidade para as substâncias testadas.

Os efeitos tóxicos referente à exposição de um xenobiótico estão relacionado à sua ação nos principais órgãos e os seus danos observados caracterizando assim a segurança da substância teste através de ensaios não clínicos. Essas informações são de grande importância para a determinação dos efeitos adversos bem como subsídios para a determinação das doses iniciais que serão utilizadas nos primeiros ensaios clínicos em humanos (OLIVEIRA, 2012).

A realização da avaliação da toxicidade aguda do (-)-mirtenol em ratos foi de extrema importância para a verificação das suas propriedades toxicológicas, bem como reforça a segurança do seu uso em estudos posteriores.

Desta forma o *screening hipocrático* realizado para a avaliação geral de um possível potencial tóxico do (-)-mirtenol, avaliou o consumo de ração e água, peso da massa corpórea dos animais e análise macroscópica morfológica dos órgãos nobres após o término do tratamento. Como a atividade exploratória (teste do campo aberto), foi possível observar ação de relaxamento muscular (teste da barra giratória).

Durante a realização dos experimentos foi observado uma boa tolerabilidade do (-)-mirtenol pelos animais testados para ambos os sexos e nas diferentes vias de administrações (via oral e via intraperitoneal). Alguns sinais colinérgicos foram observados no primeiro dia após o tratamento, entretanto não foi registrado mortalidades nos grupos experimentais considerando um dado positivo no estudo, conferindo ao monoterpeno certo grau de segurança, e possibilitando expectativas para experimentos futuros (CHAUDHARY,ROHILLA et al., 2013).

Na análise do volume de excretas produzidas observou-se a proporcionalidade a quantidade de alimento ingerido, e o consumo de água e ração não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle, inferindo a inexistência de interferência do (-)-mirtenol sobre esses parâmetros.

Com relação a não variação do peso durante todo o período de exposição à substância, proporciona uma característica de baixa toxicidade, pois quando ocorrer à diminuição ou ganho de peso é atribuído ao efeito tóxico (OLIVEIRA et al., 2014). Durante o acompanhamento da massa corpórea dos animais, não foi observado diferenças significativas em relação ao grupo controle. Em estudos toxicológicos a variação do peso é um critério primordial, quando o peso dos animais avaliados não ultrapassam variações de até 10 % de seu peso inicial, é um indicativo de que a substância testada não apresenta toxicidade, resultado semelhante foi observado nos animais tratados com (-)-mirtenol (COSTA et al., 2012).

Na análise morfológica macroscópica não foi observado alterações significativas no peso e na aparência geral dos órgãos estudados (coração, pulmão, fígado e rins) dos animais tratados de forma aguda com dose única do (-)-mirtenol, indo de encontro com os resultados anteriores, sugerindo um forte indicativo de baixa toxicidade. Em testes toxicológicos, a comparação do peso de órgãos dos grupos de animais tratados com os não tratados, é de fundamental importância para avaliar o efeito tóxico da substância testada, pois a alteração no peso dos órgãos é um dado muito sensível, o qual sugere presença de toxicidade (NIROGI et al., 2014).

No teste do campo aberto foi observado um aumento do número de cruzamento em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) este aumento está intimamente relacionado ao componente psicoemocional, quanto maior for o estímulo recebido pela cobaia maior a quantidade de deslocamentos, desta forma pode ser sugerido que o (-)-mirtenol não influencia na atividade locomotora dos animais testados (RICCI et al., 2013).

Porém houve um aumento significativo do número de movimentos de autolimpeza que é manifestado de acordo com o nível de ansiedade dos animais em determinada situação, refletindo uma resposta comportamental provocada por estímulos externos (ZANETTINI et al., 2010) também foi observado a diminuição do número levantamentos ( $p > 0,05$  em relação controle), que ocorre quando o roedor realiza levantamentos no campo aberto, de modo a apoiar-se somente as patas traseiras na superfície, mantendo as duas dianteiras levantadas sem encostar nas paredes do aparato, provocando uma diminuição do movimento exploratório dos animais testados (GOULD,DAO; KOVACSICS, 2009).

Na avaliação ação relaxamento muscular por meio do teste da barra giratória foi observado aumento no número de quedas e diminuição do tempo de permanência na barra giratória significativos em relação ao controle sugerindo um efeito relaxante muscular semelhante aos provocados por benzodiazepínicos, assim não sendo entendidos como sinais de toxicidade, sendo que o (-)-mirtenol não alterou a atividade exploratória dos animais testados em relação ao controle (STERNBACH, 1979).

Vários estudos demonstram a baixa toxicidades de monoterpenos como no (-)-epóxi-limoneno (DE ALMEIDA,COSTA et al., 2012), (-)-mentol (VASCONCELOS, 2009), cianocarvona (SCHUCH, 2011) e limoneno (KIM et al., 2013) da mesma forma que o (-)-mirtenol, demonstrando ausência de efeitos colaterais e toxicidade reforçando que os resultados experimentais corroboram como os resultados encontrados na literatura.

Apesar da baixa toxicidade dos monoterpenos descrito pela literatura (CROWELL,AYOUBI; BURKE, 1996; CHAUDHARY,ROHILLA et al., 2013; CRESPO et al., 2013), a continuação dos estudos toxicológicos do (-)-mirtenol são necessário para a caracterização de todas as suas propriedades toxicológicas, tendo assim, nível de segurança aceitável, possibilitando o desenvolvimento de futuros fitomedicamentos.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados na avaliação da toxicidade aguda em dose única, o (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão não apresentaram toxicidade na dose única de  $2 \text{ g kg}^{-1}$  em ratos *Wistar* albinos de ambos os sexos, por via oral e intraperitoneal, viabilizando certo grau de segurança para a sua utilização em estudos futuros e viabilização para o desenvolvimento de futuro fitomedicamentos.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, F.; SANTOS, A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 215-220, 2005.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARTH, A. M.; MODY, I. Novel test of motor and other dysfunctions in mouse neurological disease models. **Journal of neuroscience methods**, v. 221, p. 151-158, 2014.
- BÉJAR, E.; MALONE, M. H. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. **Journal of ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 141-158, 1993.
- BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, Supplement, p. S237-S240, 2008.
- CHAUDHARY, H.; ROHILLA, A.; RATHEE, P.; KUMAR, V. Optimization and formulation design of carbopol loaded Piroxicam gel using novel penetration enhancers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, n. 0, p. 246-253, 2013.
- COAN, C. M.; MATIAS, T. A UTILIZAÇÃO DAS PLANTAS MEDICINAIS PELA COMUNIDADE INDÍGENA DE VENTARRA ALTA-RS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 1, 2014.
- COSTA, J.; FERREIRA, P.; SOUSA, D.; JORDAN, J.; FREITAS, R. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, 2012.
- CRESPO, R.; MONTERO VILLEGAS, S.; ABBA, M. C.; DE BRAVO, M. G.; POLO, M. P. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 131-139, 2013.
- CROWELL, P. L.; AYOUBI, A. S.; BURKE, Y. D. Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 401: 131-136 p. 1996.
- DE ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; DE CARVALHO, R. B. F.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- DIAS, J. F.; MIGUEL, M. D. ESTUDO ALELOPÁTICO APLICADO DE *ASTER LANCEOLATUS*, WILLD. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 1, 2005.



DUNHAM, N.; MIYA, T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.

FLAVOR; ASSOCIATION, E. M. FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association), 1965. Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additives amendment III. GRAS Substances. **Food Technology**, v. 19, n. 2 part 2, p. 151-197, 1965.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C. D.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 3, p. 559-566, 2008.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. In: (Ed.). Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: **Springer**, v.42, p. 1-20, 2009.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

JOINT, F.; ADDITIVES, W. E. C. O. F.; ORGANIZATION, W. H. Evaluation of certain food additives: fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO **Expert Committee on Food Additives**. 2002.

JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. Complexo agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas e condimentares no Estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas. Sociedade Paranaense de Plantas Mediciniais, 2004.

KIM, Y. W.; KIM, M. J.; CHUNG, B. Y.; BANG, D. Y.; LIM, S. K.; CHOI, S. M.; LIM, D. S.; CHO, M. C.; YOON, K.; KIM, H. S.; KIM, K. B.; KIM, Y. S.; KWACK, S. J.; LEE, B. M. Safety evaluation and risk assessment of D-limonene. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 16, n. 1, p. 17-38, 2013.

KOUADIO, J. H.; BLEYERE, M. N.; KONE, M.; DANO, S. D. Acute and Sub-Acute Toxicity of Aqueous Extract of *Nauclea Latifolia* in Swiss Mice and in OFA Rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 109-115, 2014.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.

NAKAMURA, M.; CHI, Y.-M.; YAN, W.-M.; NAKASUGI, Y.; YOSHIZAWA, T.; IRINO, N.; HASHIMOTO, F.; KINJO, J.; NOHARA, T.; SAKURADA, S. Strong Antinociceptive Effect of Incarvilleatine, a Novel Monoterpene Alkaloid from *Incarvillea sinensis*. **Journal of natural products**, v. 62, n. 9, p. 1293-1294, 1999.

NANDHAKUMAR, E.; PURUSHOTHAMAN, A.; SACHDANANDAM, P. Acute and sub-acute toxicity studies using Shemamruthaa, a modified indigenous Siddha preparation, in Sprague-Dawley rats. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 299-306, 2014.

NIROGI, R.; KUMAR GOYAL, V.; JANA, S.; KUMAR PANDEY, S.; GOTH, A. WHAT SUITS BEST FOR ORGAN WEIGHT ANALYSIS: REVIEW OF RELATIONSHIP BETWEEN ORGAN WEIGHT AND BODY/BRAIN WEIGHT FOR RODENT TOXICITY STUDIES. **International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research**, v. 5, n. 4, 2014.

NOGUEIRA, M.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273-278, 2009.

OLIVEIRA, B. V. S. Novas associações de medicamentos sintéticos e semi-sintéticos: uma análise sobre estudos não clínicos e clínicos para o desenvolvimento e registro. 2012. 163 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OLIVEIRA, L.; LIMA, C.; CASTRO, V.; SIQUEIRA, M.; MAIA, A. Modelo linear misto para avaliar toxicidade por doses repetidas (pp. 609-613). **Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto**, v. 3, n. 3, 2014.

PASCOAL, A. C.; LOURENCO, C. C.; SODEK, L.; TAMASHIRO, J. Y.; FRANCHI JR, G. C.; NOWILL, A. E.; STEFANELLO, M. É. A.; SALVADOR, M. J. Essential Oil from the Leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk.(Myrtaceae): Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 34-37, 2011.

PAUMGARTTEN, F.; DELGADO, I.; ALVES, E.; NOGUEIRA, A.; DE-FARIAS, R.; NEUBERT, D. Single dose toxicity study of beta-myrcene, a natural analgesic substance. Brazilian journal of medical and biological research= **Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...**[et al.], v. 23, n. 9, p. 873-877, 1989.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.

RICCI, E. L.; FERREIRA JÚNIOR, V.; HABR, S. F.; MACRINI, D. J.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Behavioral and neurochemical evidence of deltamethrin anxiogenic-like

effects in rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2013.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revta Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SANTANA, L.; BRITO, M.; SOUSA, G.; FREITAS, R. Physicochemical properties and acute toxicity evaluation of ethanol extract of the leaves from *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 4, p. 742-750, 2013.

SANTOS, R. L.; NOBRE, M. S. D. C.; GUIMARÃES, G. P.; DANTAS, T. B.; VIEIRA, K. V. M.; FELISMINO, D. D. C.; DANTAS, I. C. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas em chás. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 289-293, 2013.

SCHUCH, T. L. Toxicidade dérmica e ocular do óleo essencial de orégano 3% (*Origanum vulgare* L.). 2011. 163 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SIGMA ALDRICHBRASIL LTDA, S. A. L. Ficha de dados de segurança do Myrtenol. 2014.

SILVA, M. I. G.; DE AQUINO NETO, M. R.; TEIXEIRA NETO, P. F.; MOURA, B. A.; DO AMARAL, J. F.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE SOUSA, F. C. F. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 2, p. 141-147, 2007.

SILVA, R. O.; SALVADORI, M. S.; SOUSA, F. B. M.; SANTOS, M. S.; CARVALHO, N. S.; SOUSA, D. P.; GOMES, B. S.; OLIVEIRA, F. A.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.

SOUSA, D. P. D.; NÓBREGA, F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N. D.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene alpha, beta-epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 170-175, 2007.

STERNBACH, L. H. The benzodiazepine story. **Journal of medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1979.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007. IS

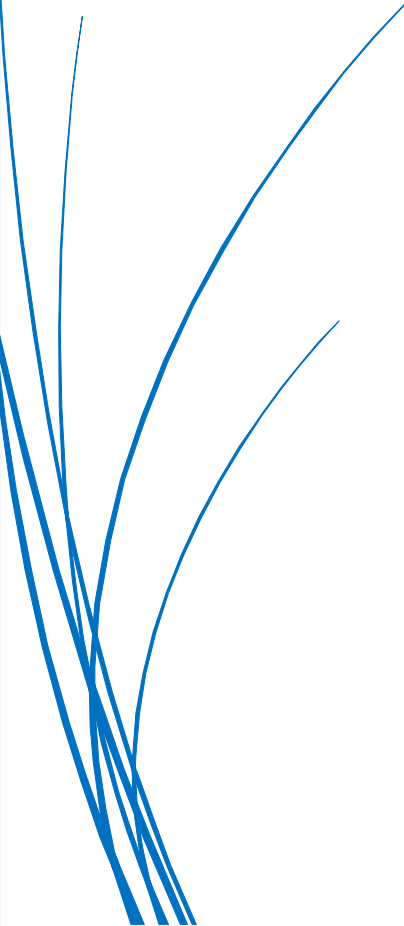

VALLILO, M. I.; MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA, E. D.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VASCONCELOS, P. F. Avaliação dos efeitos farmacológicos de (-)- mentol em modelos comportamentais e de gastroproteção em camundongos. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2009.

VIGNOLI-SILVA, M.; BANDEIRA, G. C.; LANDO, V. R. Campomanesia xanthocarpa (MYRTACEAE): DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DE METABÓLITOS ATIVOS NOS FRUTOS FRESCOS, CONGELADOS E EM GELEIA. In: 64º Congresso Nacional de Botânica, 6., 2013, Belo Horizonte, 2013.

XU, J.; HU, Z.-Q.; WANG, C.; YIN, Z.-Q.; WEI, Q.; ZHOU, L.-J.; LI, L.; DU, Y.-H.; JIA, R.-Y.; LI, M. Acute and subacute toxicity study of 1, 8-cineole in mice. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 4, p. 1495, 2014.

ZANETTINI, C.; CAROLA, V.; LO IACONO, L.; MOLES, A.; GROSS, C.; D'AMATO, F. Postnatal handling reverses social anxiety in serotonin receptor 1A knockout mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2010.



**5- Capítulo 5: Atividade antiepilética e avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e fígado de ratos *Wistar* tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina**

**Atividade antiepilética e avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e fígado de ratos *Wistar* tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina**

**Oskar Almeida Silva<sup>1</sup>; Jussara Barbosa Marques De Carvalho<sup>2</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1</sup>; Maria das Graças Freire Medeiros<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

**Resumo**

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por crises convulsivas que acometem mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, nesse cenário o objetivo deste trabalho foi a investigação da atividade antiepilética e a avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e fígado de ratos *Wistar* albinos tratados com (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>. Em todas as doses testadas os animais pré-tratados o (-)-mirtenol e seu complexo reduziram significativamente o número de crises epiléticas e aumentou a taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle convulsivo. Na avaliação do estresse oxidativo o (-)-mirtenol e o complexo de inclusão reduziram significativamente os níveis de peroxidação lipídica, e de produção de nitrito, porém não alteraram a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, diminuiu as concentrações de GSH. O presente estudo demonstrou que as substâncias testadas são promissoras antiepiléticas e antioxidante *in vivo*, diminuindo os danos neurais causados após indução das crises epiléticas, promovendo neuroproteção.

**Palavras-Chave:** Epilepsia, Estudo comportamental, (-)-mirtenol, Neuroproteção.

**Antiepileptic activity and evaluation of oxidative stress in isolated mitochondria from brain and liver of rats treated with (-) - myrtenol inclusion complex and (-) - myrtenol- $\beta$ -cyclodextrin**

**Abstract**

Epilepsy is a neurological disorder characterized by seizures that affect more than 50 million people around the world, in this scenario the objective of this study was to investigate the antiepileptic activity and the evaluation of oxidative stress in mitochondria isolated from brain and liver of rats Wistar treated with (-) - myrtenol and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in doses of 25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>. At all doses tested the animals pretreated the (-) - myrtenol and its complex significantly reduced the number of seizures and increased the survival rate in relation to seizure control group. The evaluation of oxidative stress the (-) - myrtenol and the inclusion complex significantly reduced the levels of lipid peroxidation and nitrite production, but not alteroram the activity of superoxide dismutase and catalase, decreased concentrations of GSH. This study demonstrated that the substances tested are promising antiepileptic and antioxidant in vivo, reducing neural damage after induction of seizures, promoting neuroprotection.

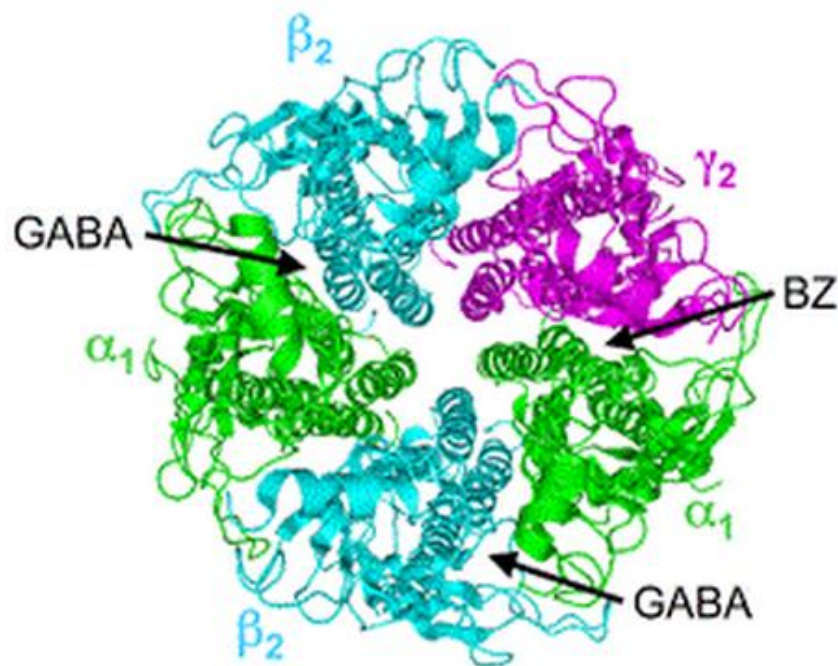
**Keywords:** Epilepsy, Behavioral study, (-) - myrtenol, Neuroprotection.

## INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por ataques que ocorrem devido à atividade neuronal excessiva e síncrona anormal no cérebro, causado por uma ruptura do delicado equilíbrio entre a excitação e inibição (CLYNEN et al., 2014). Suas principais manifestações são crises imprevisíveis e recorrentes, que acomete cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo e a cada ano mais de 2,4 milhões de novos são registrados (ALI; SIDDIQUI, 2014)

O GABA (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico) é um dos principais transmissor inibitório cerebrais, as alterações da função do receptor GABA ou expressão são frequentemente associados a patologias como a epilepsia (GARRET, 2014). Os receptores GABA<sub>a</sub> são formados por três subunidades diferente  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , de estrutura de pentâmero, que com suas subunidades formam várias series de  $\alpha$ -hélices agrupadas em torno de uma abertura central, correspondendo ao canal de cloreto, e uma porção extracelular onde ocorre a ligação com o GABA (MARIZ; DA SILVA, 2012) (**Figura 1**).

**Figura 1:** Receptor GABA<sub>a</sub>, vista a partir da face extracelular da membrana e a localização aproximada das suas subunidades, e locais de ligação de GABA e benzodiazepínicos (BZ).



Fonte: <http://www.pharmacology2000.com/Central/sedhyp/Sedative1.htm>



Quando há o aumento da frequência com que o GABA ativa os receptores GABA<sub>a</sub>, a ocorrência de alterações dos receptores GABA podemos ter como consequência repetidas crises epiléticas, proporcionando o desequilíbrio do metabolismo redox dos pacientes em decorrência das espécies reativas de oxigênio (KUTLUHAN et al., 2009) tornando-os mais propensos à ocorrência das doenças associadas ao estresse oxidativo (RODRIGUES, 2012)

Os processos de transferências eletrônicas são fundamentais para a manutenção da vida celular. No entanto, esse metabolismo indispensável, causa a produção de radicais livres e outras espécies reativas que podem causar danos oxidativo (ROCHA et al., 2014). Existem vários tipos de radicais livres como os derivados de oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre, os principais são radical ânion superóxido ( $O_2^- \bullet$ ), óxido nítrico ( $NO \bullet$ ), peroxinitrito ( $ONOO \bullet$ ), radical hidroxila ( $HO \bullet$ ), alcóxil ( $RO \bullet$ ), peróxil ( $ROO \bullet$ ) (HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, 2007).

A pilocarpina é um alcaloide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) não possui efeitos nicotínicos e é um agonista dos receptores muscarínicos (GUARNIERI, 2013), bastante usada para indução de crises epiléticas em modelos com roedores, onde procura reproduzir as crises epiléticas sofridas por humanos (FREITAS, 2014; MENDES; FREITAS; TOM, 2010)

Durante as crises epiléticas agudas induzidas por pilocarpina há um aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS) (BASHKATOVA et al., 2000), provocando a diminuição na eficiência dos sistemas de defesa podendo levar ao estresse oxidativo, que é caracterizado pela oxidação de biomoléculas que por sua vez pode vir a causar perda de suas funções biológicas (HALLIWELL, BARRY; WHITEMAN, 2004).

Desta forma nossos estudos têm por objetivo, investigar o potencial do monoterpene (-)-mirtenol, encontrado não só pela via sintética, mas também presente em óleo essencial de várias espécies da flora brasileira (DA COSTA et al., 2009; DIAS; MIGUEL, 2005; FABROWSKI, 2002; SANTOS et al., 2012), e o seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina, podendo possibilitar a descoberta de novas moléculas com propriedades anticonvulsivantes e antioxidantes. Uma vez que há necessidade de novas drogas antiepiléticas com propriedades neuroprotetoras (RIGOULOT et al., 2004; SMITH et al., 2014; TROJNAR et al., 2002; WIARD et al., 1995).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Drogas

As drogas utilizadas neste trabalho (-)-mirtenol,  $\beta$ -ciclodextrina, cloridrato de pilocarpina, monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos da Sigma Aldrich® e o diazepam e flumazenil da Cristália (Brasil). Todos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). O complexo de inclusão foi obtido através da secagem por spray dryer utilizando quantidade equimolares de (-)-mirtenol e  $\beta$ -ciclodextrina (FERNANDES et al., 2009).

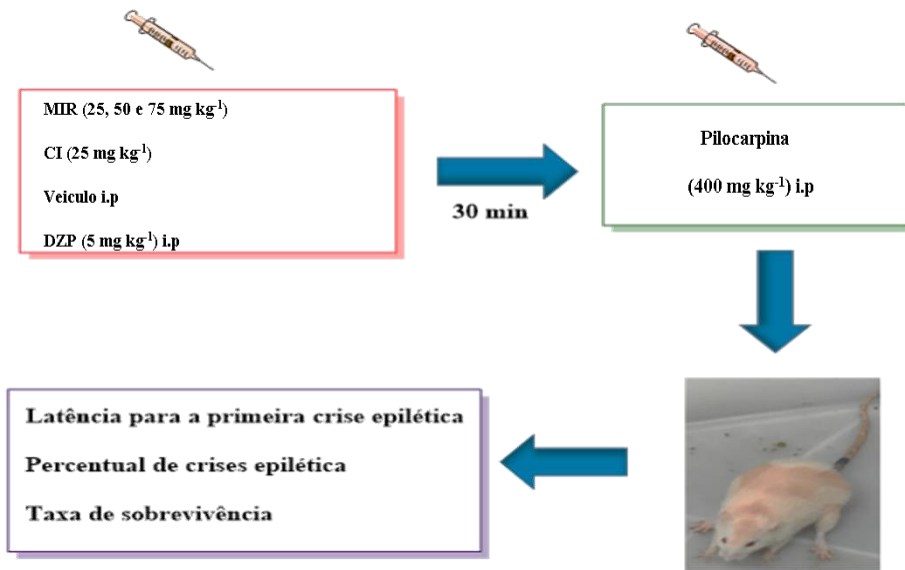
### Animais

Foram utilizados 45 ratos *Wistar* albinos fêmeas, divididos em 9 grupos com 5 animais por grupo, pesando entre 250 a 300 g, todos com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6 às 18 h. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI - CEEA/UFPI sob protocolo número 013/11.

### Teste comportamental

A pilocarpina é extensamente utilizada para indução de crises epiléticas em modelos animais, desta forma podendo avaliar o efeito antiepilético de novas drogas utilizando a pilocarpina como controle epilético. Para determinação de atividade antiepilética, grupos experimentais foram pré-tratados com *Tween* 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo), (-)-mirtenol (nas doses de 25, 50 e 75 mg kg<sup>-1</sup>), complexo (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina (25 mg kg<sup>-1</sup>) e diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>) como controle positivo, transcorridos 30 minutos foi administrado pilocarpina na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup>. Os animais foram colocados em gaiolas de acrílico para a observação dos seguintes parâmetros: latência para o início das primeiras crises epiléticas, o percentual de crises epiléticas e taxa de sobrevivência (AHMED, 2014; COSTA et al., 2012) (**Figura 2**).

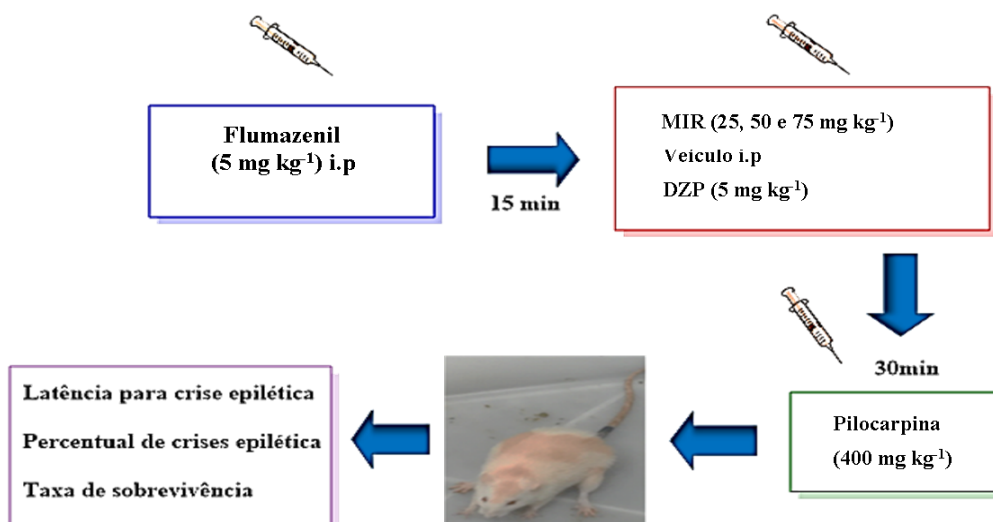
**Figura 2:** Protocolo experimental crises epiléticas induzidas por pilocarpina.



Fonte: Autoria própria.

Para a investigação da possível relação do (-)-mirtenol com os receptores benzodiazepínicos foi utilizado o flumazenil (FLU) um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>-BZD (FILE; PELLOW, 1986; HOOD et al., 2014), onde os animais foram pré-tratados com FLU (5 mg kg<sup>-1</sup>) e 15 minutos depois foi administrado veículo, mirtenol (75 mg kg<sup>-1</sup>) e diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>) com o decorrer de mais 30 minutos foi administrado a pilocarpina na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> e observado os parâmetros de latência para a primeira crise epilética, o percentual de crises epilética e taxa de sobrevivência.

**Figura 3:** Protocolo experimental para a investigação da participação do (-)-mirtenol em receptores benzodiazepínicos.



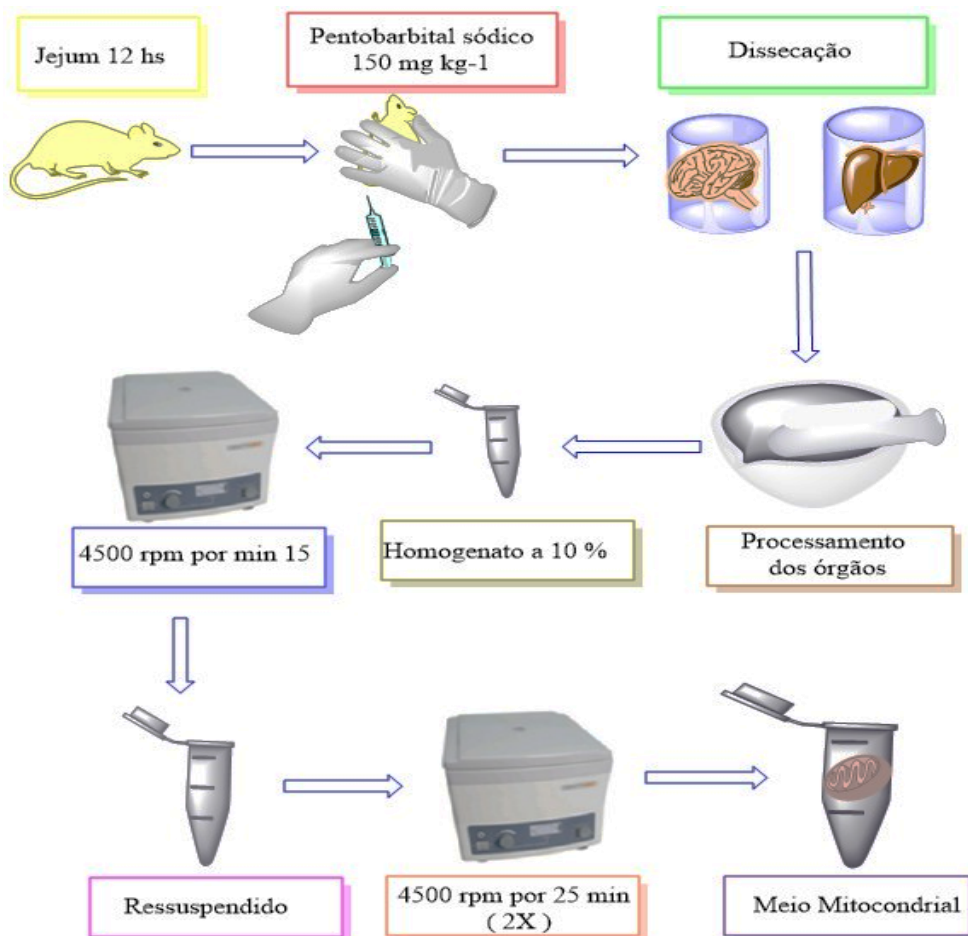
Fonte: Autoria própria.

### Isolamento de Mitocôndrias

Cérebro e fígado, foram extraído e mergulhados em um meio de isolamento refrigerado (4 °C) constituído por sacarose 125 mmol/L, EDTA 0,5 mmol/L, Hepes 5 mmol/L, BSA (0,05%). Os órgãos foram homogeneizados a 10% com meio de isolamento, e centrifugado a 5.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi removido por sucção com o auxílio de uma pipeta, e o precipitado restante, transferido para outro tubo de ensaio, ressuspenso em meio de isolamento e centrifugado a 5.000 rpm durante 20 minutos, para sedimentação das mitocôndrias. O sedimento mitocondrial foi cuidadosamente ressuspenso em meio de isolamento refrigerado, e novamente sedimentado por 20 minutos a 5.000 rpm, e ressuspenso novamente em meio de isolamento (PEIXOTO et al., 2009).

Após a obtenção dos isolados mitocondriais, foi determinada a concentração de proteína aplicando metodologia empregada por (LOWRY et al., 1951) para posterior avaliação do estresse oxidativo mitocondrial.

**Figura 4:** Protocolo experimental do isolamento mitocondrial.



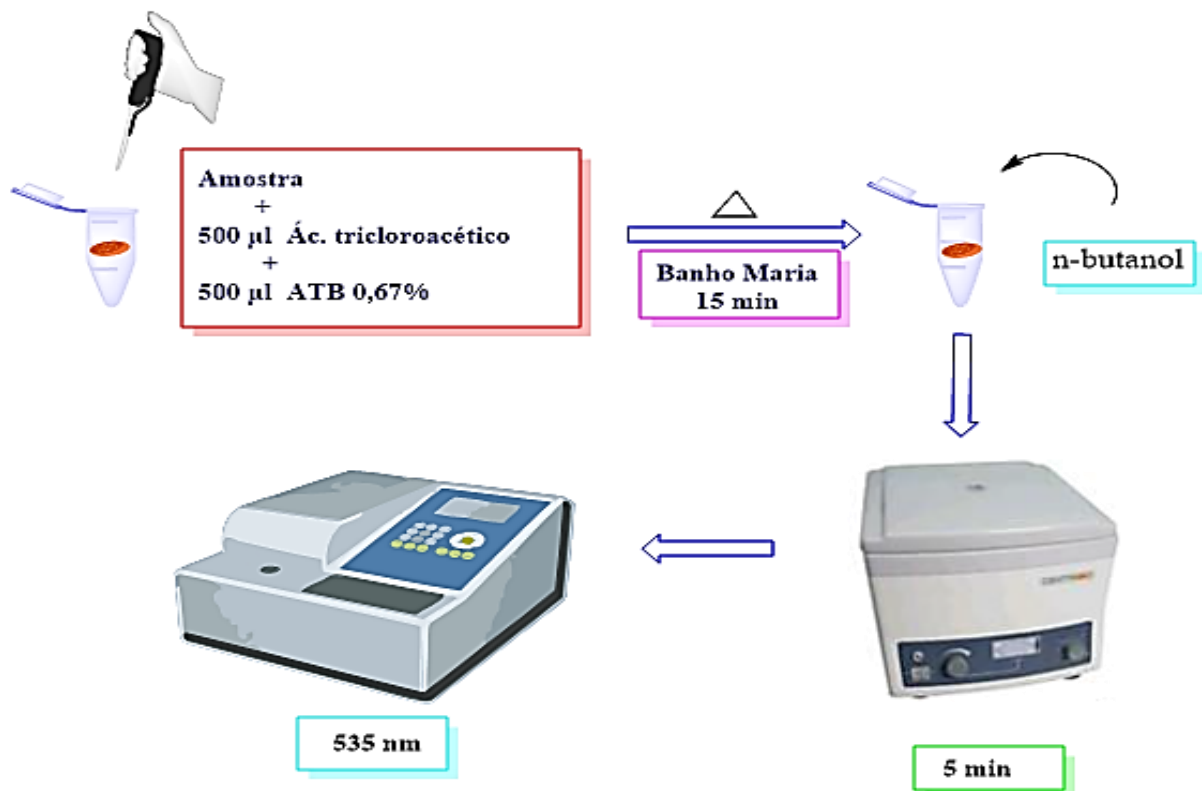
Fonte: Autoria própria.

## Avaliação do Estresse oxidativo

### Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS)

Como um índice de danos oxidativos, utilizou-se a formação de TBARS, durante uma reação em meio ácido sob aquecimento, o que é amplamente adaptado como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica (DRAPER; HADLEY, 1990). As amostras foram misturadas com 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e 500  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (ATB), e, em seguida, aquecida em banho maria durante 15 minutos. TBARS foram determinadas por absorbância a 535 nm. Os resultados são expressos como o malondialdeído (MDA) equivalentes ( $\mu$ mol / mg de proteína).

**Figura 5:** Protocolo de determinação dos níveis de peroxidação lipídica.



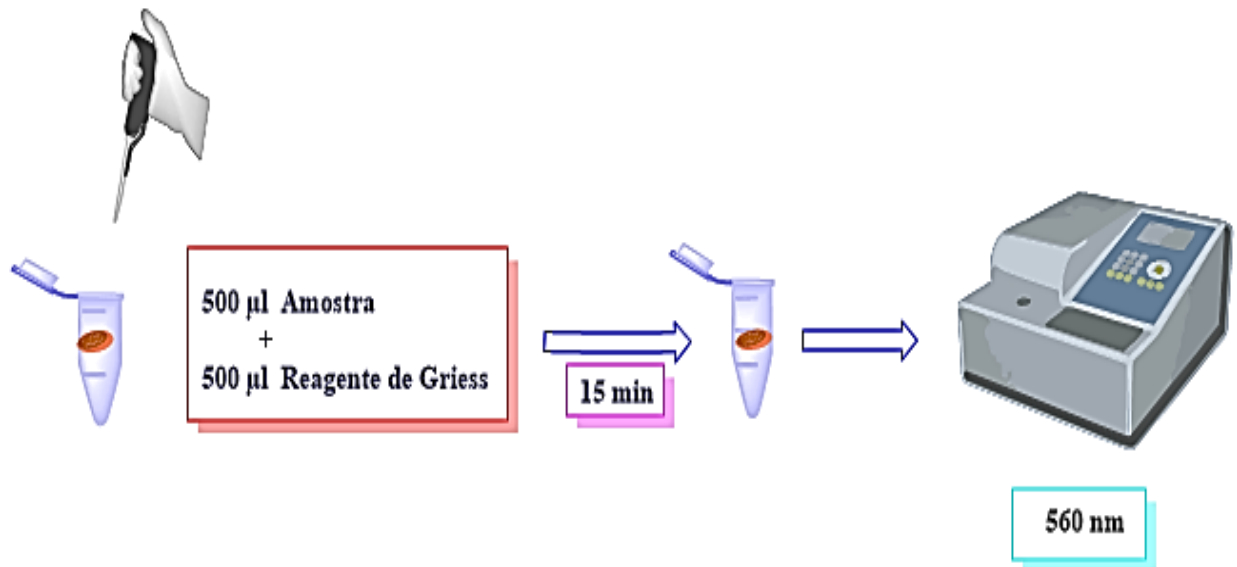
Fonte: Autoria própria.

### Determinação do teor de nitrito

Para determinar o teor de nitritos os homogenatos do isolamento de mitocôndrias cerebrais e hepáticas foram centrifugados (1500 rpm; 10 min), o sobrenadante foi recolhido e a produção de óxido nítrico foi determinada baseada na reação de Griess (GREEN; GOLDMAN, 1981). 500  $\mu$ L do sobrenadante incubado com 500  $\mu$ L do reagente de Griess à

temperatura ambiente durante 10 minutos. Foi feito a leitura em espectrofotômetro a 550 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

**Figura 6:** Protocolo de determinação do teor de nitrito.

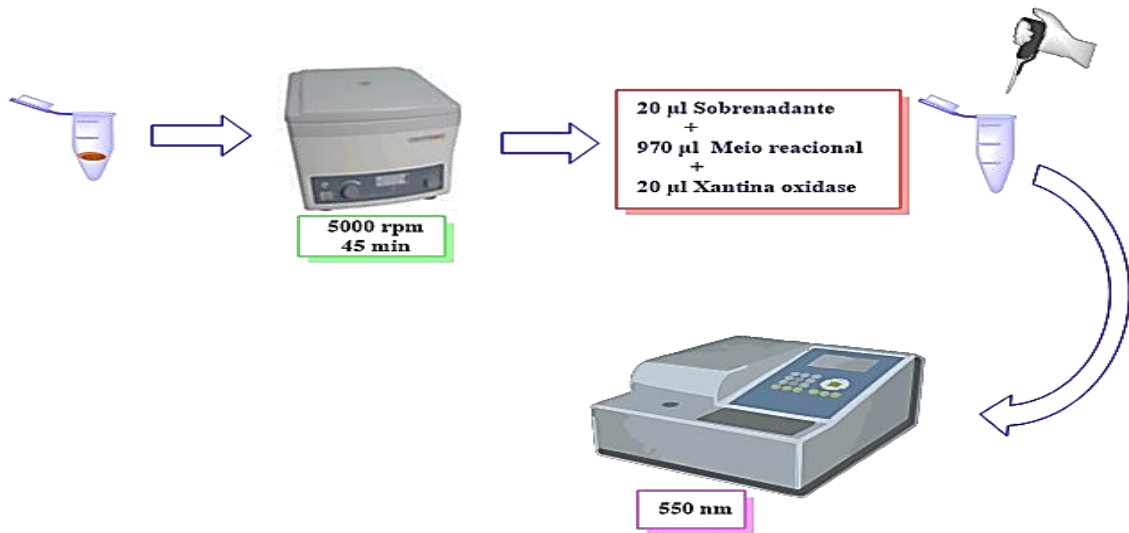


Fonte: Autoria própria.

#### *Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)*

Os homogenatos foram centrifugados a 5000 rpm por 45 minutos e os sobrenadantes usados para o ensaio da determinação de SOD. Os testes para avaliar a atividade da SOD foram realizados utilizando xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido (FLOHÉ; ÖTTING, 1984). A mistura de substrato de ensaio padrão contendo 3,0 mL de xantina (500  $\mu\text{M}$ ), 7,44 mg de citocromo C, 3,0 mL de KCN (200  $\mu\text{M}$ ), e 3,0 mL de EDTA (1 mM) em 18,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. A alíquota da amostra (20  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada a 975  $\mu\text{L}$  da mistura de substrato mais 10  $\mu\text{L}$  de xantina oxidase. A absorção foi medida em espectrofotômetro em 550 nm após 6 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

**Figura 7:** Protocolo de determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).



Fonte: Autoria própria.

#### *Determinação da atividade da catalase (CAT)*

A atividade da catalase foi mensurada pela geração de  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  à medida que  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizado como substrato, é hidrolisado (BRITTON; MEHLEY, 1955; CHANCE; MAEHLI, 1955). A mistura de substrato de ensaio padrão continha 0,30 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 50 mL de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0.

À alíquota da amostra (20 µL) de homogenatos de isolado mitocondrial hepático e cerebral de camundongos foi adicionada a 980 µL da mistura de substrato. A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante seis minutos. A reação foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 230 nm. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando catalase purificada (Sigma, St Louis, MO, EUA) sob condições idênticas. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

**Figura 8:** Protocolo de determinação da atividade da catalase (CAT).

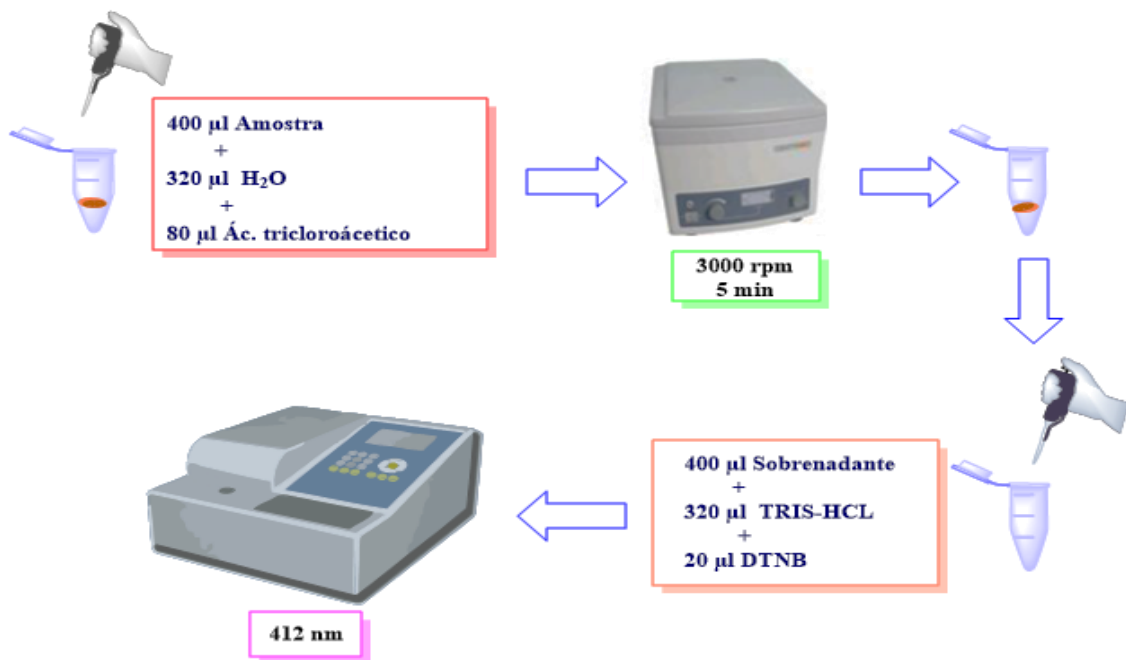


Fonte: Autoria própria.

### Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Para determinação da GSH, foi calculado o teor de grupos sulfidríla não proteicos por técnica anteriormente descrita na literatura (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Preparou-se homogenato a 10% dos isolados mitocondriais hepáticos e cerebrais em EDTA 0,02M, em seguida foi retirado 400  $\mu$ L desse homogenato e adicionado 320  $\mu$ L de água destilada e 80  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%, o material foi centrifugado em 3000 rpm por 15 minutos, em seguida foi recolhido 400  $\mu$ L do sobrenadante e acrescido 800  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20  $\mu$ L de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01 M e após 1 min da reação foi feita a leitura a 412 nm. A concentração de GSH foi expressa por nano grama de GSH por grama de tecido.

**Figura 9:** Protocolo de determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).



Fonte: Autoria própria.

### Análises estatísticas

Para análise estatística, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para múltiplas comparações com teste de *Newman-Keuls (post hoc)*, pelo programa *GraphPad PRISMA*® 6.01 trial para Windows, Copyright©. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média). Resultados para porcentagem de crise epiléptica e porcentagem de



sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental (teste  $\chi^2$ ). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Após a administração da pilocarpina ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no grupo pré-tratado apenas com veículo (*Tween* 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), todos os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos; movimentos estereotipados (*sniffing*, *grooming* e *rearing*), seguido de crises epiléticas evoluindo até um estado de mal epilético levando a morte de 100% dos animais deste grupo (**Tabela 1**).

Nos animais pré-tratados com (-)-mirtenol e complexo de inclusão, foi observado um aumento significativo do tempo para a latência da primeira crise epilética e redução do percentual de crises epiléticas (80% em todas as doses testadas do mirtenol e 20% do complexo de inclusão). Aumento da taxa de sobrevivência da animais que foram pré-tratados com (-)-mirtenol nas doses de 25, 50 e 75  $\text{mg kg}^{-1}$  (80%, 100% e 100% respectivamente) e do complexo de inclusão em 20% quando comparado com grupo controle (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Avaliação do efeito anticonvulsivante do mirtenol no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em ratos.

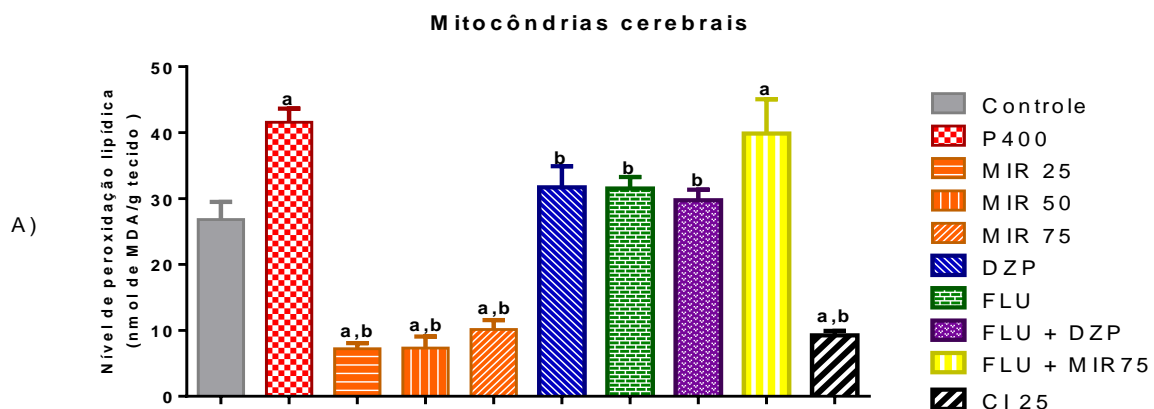
Grupos	Dose ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	LPCE (min)	Crises epiléticas (%)	Taxa de sobrevivência (%)
Controle	-	$16,20 \pm 6,92$	100	00
MIR 25	25	$99,00 \pm 00,00$	20	80
MIR 50	50	$55,00 \pm 00,00$	20	100
MIR 75	75	$23,00 \pm 0,00$	20	100
CI 25	25	$23,00 \pm 0,00$	80	20
DPZ	5	$57,00 \pm 2,00$	40	100
FLU	5	$32,40 \pm 3,75$	100	00
DZP + FLU	5 + 5	$66,33 \pm 2,333$	100	60
MIR + FLU	75 + 5	$82,33 \pm 18,35$	60	100

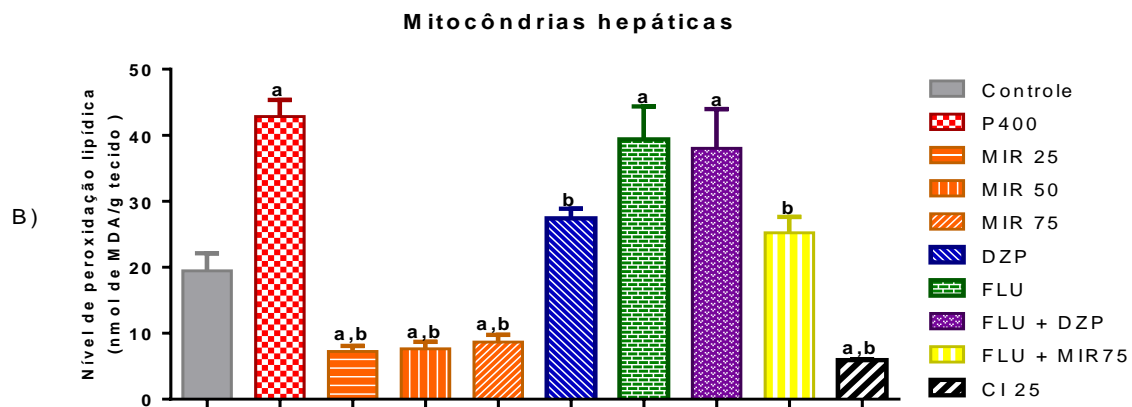
Resultados para a latência para primeira crise epiléptica (LPCE) e latência para o estado de mal epiléptico foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n= 5$ ). Resultados para porcentagem de crise epiléptica e porcentagem de sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental (teste  $\chi^2$ ). Legenda: MIR: (-)-mirtenol, CI: complexo de inclusão, DZP: diazepam e FLU: flumazenil.

Na investigação do envolvimento do (-)-mirtenol na atividade anticonvulsivante por meio do sistema GABAérgico, os animais pré-tratados com flumazenil, um antagonista benzodiazepínico não foi observado a reversão esperada do efeito anticonvulsivante desse monoterpeno, reduzindo o percentual das crises epiléticas em 40% e aumentando a taxa de sobrevivência para 100%, comparados com o grupo controle.

Na quantificação dos percentuais de peroxidação lipídica foi observada uma redução significativa nas mitocôndrias cerebrais de 73,12; 72,64; 62,26%, respectivamente, da produção de nitrito nos animais tratados com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (7,21  $\pm$  0,39); 50 mg kg<sup>-1</sup> (7,33  $\pm$  0,77) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (110,13  $\pm$  0,65); e uma redução de 65,5%, nos animais tratado com complexo de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (9,25  $\pm$  0,68); quando comparados com o veículo (controle negativo; 26,81  $\pm$  2,68;  $p < 0,05$ ; **Figura 10**). Nas mitocôndrias hepáticas os percentuais de da diminuição da peroxidação lipídica foi respectivamente de 62,74; 60,69; 55,55%, nos animais tratados com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (27,25  $\pm$  0,38); 50 mg kg<sup>-1</sup> (7,65  $\pm$  1,06) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (8,65  $\pm$  0,49) e uma redução de 69,47%, nos animais tratado com complexo de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (5,94  $\pm$  0,14); quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo; 19,46  $\pm$  2,65;  $p < 0,05$ ; **Figura 10**).

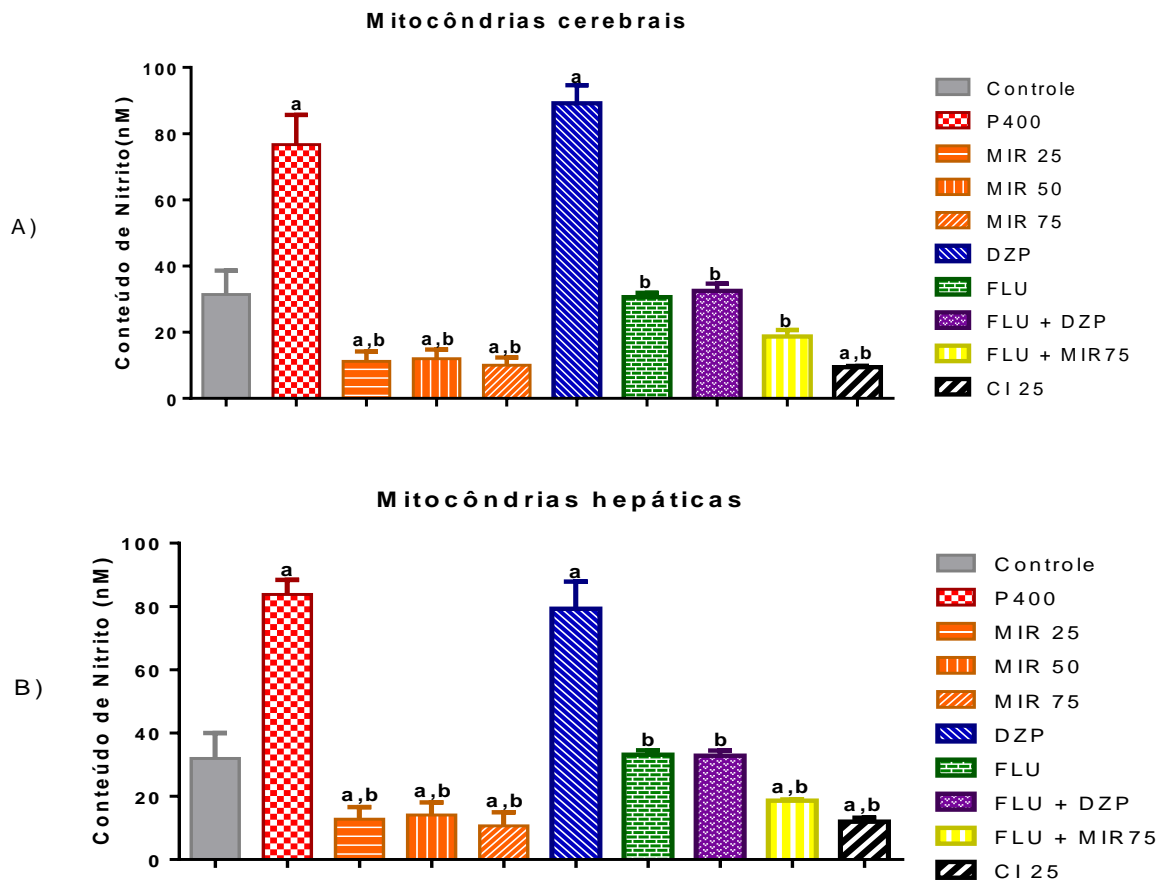
**Figura 10:** Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto aos níveis de peroxidação lipídica. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , comparado com controle negativo (veículo); <sup>b</sup> $p < 0,05$ , comparado com grupo tratado com o controle epilético, pilocarpina (400 mg/kg<sup>-1</sup>). Legenda: P400 (400 mg kg<sup>-1</sup>) = pilocarpina; MIR = mirtenol; CI = complexo de inclusão; DZP (5 mg kg<sup>-1</sup>) = diazepam; FLU (5 mg kg<sup>-1</sup>) = flumazenil.





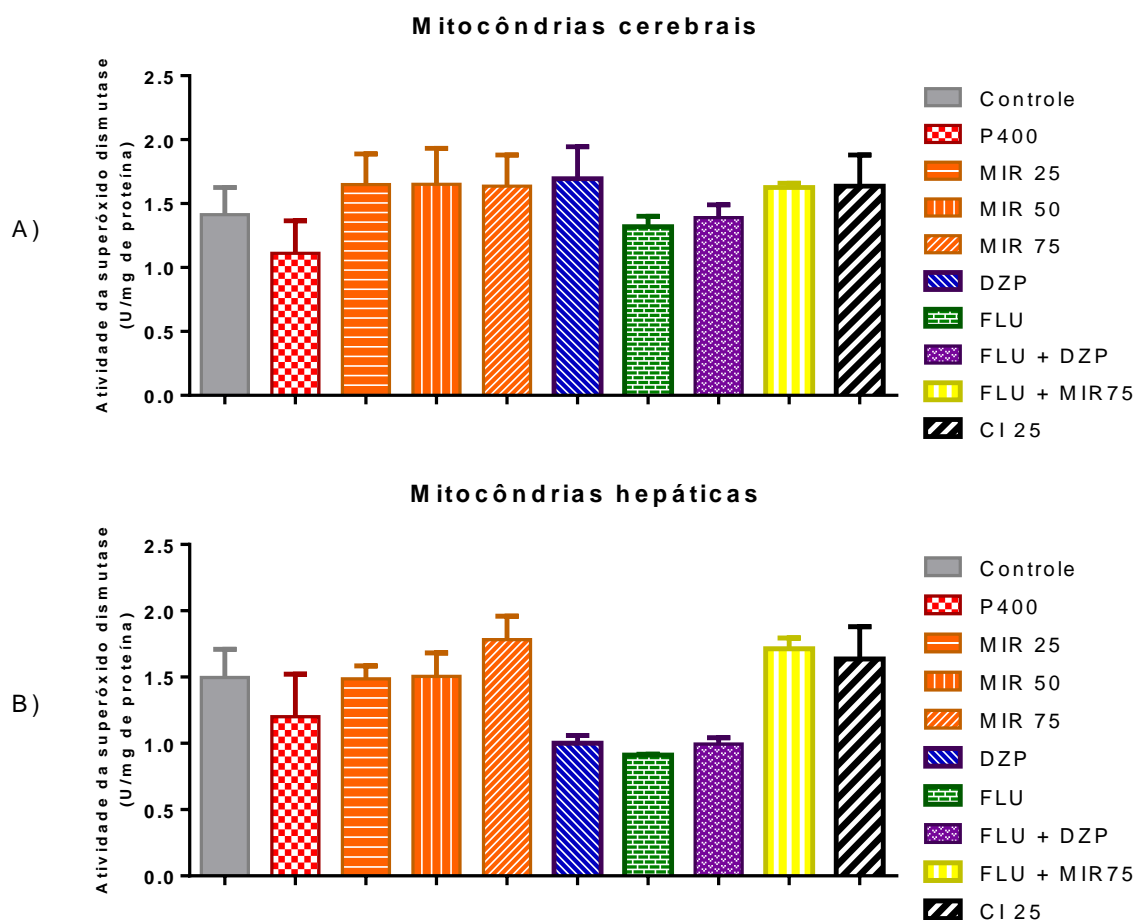
Foi observada uma redução significativa nas mitocôndrias cerebrais de 64,36; 61,81; 67,99; 67,99 e 40,39%, respectivamente, da produção de nitrito nos animais tratados com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (11,18 ± 1,33); 50 mg kg<sup>-1</sup> (11,98 ± 1,24); 75 mg kg<sup>-1</sup> (10,04 ± 1,05); diazepam (5 mg kg<sup>-1</sup>; 89,16 ± 5,47); flumazenil + mirtenol (5 mg kg<sup>-1</sup> + 75 mg kg<sup>-1</sup>; 18,70 ± 2,01) e uma redução de 69,78%, nos animais tratado com complexo de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (9,48 ± 0,33) quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo; 31,37 ± 7,24; p<0,05; **Figura 11**). Resultados semelhantes puderam ser observados na redução de 60,14; 55,82; 66,71; 148,0; 41,71% na produção de nitrito nas mitocôndrias hepáticas de ratos tratados respectivamente com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (12,74 ± 1,72); 50 mg kg<sup>-1</sup> (14,12 ± 1,78); 75 mg kg<sup>-1</sup> (10,64 ± 1,92); flumazenil + mirtenol (5 mg kg<sup>-1</sup> + 75 mg kg<sup>-1</sup>; 18,63 ± 0,39) e uma redução de 40,61%, nos animais tratado com complexo de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (18,63 ± 0,39); quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo; 31,96 ± 8,07; p<0,05; **Figura 11**).

**Figura 11:** Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto aos níveis de produção de nitrito. <sup>a</sup>p<0,05, comparado com controle negativo (veículo); <sup>b</sup>p<0,05, comparado com grupo tratado com o controle epilético, pilocarpina (400 mg/kg<sup>-1</sup>). Legenda: P400 (400 mg kg<sup>-1</sup>) = pilocarpina; MIR = mirtenol; CI = complexo de inclusão; DZP (5 mg kg<sup>-1</sup>) = diazepam; FLU (5 mg kg<sup>-1</sup>) = flumazenil.



Nas avaliações utilizando as mitocôndrias cerebrais e hepáticas não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima superóxido dismutase em todos os grupos e doses testados, quando comparados com os veículos respectivamente (controle negativo;  $1,41 \pm 0,21$ ;  $p < 0,05$  e  $1,50 \pm 0,22$ ;  $p < 0,05$ ;) **Figura 12**.

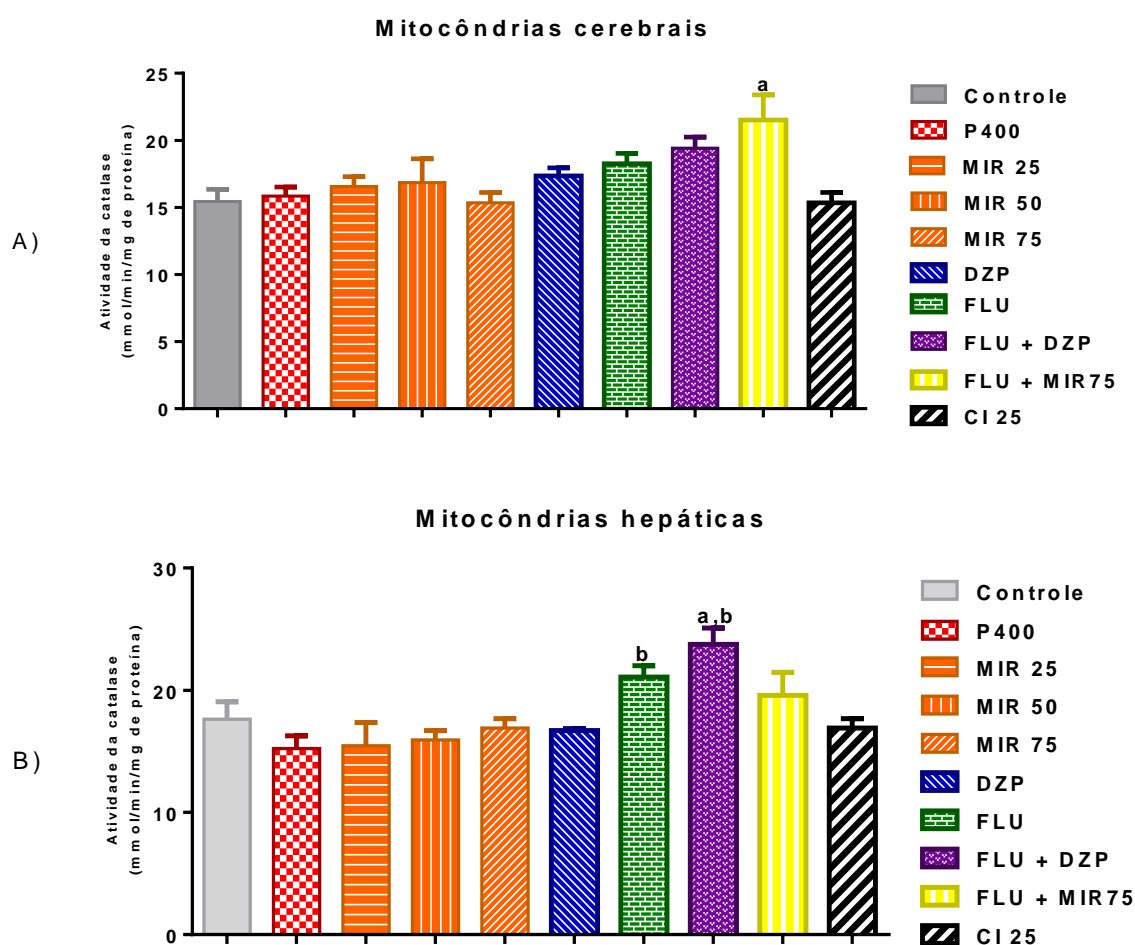
**Figura 12:** Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto aos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , comparado com controle negativo (veículo); <sup>b</sup> $p < 0,05$ , comparado com grupo tratado com o controle epilético, pilocarpina ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Legenda: P400 ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = pilocarpina; MIR = mirtenol; CI = complexo de inclusão; DZP ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = diazepam; FLU ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = flumazenil.



As análises estatísticas mostraram que, apenas as mitocôndrias cerebrais dos animais tratados com flumazenil + mirtenol ( $5 \text{ mg kg}^{-1} + 75 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $18,70 \pm 2,01$ ) proporcionaram um aumento de 39,22 % da ação da enzima catalase em quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo;  $15,45 \pm 0,89$  ;  $p < 0,05$ ) porém a atividade da enzima catalase nas mitocondrias hepáticas dos grupos animais submetidos em todas as doses testados, que foram submetidos ao modelo de crises epilépticas induzidas por pilocarpina, quando comparados em relação ao grupo veículo (controle negativo;  $17,63 \pm 0,63$ ;  $p < 0,05$ )

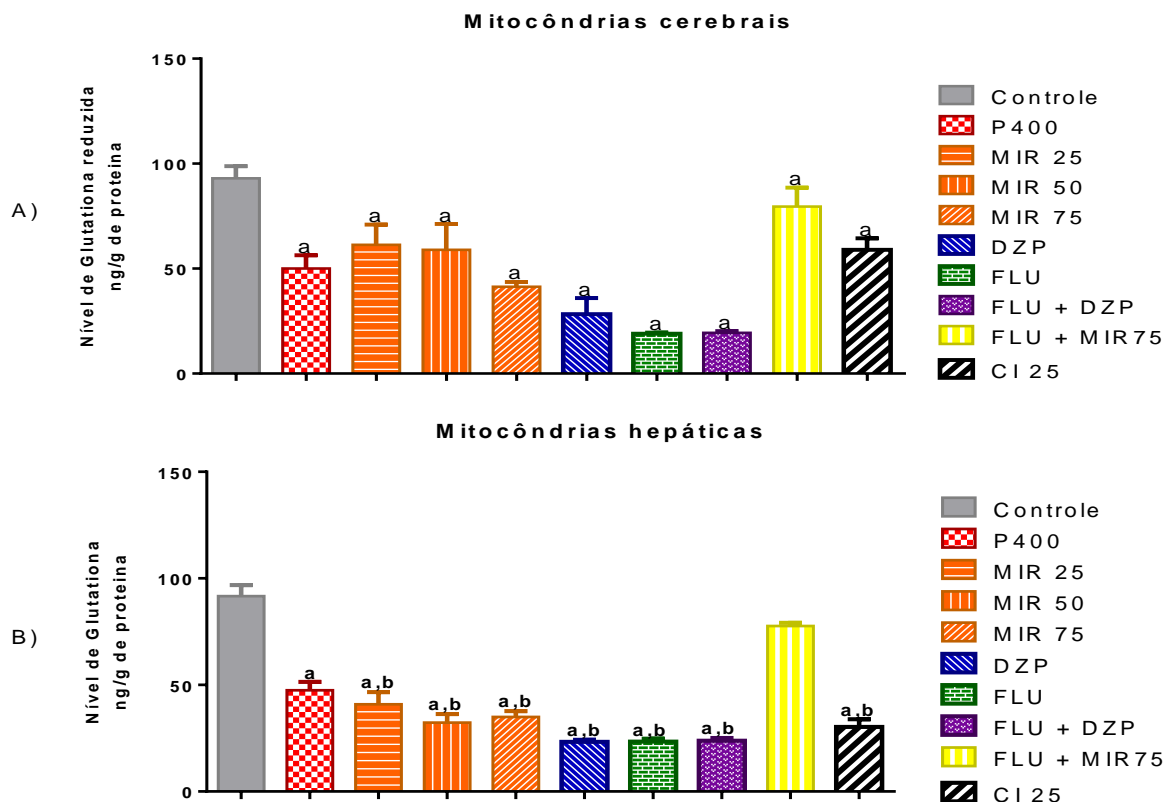
**Figura 13.**

**Figura 13:** Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto a atividade enzimática da enzima catalase. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , comparado com controle negativo (veículo); <sup>b</sup> $p < 0,05$ , comparado com grupo tratado com o controle epiléptico, pilocarpina ( $400 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). Legenda: P400 ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = pilocarpina; MIR = mirtenol; CI = complexo de inclusão; DZP ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = diazepam; FLU ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) = flumazenil.



Os níveis de glutathiona reduzida, foram diminuídos significativamente nas mitocôndrias cerebrais em 73,12; 72,64; 62,26%, nos animais tratados com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (7,21 ± 0,39); 50 mg kg<sup>-1</sup> (7,33 ± 0,77) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (110,13 ± 0,65); e uma redução de 36,64% dos animais tratados com o complexos de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (58,92 ± 5,50); quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo; 26,81 ± 2,68; p<0,05; **Figura 14**). Resultados semelhantes foram observados nas mitocôndrias hepáticas as reduções de GSH foi respectivamente de 55,32; 64,71; 61,83%, nos animais tratados com mirtenol nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> (7,21 ± 0,39) 50 mg kg<sup>-1</sup> (7,33 ± 0,77) e 75 mg kg<sup>-1</sup> (110,13 ± 0,65) e uma redução de 66,89% dos animais tratados com o complexos de inclusão 25 mg kg<sup>-1</sup> (30,34 ± 3,52; quando comparados com o obtido com o veículo (controle negativo; 19,46 ± 2,65; p<0,05; **Figura 14**).

**Figura 14:** Avaliação do estresse oxidativo em mitocôndrias cerebrais (A) e hepáticas (B) quanto a concentração de glutatona reduzida. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , comparado com controle negativo (veículo); <sup>b</sup> $p < 0.05$ , comparado com grupo tratado com o controle epilético, pilocarpina (400 mg/kg<sup>-1</sup>). Legenda: P400 (400 mg kg<sup>-1</sup>) = pilocarpina; MIR = mirtenol; CI = complexo de inclusão; DZP (5 mg kg<sup>-1</sup>) = diazepam; FLU (5 mg kg<sup>-1</sup>) = flumazenil.



Os resultados da ação do mirtenol e seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina nos níveis de TBARS, conteúdo de nitrito, concentração de glutatona reduzida e ação na atividade das enzimas SOD e CAT, em mitocôndrias cerebrais e hepáticas de ratos *Wistar* mostram o promissor potencial antioxidante *ex vivo* das substâncias testadas.

## DISCUSSÃO

Como uma quantidade significativa dos pacientes com epilepsia não obtém resultados satisfatórios no controle de suas crises epiléticas com os medicamentos disponíveis no mercado, há uma necessidade preocupante do desenvolvimento de novos medicamentos (GUERREIRO, 2006; VIDA, 2013), com melhor eficácia e menos efeitos colaterais (RAJ; RAI; RAWAT, 2014), principalmente como a dificuldade de conseguir financiamento para o seu desenvolvimento por partes de indústrias farmacêuticas e de biotecnologia (WILCOX et al., 2013).

A ativação desordenada, sincrônica e rítmica de grupos de neurônios cerebrais causa alterações comportamentais resultando em convulsão. Os agentes farmacológicos utilizados atualmente para inibição das crises epiléticas sendo, denominados anticonvulsivante (GOODMAN; TOMAN; SWINYARD, 1946).

Da mesma forma agiu o (-)-mirtenol e o complexo (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina, inibindo as crises epiléticas induzidas por pilocarpina e todas as doses testadas e aumentando significativamente a taxa de sobrevivência dos animais, porem quando tratado combinado com flumazenil (ALMASIRAD et al., 2004) um antagonista benzodiazepínico antes da pilocarpina, não foi antagonizado completamente, protegendo os animais das crises epiléticas. Este resultado sugere que o mecanismo de ação anticonvulsivante do (-)-mirtenol, provavelmente, não envolve apenas receptores GABAérgicos, desta forma a ação sobre os receptores cerebrais necessitam de uma investigação mais detalhada.

Durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina há um aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS) (MENDES et al., 2010) que por sua vez pode vir a causar vários danos ao organismo vivo (LIOCHEV, 2013).

A capacidade oxidante do oxigênio e atribuída a um par de elétrons não ligantes tornado a molécula reativa, que em contato com compostos orgânicos pode causar processos oxidativo caso não haja um mecanismo de defesa antioxidante no organismo (NOVAES et al., 2014).

Com a necessidade há um aumento da pesquisa em novas drogas antiepiléticas com propriedades neuroprotetoras (MELDRUM, 2001), pois estudos demonstram a eficácia de substancia antioxidantes no tratamento de crises convulsivas, mostrando a importância do combate dos radicais livres que podem causar vários lesões cerebrais (CHAMPNEY et al., 1996; KABUTO; YOKOI; OGAWA, 1998).

A formação de substâncias oxidantes no citoplasma, mitocôndrias e membrana celular, podem vir causar danos ao DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, formando lesões e perda da integridade celular (ANDERSON, DIANA, 1996; ANDERSON, D et al., 1998).

De acordo com os resultados obtidos o (-)-mirtenol e o complexo de inclusão possibilitou a diminuição significativa dos níveis de TBARS formado nas mitocôndrias cerebrais e hepáticas em relação ao grupo controle diminuído os níveis de peroxidação lipídica, sugerindo uma capacidade protetora de membranas celulares (PIRES et al., 2014).

O teor de nitrito foi reduzido significativamente nas mitocôndrias cerebrais e hepáticas em relação ao grupo controle nos animais testados com mirtenol em todas as doses, indicando



que o mesmo promoveu a redução de espécies reativas derivadas de nitrogênio, estudos semelhantes com a isopulegona, mostra o potencial antioxidante dos monoterpenos (SILVA et al., 2012).

A diminuição da concentração de GSH pode estar relacionada com o equilíbrio redox do próprio organismo, que procura reduzir os radicais livres em espécies menos reativas, assim sem diminuir a atividade antioxidante da substância (SHANG et al., 2003).

O presente estudo sugere que o mirtenol e seu complexo podem influenciar nas crises epiléticas e promover ações anticonvulsivantes e neuroprotetoras durante as crises epiléticas. Porém, novos estudos devem ser realizados no intuito de subsidiar futuros ensaios clínicos e o desenvolvimento de um novo fitofármaco com propriedades antiepilético e anticonvulsivante.

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão, são substâncias promissoras como antiepilépticas, diminuindo as crises epilépticas dos animais testados, bem como aumentou as suas taxas de sobrevividas e antioxidante *ex vivo*, diminuindo os danos neurais causados após indução das crises epilépticas promovendo neuroproteção, porém o (-)-mirtenol apresentou uma atividade superior em comparação ao seu complexo de inclusão, esse fato pode ser explicado pela solubilidade reduzida do complexo de inclusão refletindo na sua biodisponibilidade, conseqüentemente diminuindo a eficiência.

## REFERÊNCIAS

AHMED, M. A. E. Neuroprotective Effects of Idebenone Against Pilocarpine-Induced Seizures: Modulation of Antioxidant Status, DNA Damage and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Rat Hippocampus. **Neurochemical research**, v. 39, n. 2, p. 394-402, 2014.

ALI, R.; SIDDIQUI, N. COMPUTATIONAL PARAMETERS OF NEWER BENZOTHAZOLES AS ANTICONVULSANTS. 2014.

ALMASIRAD, A. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 24, p. 6057-6059, 2004.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDERSON, D. et al. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 398, n. 1, p. 151-161, 1998.

BASHKATOVA, V. et al. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylentetrazole-induced seizures. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 183-190, 2000.

BRITTON, C.; MEHLEY, A. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 2, 1955.

CHAMPNEY, T. H. et al. Acute and chronic effects of melatonin as an anticonvulsant in male gerbils. **Journal of pineal research**, v. 20, n. 2, p. 79-83, 1996.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. [136] Assay of catalases and peroxidases. **Methods in enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.

CLYNEN, E. et al. Neuropeptides as Targets for the Development of Anticonvulsant Drugs. **Molecular neurobiology**, p. 1-21, 2014.

COSTA, J. et al. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, 2012.

DA COSTA, M. A. C. et al. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 14, 2009.

DIAS, J. F.; MIGUEL, M. D. ESTUDO ALELOPÁTICO APLICADO DE ASTER LANCEOLATUS, WILLD. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 1, 2005.

DRAPER, H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

FABROWSKI, F. J. GOMO ESPÉCIE PRODUTORA DE ÓLEO ESSENCIAL NO SUL DO BRASIL. 2002. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of Lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.

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

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. [10] Superoxide dismutase assays. In: LESTER, P. (Ed.). Methods in enzymology: **Academic Press**, v. Volume 105, 1984. p.93-104.

FREITAS, R. M. Um possível mecanismo de ação para o efeito anticonvulsivante do p-cimeno. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 67-74, 2014.

GARRET, M. The  $\gamma 2$  (R43Q) mutation linked to epilepsy affects GABAA receptor internalization. **Molecular & Cellular Epilepsy**, v. 1, n. 1, p. 24, 2014.

GOODMAN, L. S.; TOMAN, J. E.; SWINYARD, E. A. The anticonvulsant properties of Tridione: laboratory and clinical investigations. **The American journal of medicine**, v. 1, n. 3, p. 213-228, 1946.

GREEN, L. C.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUARNIERI, L. D. O. Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GUERREIRO, C. A. Historical origin and antiepileptic drug development. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p. 18-21, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine, 4th edn. Clarendon: **Oxford** 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HOOD, S. D. et al. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British journal of clinical pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285-294, 2014.

KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin Inhibits Iron-Induced Epileptic Discharges in Rats by Suppressing Peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, n. 3, p. 237-243, 1998.

KUTLUHAN, S. et al. Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylentetrazol-induced epileptic rats. **Biological trace element research**, v. 129, n. 1-3, p. 181-189, 2009.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARIZ, S. R.; DA SILVA, B. A. A importância de canais iônicos para a ação de fármacos causadores de dependência. **Revista de Ciências Médicas**, v. 15, n. 2, 2012.

MELDRUM, B. S. Why and when are seizures bad for the brain? **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 9, p. 445-446, 2001.

MENDES, R.; FREITAS, A.; TOM, R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 3, p. 105-108, 2010.

NOVAES, G. M. et al. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NOS ORGANISMOS. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 535-539, 2014.

PEIXOTO, F. et al. Characterization of liver mitochondria from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mitochondrial bioenergetics alterations caused by exposure to oxyfluorfen herbicide. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 386-392, 2009.

PIRES, L. F. et al. Is There a Correlation Between In Vitro Antioxidant Potential and In Vivo Effect of Carvacryl Acetate Against Oxidative Stress in Mice Hippocampus? **Neurochemical research**, v. 39, n. 4, p. 758-769, 2014.

RAJ, V.; RAI, A.; RAWAT, J. In Silico Design and Computational Study of Novel 1, 3, 4-Thiadiazole Derivatives as Potential Affinity with NA/H Exchanger Receptor for Anticonvulsant Activity. **PharmaTutor**, v. 2, n. 5, p. 113-119, 2014.

RIGOULOT, M.-A. et al. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 787-795, 2004.

ROCHA, T. J. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 113-118, 2014.

RODRIGUES, A. D. Atividade antioxidante e anticonvulsivante de suco de uva bordô e seu efeito no comportamento de ratos wistar. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

SANTOS, R. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Rev. bras. plantas med**, v. 14, n. spe, p. 224-234, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHANG, F. et al. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 521-530, 2003.

SILVA, O. A. et al. Evaluation of the antioxidant effects *in vitro* of the isopulegone. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 50-55, 2012.

SMITH, G. R. et al. Small-Molecule Anticonvulsant Agents with Potent In Vitro Neuroprotection and Favorable Drug-Like Properties. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 52, n. 3, p. 446-458, 2014.

TROJNAR, M. K. et al. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs. **Polish journal of pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 557-566, 2002.

VIDA, J. Anticonvulsants. **Elsevier**, 2013.

WIARD, R. P. et al. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. **Stroke**, v. 26, n. 3, p. 466-472, 1995.

WILCOX, K. S. et al. Issues related to development of new antiseizure treatments. **Epilepsia**, v. 54, n. s4, p. 24-34, 2013.

## 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi verificado que o (-)-mirtenol e seu complexo de inclusão apresentam atividade antiepilética, no modelo de indução de crises epiléticas por pilocarpina, reduzindo o tempo pra primeira crise epilética, percentual de crises epiléticas e aumentado a taxa de sobrevivências do animais testados, e atividade antioxidante *ex vitro* diminuindo os danos neurais causados após indução das crises epiléticas promovendo neuroproteção. E verificado também que o (-)-mirtenol pode forma complexo de inclusão com ciclodextrina, proporcionando a obtenção de uma forma mais estável. Fundamentado nos resultado obtidos (-)-mirtenol e o complexo de inclusão (-)-mirtenol- $\beta$ -ciclodextrina podem ser utilizados como agentes ativo de formulações farmacêuticas com um promissores agente antiepiléticos com propriedades neuroprotetoras.