



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

**Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do
limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento**

ANTONIA AMANDA CARDOSO DE ALMEIDA

Teresina – Piauí

2013

ANTONIA AMANDA CARDOSO DE ALMEIDA

Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento

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

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2013

ANTONIA AMANDA CARDOSO DE ALMEIDA

Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior (1º Examinador)

Departamento de Química – IFPI

Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira (2º Examinador)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

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. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista:

A DEUS por me proporcionar inúmeros momentos de aprendizagem e por colocar pessoas maravilhoas em minha vida.

Aos meus pais por me ensinarem a viver sempre com dignidade e caráter.

À minha irmã por não me deixar fraquejar nos momentos de dificuldade.

Aos meus amigos e familiares pelo companheirismo e compreensão.

Em especial dedico essa vitória com a mais profunda gratidão e respeito a meu namorado Rusbene Bruno e ao meu orientador Rivelilson Mendes, duas pessoas que fizeram a diferença desde o momento em que entraram em minha vida, por sempre fazerem o possível para ajudar e por muitas vezes acreditarem em mim quando nem mesmo eu acreditava, por terem sido o impulso para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão e uma atitude de amor. Agradeço a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus e a Virgem Maria por sempre me conceder forças, coragem para que eu possa trabalhar e conquistar meus objetivos.

Aos meus pais *Maria Luiza Breve Cardoso* e *José Alves Magalhães de Almeida*, por todo esforço, paciência, dedicação e incentivos despendidos a minha educação e formação.

À minha irmã *Fernanda Maria*, pela amizade, compreensão e apoio durante a jornada.

Aos meus avós, tios, tias, primos, madrinhas e padrinhos que cada um de sua maneira sempre estiveram efetivos em minha vida, dando exemplos e contribuindo para minha formação humana e entendendo minha ausência em muitos momentos.

Ao meu namorado, *Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho*, por me ajudar em todos os momentos, compreendendo e apoiando em minhas decisões. Por ter sido minha força e refúgio quando me sentia desacreditada e perdida nos meus objetivos.

Ao meu orientador *Dr. Rivelilson Mendes de Freitas*, pela amizade, compreensão, paciência, apoio e confiança em meu trabalho; seus grandes ensinamentos e conselhos deram uma enorme contribuição em minha vida.

Aos meus amigos de graduação e pós-graduação, pelo apoio e incentivo durante a jornada.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório (LAPNEX), pela convivência e grande contribuição em minha vida, em especial *Katricia*, por ter me apresentado

a essa família, Iwyson, Pauline e Jéssica sempre dispostos a ajudar, me auxiliando em todas as etapas.

Aos professores, *Dr. Damião Pergentino de Sousa e Dr. Luciano da Silva Lopes*, pelas contribuições em meu trabalho.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, incentivo financeiro durante a pesquisa.

À *Universidade Federal do Piauí* pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Aos *membros da banca* por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste trabalho.

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

Ezequiel (47:12)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Transtorno de ansiedade.....	20
3.2 Estresse oxidativo.....	21
3.3 Terpenóides.....	22
3.4 Epóxilimoneno.....	23
Referências.....	24
4. CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	34
Referências.....	39
5. CAPÍTULO II: Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico do epóxilimoneno	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	50
Discussão.....	54
Referências.....	57
6. CAPÍTULO III: Efeito ansiolítico e potencial antioxidante de um derivado semissintético do limoneno	62
Resumo.....	63
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	66
Resultados.....	72

Discussão.....	79
Referências.....	85
7. CAPÍTULO IV: Composições à base de epóxilimoneno para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central.....	91
Resumo	92
Reinvidicações.....	93
Considerações finais.....	94
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....	95
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BZP	Benzodiazepínicos
CAT	Catalase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DLM	Dose letal mínima
DL ₅₀	Dose que mata 50% da população de uma amostra
DMT	Dose máxima tolerada
DZP	Diazepam
EL	Epóxilimoneno
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
NEBA	Número de entrada nos braços abertos
PEAB	Porcentagem de entradas para os braços abertos
pg	Picograma
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
U mL ⁻¹	Unidades por mililitro
U L ⁻¹	Unidades internacionais por litro
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Ilustração 1	Figura - Estrutura molecular do epóxilimoneno	24
---------------------	---	----

CAPÍTULO I

Ilustração 1	Figura - Processo de obtenção do epóxilimoneno por meio da reação de epoxidação do limoneno.....	33
---------------------	--	----

CAPÍTULO II

Ilustração 1	Figura - Representação do campo aberto usados nos experimentos para avaliar a atividade locomotora.....	49
Ilustração 2	Figura - Representação do labirinto em cruz elevado usados nos experimentos para avaliar o efeito ansiolítico.....	49
Ilustração 3	Figura - Representação da barra giratória usada para avaliar a coordenação motora.....	50

CAPÍTULO III

Ilustração 1	Figura - Estrutura molecular do epóxilimoneno.....	67
Ilustração 2	Figura - Teste de esconder esferas (<i>marble-burying test</i>), demonstrando (A) a caixa de acrílico com a distribuição das 25 esferas de vidro e (B) o camundongo <i>Swiss</i> escondendo as esferas com a serragem durante o teste.....	70
Ilustração 3	Gráfico - Avaliação do potencial antioxidante do epóxilimoneno contra a formação do íon nitrito.....	72
Ilustração 4	Gráfico - Avaliação do potencial do epóxilimoneno contra a formação do radical hidroxila.....	73
Ilustração 5	Gráfico - Efeitos do epóxilimoneno na produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.....	74
Ilustração 6	Gráfico - Número de esferas escondidas por animais tratados com uma única dose de epóxilimoneno (Dia 0) e com 14 doses de epóxilimoneno (Dia 14), via oral.....	75
Ilustração 7	Gráfico - Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de	

	camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda e submetidos ao teste de esconder esferas.....	76
Ilustração 8	Gráfico - Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.....	77
Ilustração 9	Gráfico - Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.....	78
Ilustração 10	Gráfico - Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.....	79
Ilustração 11	Figura - Possíveis mecanismos de sequestro de radicais livres (Rad [•]) pelo epóxilimoneno.....	82

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I**

Tabela 1	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com epóxilimoneno.....	34
Tabela 2	Parâmetros hematológico de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com epóxilimoneno.....	36

CAPÍTULO II

Tabela 1	Efeitos de doses únicas de epóxilimoneno administrado por via intraperitoneal em camundongos.....	51
Tabela 2	Efeitos de epóxilimoneno em camundongos no teste de campo aberto.....	52
Tabela 3	Efeitos do epóxilimoneno em camundongos no labirinto em cruz elevado.....	53
Tabela 4	Efeitos de epóxilimoneno em camundongos no teste da barra giratória.....	54

Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento. ANTONIA AMANDA CARDOSO DE ALMEIDA. Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

O epóxilimoneno (EL) é um derivado oxigenado do limoneno, caracterizado por ser um éter cíclico de três elementos formando um anel epóxido. No entanto, ainda não há pesquisas sobre a toxicidade aguda e propriedades sobre o sistema nervoso central (SNC) desse terpenóide. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo a investigação da sua toxicidade, potencial antioxidante e propriedades farmacológicas sobre o SNC. Para tanto, a presente dissertação foi dividida em quatro capítulos para facilitar a compreensão dos protocolos experimentais realizados. No primeiro capítulo, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda após a administração do EL em camundongos tratados com doses repetidas (25, 50 e 75 mg/kg) por via oral (v.o) em parâmetros bioquímicos e hematológicos. A administração aguda com as doses selecionadas do EL, não induziu modificações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. No segundo capítulo foi determinado a dose letal 50% (DL₅₀) usando as doses de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg kg⁻¹. Os testes revelaram o valor da DL₅₀ de 4000 mg kg⁻¹. Foi investigado ainda os possíveis efeitos sedativo e ansiolítico do EL em camundongos, bem como a avaliação do mecanismo de ação utilizando os testes de campo aberto (TCA), teste da barra giratória e labirinto em cruz elevado (LCE). No TCA, o tratamento com EL, com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg via intraperitoneal (i.p.), produziu uma redução no número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*. No teste LCE, o EL aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos. Além disso, EL (75 mg/kg) também produziu uma inibição significativa da coordenação motora. Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil (25 mg/kg, i.p.), sugerindo que o EL, possui atividades sedativa e ansiolítica, mediados pelos receptores GABAérgicos. O terceiro capítulo avaliou a atividade ansiolítica do EL por meio do teste de esconder as esferas (TEE) e investigou seu potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* no hipocampo de camundongos adultos. Os resultados complementam os achados do segundo capítulo em relação ao efeito ansiolítico, uma vez que foi observado uma redução no número de esferas escondidas nos grupos tratados com EL nas doses de 25, 50, 75 mg/kg (v.o) em relação ao diazepam e ao veículo, essa redução foi observada no tratamento com dose única e repetidas, reforçando a hipótese do efeito ansiolítico desse terpenóide. Os resultados dos testes antioxidante *in vivo* demonstram uma concentração efetiva inibitória 50% de 0,7342, 1,296 e 1,169 µg/mL contra a formação do íon nitrito, radical hidroxila e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, respectivamente. Para as análises antioxidantes *in vivo* os camundongos foram tratados com Tween 80 (0,05%) dissolvido em solução salina 0,9% (v.o), ácido ascórbico 250 mg/kg (v.o.) e com EL com as doses de 25, 50, 75 mg/kg, (v.o). O tratamento com EL reduziu o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante *in vivo* uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Além disso, o EL aumentou a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no hipocampo de camundongos, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido à modulação positiva dessas enzimas. O quarto capítulo refere-se à solicitação de registro de patente submetido ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia que teve como objetivo solicitar a aplicação farmacêutica do epóxilimoneno, para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao SNC (Processo BR1020120135167).

Palavras-chave: Ensaio pré-clínico, Epóxilimoneno, Fitomedicamento, Teste de esconder as esferas.

Antioxidant and anxiolytic potential of a semisynthetic compound derivative of limonene: emphasis on designing of a phytomedicine. ANTONIA AMANDA CARDOSO DE ALMEIDA. Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master's thesis. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

ABSTRACT

Limonene oxide (LO) is an oxygenated derivative of limonene, characterized for being a cyclic ether of three elements forming an epoxide ring. However, there are still no researches about its acute toxicity and properties over Central Nervous System (CNS). Thus, this study aimed to investigate its antioxidant potential, toxicity and pharmacological properties over CNS. So the present thesis was divided in four chapters. In the first chapter, it was made the evaluation of acute toxicity after administration of LO in mice treated with repeated doses (25, 50 and 75 mg/kg) by oral administration (p.o.) in biochemistry and hematologic parameters. Acute administration with LO selected doses, do not induced changes on biochemistry and hematologic parameters. In the second chapter, it was determined the median lethal dose (LD₅₀) using doses of 500, 1000, 2000, 3000 and 4000 mg kg⁻¹. Tests revealed the value of LD₅₀ about 400 mg kg⁻¹. It also was investigated the possible LO anxiolytic effect in mice, as well the evaluation of mechanism of action using the open field test (OFT), rotarod performance test and elevated plus maze test (EPM). In OFT, treatment with LO, with doses of 25, 50, 75 mg/kg intraperitoneal (i.p.), produced decrease on number of crossings, grooming and rearing. IN EPM, LO increased time spent in the open arms and number or entries into open arms. Besides, LO (75 mg/kg) also produced an inhibition of motor coordination. All these effects were reverted by pre-treatment with flumazenil (25 mg/kg, i.p.), suggesting that LO has sedative and anxiolytic activity, which may involve benzodiazepines receptors. Third chapter evaluated LO anxiolytic activity by the marble burying test (MBT) and investigated its antioxidant potential in vitro and in vivo in hippocampus of adult mice. The results complement what was found in second chapter about anxiolytic effect, once it was observed a reduction in the number of buried marbles in groups treated with LO in doses of 25, 50 and 75 mg/kg (p.o.) in relation to diazepam and vehicle, this reduction was observed in the treatment with single and repeated doses, reinforcing hypothesis of anxiolytic effect of this terpenoid. Results of antioxidant tests in vitro show a half maximal inhibitory concentration of 0.7342, 1.296 and 1.169 µg/mL against formation of nitrite ion, hydroxyl radical and thiobarbituric acid reactive substances. For antioxidant in vivo analyses, mice were treated with Tween 80 0,05% dissolved in saline solution 0,9% (i.p.), ascorbic acid 250 mg/kg (i.p.) and with LO in doses of 25, 50 and 75 mg/kg, i.p. Treatment with LO reduced the level of lipid peroxidation and nitrite content, suggesting an antioxidant role in vivo once it was able to reduce formation of reactive oxygen and nitrogen species. Besides, LO increased the activities of the enzymes catalase and superoxide dismutase in mice hippocampus, suggesting that its antioxidant role may be due to positive modulation of these enzymes. Fourth chapter refers to application for patent registration submitted to Nucleus of Innovation and Technology Transference, in order to subsidize the development of a new pharmaceutical formula, based on LO, to prevent and/or treat disorders related to CNS Process BR1020120135167.

Keywords: Preclinical testing, Limonene epoxide, Phytomedication, Marble-burying teste.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que tem uma diversidade vegetal que representa uma das maiores do mundo. Apresenta aproximadamente 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000, e destas espécies muitas apresentam atividade biológica (RODRIGUES et al., 2010). Os estudos com plantas medicinais são crescentes devido à sua capacidade de produzir moléculas com atividade terapêutica. Uma planta pode ser classificada como medicinal quando produz substâncias com potencial farmacológico. O conhecimento da atividade medicinal das plantas vem desde os primórdios da humanidade até a atualidade, sendo utilizada para diversos fins, como alimentação, prevenção e tratamento de doenças (SOUTO-MAIOR et al., 2011).

Dentre os compostos obtidos a partir de plantas medicinais, podem ser destacados os óleos essenciais que são misturas de um número variável de substâncias orgânicas. Dentre os inúmeros constituintes destes óleos, encontram-se os terpenos e terpenóides. Os terpenos são formados pela condensação de unidades de isopreno (C₅), podendo se apresentar na forma de monoterpenos, sequiterpenos, triterpenos e seus derivados oxigenados (terpenóides) (FRANZ, 2010).

No caso dos óleos essenciais dos gêneros *Citrus* em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente principal. O limoneno, um monoterpeno monocíclico é um dos constituintes do óleo essencial de mais de 300 espécies de vegetais. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas e folhas de *Citrus limon* Burm e das folhas de *Carum carvi* Lindl. (MARÓSTICA JR; PASTORE, 2007; CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b). Devido ao fato de ser facilmente disponibilizados como resíduo da indústria de sucos cítricos e obtido de fonte renovável, indústrias como farmacêutica, química e alimentícia têm demonstrado grande interesse pelos derivados oxigenados do limoneno (BICAS, 2009).

Dentre estes derivados oxigenados podem ser destacados os epóxidos, que são éteres cíclicos de três elementos formando um anel epóxido. Esses éteres possuem propriedades específicas devido à sua alta reatividade. Devido à baixa estabilidade desse anel e a facilidade de reagir com ácidos e bases, os epóxidos são largamente empregados como intermediários em sínteses orgânicas (BASEIO, 2005). Dentre esses epóxidos pode ser destacado o epóxilimoneno que é utilizado na fabricação de resinas, pigmentos, tintas, adesivos, cosméticos e de solventes biodegradáveis bastante utilizados pela população em geral (ARRUDA, 2007).

A identificação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação, vêm sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia (BRAZ FILHO, 2010). Assim, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças é um área de interesse crescente de diversos grupos de pesquisa. Nesse sentido, esse estudo foi realizado com o intuito de desenvolver novos fármacos originados de constituintes derivados de moléculas presentes em plantas medicinais.

Nesse contexto, o trabalho de dissertação intitulado ***“Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento”*** foi organizada em capítulos originados de artigos científicos submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica e do pedido de registro de patente submetido junto ao Núcleo Inovação Tecnológica. Foram realizados testes em modelos experimentais já validados e diversos equipamentos foram utilizados para os experimentos *in vivo*, campo aberto, labirinto em cruz elevado, teste de esconder as esferas e teste da barra giratória. Além disso, houve um depósito de registro de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, uma vez que há uma necessidade crescente da transferência de tecnologia entre universidade e indústria com o objetivo de favorecer a construção de pontes que favoreçam as ligações entre os dois setores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as propriedades psicofarmacológicas do epóxilimoneno, bem como investigar seu perfil de toxicidade aguda.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a toxicidade do monoterpeno epóxilimoneno em camundongos tratados de forma aguda com doses repetidas por via oral em parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Determinar os efeitos de toxicidade aguda e o efeito ansiolítico do epóxilimoneno em modelos animais de ansiedade;
- Investigar a atividade ansiolítica do epóxilimoneno por meio do teste de esconder as esferas (TEE) e avaliar seu potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* no hipocampo de camundongos adultos.
- Explorar o uso do epóxilimoneno e a sua utilização na formulação de produtos farmacêuticos para a prevenção e/ou tratamento de ansiedade e distúrbios do sono.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Transtorno de ansiedade

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos. Muitas vezes está associada com uma resposta a situações de perigo, ameaças reais, estresses e desafios do cotidiano, podendo apresentar sintomas somáticos, cognitivos, comportamentais, emocionais e perceptivos. A ansiedade passa a ser patológica quando apresenta um quadro emocional desagradável e incômodo que surge sem estímulo externo apropriado, sendo caracterizado quando a frequência, intensidade e duração destes eventos estão aumentadas e associadas ao prejuízo no desempenho pessoal, social ou profissional do indivíduo (RODRIGUES, 2011).

A forma patológica contribui significativamente para o surgimento de outros transtornos que se apresentam de diferentes modos. No entanto, é provável que todos eles sejam ocasionados pelos mesmos circuitos neurológicos. A ansiedade é considerada uma das condições psiquiátricas mais comuns, afetando de 10 a 30% da população. É debilitante e reduz significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado (MULUMO et al., 2012).

Os medicamentos ansiolíticos são historicamente o tratamento utilizado para os transtornos de ansiedade. Os benzodiazepínicos (BZP) são os ansiolíticos de primeira linha para os transtornos de ansiedade, representa uma das classes de medicamentos mais consumidas mundialmente, e foi o tratamento de escolha por muitos anos. A sua eficácia na redução dos sintomas somáticos tem sido documentada, porém produzem pouca melhora nos sintomas psíquicos da ansiedade e têm eficácia questionável no tratamento crônico (FIRMINO et al., 2011).

Atualmente, no Brasil, outro fármaco também tem sido utilizado, a buspirona, pertencente ao grupo das azapirona (azaspirona, azaperona ou azaspirodecanodiona). Entretanto, esse medicamento não só é considerado ineficaz em alguns casos, como na síndrome do pânico, bem como apresentam uma demora variável para produção do efeito ansiolítico (FAUSTINO et al., 2010).

Apesar dos fármacos mostrarem eficácia, a sua administração tem alguns inconvenientes provocados por uma vasta gama de efeitos colaterais. Os mais comuns são declínio cognitivo, sedação indesejada, coordenação reduzida, aumento do risco de acidentes, comprometimento da memória, alterações do humor e fadiga. Além disso, o uso em longo prazo pode levar a tolerância, síndrome de abstinência e dependência física e psicológica (BENÍTEZ et al., 2008; AUTHIER et al., 2009).

Estudos para descoberta de novas moléculas para o tratamento desta patologia é de extrema necessidade, a fim de desenvolver um tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais. Em pesquisas para descoberta de moléculas promissoras para o tratamento de transtornos de ansiedade vem sendo investigado também seu potencial antioxidante, visto que há um aumento do estresse oxidativo na ansiedade (HOVATTA et al., 2010; RECKZIEGEL et al., 2011).

3.2 Estresse oxidativo

Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados e têm sido implicados na patogênese de muitas doenças. São instáveis e podem reagir com diversos compostos celulares. O cérebro está exposto a vários radicais livres, uma vez que estas participam de reações essenciais, são constantemente formadas e podem se tornar prejudiciais, quando sua produção encontra-se superior ao normal pelos sistemas oxidantes (FREEMAN, 2012).

Os radicais livres são potencialmente patogênicos. São derivados do metabolismo do oxigênio (O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), óxido nítrico (NO) e outros (SOUZA et al., 2009). O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio e do metabolismo de diversas moléculas biológicas. O radical OH^{\cdot} é a espécie de oxigênio mais reativa sendo capaz de produzir a oxidação de grupamentos sulfidril em diversas proteínas, culminando em peroxidação lipídica neuronal. Embora, exerça diversas funções em determinadas condições o NO e o $O_2^{\cdot-}$ podem interagir, resultando no peroxinitrito ($ONOO^-$). Esse composto é capaz de reagir com diversas moléculas cerebrais, danificando-as, durante o estabelecimento de transtornos psicossociais (BARBOSA et al., 2010).

Para proteger o cérebro, as células dispõem dos sistemas de defesa enzimática, como glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-Rd) (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidos no organismo sob rigoroso controle destes sistemas. A SOD está presente na mitocôndria e citossol, converte o radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Esta corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos e existe em duas isoformas. A isoforma SOD-cobrezinco citossólica e a SOD-manganês mitocondrial. A catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 na dependência do NADPH. E a GSH-Px é a principal enzima responsável pela remoção de H_2O_2 e de peróxidos orgânicos através da conversão da GSH em glutathiona oxidada (GSSG) (COGO et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

Tem sido relatado que em situações estressantes ocorre diminuição no metabolismo cerebral de radicais livres (FREEMAN, 2012) com um aumento dos níveis de lipídio peroxidação (FERRETTI; BACCHETTI, 2011) e nitrito (KUMAR et al., 2012), embora esses achados não sejam relatados em todos os modelos farmacológicos. Estas condições patológicas, portanto, apesar de serem decorrentes de maior atividade neuronal pró-oxidante com conseqüente redução na atividade de enzimas antioxidantes cerebrais, precisam ser melhores investigadas.

O sistema de defesa não enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Como já comprovado as moléculas derivadas de plantas medicinais possuem potente efeito antioxidante, dentre eles destacam-se os terpenos e terpenóides que são os principais constituintes dos óleos essenciais extraídos de vegetais (BARBOSA et al., 2010; SINGH et al., 2012).

3.3 Terpenóides

Os óleos essenciais podem apresentar uma mistura de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que destes, dois ou três compostos podem ser considerados majoritários por estarem presentes em altas concentrações (20 a 70%). Geralmente, estes componentes majoritários determinam as propriedades biológicas do óleo essencial. Eles incluem dois grupos de distintas origens biossintéticas, o primeiro grupo é formado por terpenos e terpenoides e o segundo grupo por fenil propanóides, ambos de baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008). Os primeiros são formados pela condensação de unidades de isopreno (C_5) que são provenientes da rota biossintética do ácido mevalônico ou do fosfato de deoxi-xilulose. Os fenil propanóides são biossintetizados a partir da rota do ácido chiquímico (DEWICK, 2009).

Os terpenos mais comumente encontrados são monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}) (BAKKALI et al., 2008). Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente oxigênio, são denominados terpenóides. Os terpenóides representam uma das maiores e mais variadas classes de metabólitos secundários de origem natural, com mais de 55.000 membros já isolados (SILVA et al., 2009; FATURI et al., 2010).

As transformações dos terpenos podem ser realizadas por meio de processos catalíticos envolvendo inúmeros tipos de reações como isomerização, hidrogenação, carbonilação, oxidação,

metátese, dimerização e outras. As metodologias citadas são utilizadas normalmente para adicionar maior eficácia ou menor toxicidade aos monoterpenos (COSTA et al., 2011).

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

As plantas do gênero *Citrus* foram anteriormente estudadas em relação à atuação no sistema nervoso central e suas propriedades ansiolítica e antidepressiva foram comprovadas, essas atividades farmacológicas são atribuídas ao limoneno, monoterpeneo majoritário presente no óleo essencial extraído das plantas deste gênero (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b; SÁ et al., 2012). O limoneno é geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência à autoxidação e polimerização, tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial (MARÓSTICA JR; PASTORE, 2007), dentre estes compostos oxigenados derivados do limoneno pode ser destacado o epóxilimoneno molécula utilizada no presente estudo.

3.4 Epóxilimoneno

A reação de epoxidação do (+)-limoneno foi executada com o ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB), o qual é utilizado na epoxidação de olefinas não funcionalizadas. A dupla ligação C=C do limoneno é bastante nucleofílica e reage com esse perácido, o qual atua como eletrófilo (VON HOLLEBEN; SCHUCH, 1997), resultando na formação do epóxilimoneno.

O epóxilimoneno, 1-metil-4-(prop-1-en-2-il)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano, **Ilustração 1**, é um éter cíclico de três elementos formando um anel epóxido e encontrado no estado líquido a temperatura ambiente. Possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, massa molar 142 g/mol, volume molar de $156,5 \pm 3,0 \text{ cm}^3$, índice de refração de $1,490 \pm 0,02$, tensão superficial de $31,0 \pm 3,0 \text{ dyn/cm}$, densidade de $0,972 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$.

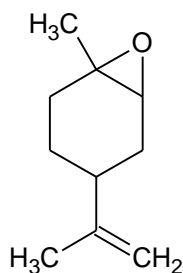


Ilustração 1. Estrutura molecular do 1-metil-4-(prop-1-en-2-il)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano.

REFERÊNCIAS

AUTHIER, N.; BALAYSSACA, D.; SAUTEREAUC, M.; ZANGARELLI, A.; COURTY, P.; SOMOGYID, A.A.; VENNAT, B.; LLORCA, P.M.; ESCHALIER, A. Benzodiazepine dependence: Focus on withdrawal syndrome. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 67, n. 6, p. 408-413, 2009.

ARRUDA T.A. **Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Mentha x villosa* Hudson, Rotundifolona e Análogos sobre Microrganismos e Plasmídios de Resistência**. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

BASEIO J.H.B.; SERRA A.A.; BARBOZA J.C.S. “Green chemistry” epoxidação do limoneno sob sonicação com redução de solvente orgânico, empregando ácido metacloroperbenzóico (mcpba) como agente oxidante. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2005, São José dos Campos - SP. Anais. São Paulo: UNIVAP, 2005. p. 24-26.

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.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENÍTEZ, C.I.P.; SMITH, K.; VASILE, R.; RENDE, R.; EDELEN, M.O.; KELLER, M. Use of Benzodiazepines and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Middle-Aged and Older Adults With Anxiety Disorders: A Longitudinal and Prospective Study. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 5-13, 2008.

BICAS, J.L. **Estudos de obtenção de bioaromas pela biotransformação de compostos terpênicos**. 2009. 219 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011a.

CAMPÊLO, L.M.L.; SÁ, C.G.; ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H.C.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Die Pharmazie**, v. 66, n. 8, p. 1-5, 2011b.

COGO, A.J.D.; SIQUEIRA, A.F.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z.M.A.; SOLVA, A.G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COSTA, J.P. **Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos**. 2012. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Federal do Piauí, Piauí.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 367-373, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. John Wiley e Sons Ltd, 2009, 546 p.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in *Wistar* rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605-609, 2010.

FIRMINO, K. F.; DE ABREU, M.H.N.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S.M.S. Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 1223-1232, 2011.

FREEMAN, L.R.; KELLER, J.N. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 5, p. 822-829, 2012.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 311, n.1, p. 92-97, 2011.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; DE DOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES,

M.M.F.; DE SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 287-293, 2010.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J.S.; LI, R.; HONG, J.T.; LEE, M.K.; OH, K. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 2, p. 206-213, 2009.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 261-275, 2010.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382-387, 2007.

MULULO, S.C.C.; MENEZES, G.B.; VIGNE, P.; FONTENELLE, L.F. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 1, p. 92-100, 2012.

KUMAR, M.; GUPTA, A.; BANSAL, V.; SINGH, R.; KUMAR, V. Monoaminergic and Nitriergic Modulation for Antidepressant-like Activity of Naringin in Unstressed and Acute Immobilization-Induced Stressed Mice. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 7, 2012, p. 1599.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVENÚ, D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770-1778, 2011.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PIRES, J.M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

RODRIGUES, S.A. **Efeito ansiolítico do extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, Asteraceae, em modelos comportamentais**. 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), São Cristóvão, Sergipe.

SÁ, C.G.; CARDOSO, K.M.F.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 211-215, 2012.

SILVA, M.I.G.; SILVA, M.A.G.; AQUINO-NETO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 506-513, 2009.

SINGH, H.P.; KAUR, S.; NEGI, K.; KUMARI, S.; SAINI, V.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented

Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2012.

SOUTO-MAIOR, F.N.; DE CARVALHO F.L.; DE MORAIS, L.C.S.L.; NETTO S.M.; DE SOUSA D.P.; ALMEIDA R.N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 100, n. 2, p. 259-63, 2011.

VON HOLLEBEN, M.L.A, SCHUCH, C.M. Ativação do peróxido de hidrogênio para a epoxidação de olefinas não-funcionalizadas. **Química Nova**. v. 20, n. 1, p. 58-71. 1997.

CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade aguda do epóxi-limoneno em camundongos adultos

**(Artigo submetido ao Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y
Aromáticas)**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EPÓXILIMONENO EM CAMUNDONGOS ADULTOS

Antonia Amanda Cardoso de Almeida¹, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho¹, Damião Pergentino de Sousa², Geane Felix de Souza³, Rivelilson Mendes de Freitas¹

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina - Brasil.
[*rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

²Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe, CEP: 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

³Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, CEP: 60.430-140, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

A biodiversidade da flora mundial proporciona moléculas importantes no tratamento e na prevenção de várias enfermidades humanas, porém na maioria das vezes não são avaliadas sua toxicidade. O presente trabalho avaliou a toxicidade do monoterpênóide epóxilimoneno em camundongos tratados de forma aguda com doses repetidas (25, 50 e 75 mg/kg) por via oral em parâmetros bioquímicos e hematológicos. O tratamento não causou nenhuma morte ou sinal de toxicidade nos animais. Dessa forma, baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos em camundongos, pode ser sugerido que a administração do epóxilimoneno não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros analisados e que pode ser usado de forma segura em ensaios pré-clínicos. No entanto, mais estudos devem ser realizados para garantir que esse derivado de um monoterpreno natural de forma segura na indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, estudos que demonstrem sua toxicidade subcrônica e crônica precisam ser realizados.

PALAVRAS-CHAVE: Epóxilimoneno; Toxicidade aguda; Hematologia; Bioquímica.

EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF LIMONENE EPOXIDE IN ADULT MICE

ABSTRACT:

Biodiversity provides the world's flora molecules important in the treatment and prevention of various human diseases, but most often are not evaluated its toxicity. This study evaluated the toxicity of the monoterpene limonene epoxide in mice treated acutely with repeated doses (25, 50 and 75 mg/kg) oral route on biochemical and hematological parameters. The treatment caused no death or evidence of toxicity in animals. Thus, based on the results obtained from the hematological and biochemical studies in mice, it may be suggested that the administration of epóxilimoneno produces no toxic effects on most parameters analyzed and can be used safely in preclinical trials. However, more studies should be conducted to ensure that the derivative of a natural monoterpene safely in food and pharmaceutical industries. However, studies which demonstrate its subchronic and chronic toxicity should be conducted.

KEYWORDS: Limonene epoxide; Acute toxicity; Hematology; Biochemistry.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem sido associado ao fato de ser uma importante fonte para obtenção de moléculas com potencial farmacológico. A população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais por tradição. Por outro lado, nos países desenvolvidos, observa-se um maior uso de fitomedicamentos, principalmente devido ao modismo associado ao consumo desses produtos (BETTEGA et al., 2011). O conceito muitas vezes perigoso adotado pela população em geral é que o uso de plantas medicinais não representa quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas por meio da utilização na medicina popular (VEIGA JÚNIOR, 2008).

A avaliação da segurança e eficácia de plantas medicinais, bem como de seus constituintes ativos é extremamente necessária, pois as reações tóxicas e efeitos adversos dos fitomedicamentos são um problema de saúde pública. Além disso, podem ser observadas adulterações na matéria prima e interações com outras drogas ainda não investigadas sobre os constituintes químicos presentes em plantas medicinais (BETTEGA et al., 2011).

Entre os constituintes ativos presentes em plantas aromáticas podem ser destacados os monoterpenos que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais responsáveis por inúmeras atividades biológicas descritas na literatura. Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol e geraniol), monocíclicos (α -terpineol e D-limoneno) e bicíclicos (α -pineno e cânfora). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações como os hidrocarbonetos insaturados (limoneno), os álcoois (mentol), os aldeídos ou cetonas (mentona e carvona), as lactonas (nepelactona) e as tropolonas (γ -tujaplicina) (SIMÕES; SPITZER, 2004). Outros constituintes derivados de óleos essenciais podem ser obtidos por meio de reações químicas a partir destes componentes, como por exemplo: o epóxilimoneno, obtido por meio da epoxidação do (+)-limoneno (THOMAS; BESSIÈRE, 2011).

No caso dos óleos essenciais dos gêneros *Citrus* em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente principal. O limoneno, um monoterpeno monocíclico é um dos constituintes do óleo essencial de mais de 300 espécies de vegetais. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas e folhas de *Citrus limon* Burm e das folhas de *Carum carvi* Lindl. (MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007; CAMPÊLO et al., 2011). Devido ao fato de ser

facilmente disponibilizados como resíduo da indústria de sucos cítricos e obtido de fonte renovável, indústrias como farmacêutica, química e alimentícia têm demonstrado grande interesse pelos derivados oxigenados do limoneno (CASUSCELLI et al., 2004).

Dentre estes derivados oxigenados destaca-se os epóxidos, que são éteres cíclicos de três elementos formando um anel epóxido. Esses éteres possuem propriedades específicas devido à sua alta reatividade. Devido à baixa estabilidade desse anel e a facilidade de reagir com ácidos e bases, os epóxidos são largamente empregados como intermediários em sínteses orgânicas (BASEIO, 2009). Dentre esses epóxidos pode ser destacado o epóxilimoneno que é bastante utilizado na fabricação de resinas, pigmentos, tintas, adesivos, cosméticos e de solventes biodegradáveis bastante utilizados pela população em geral (ARRUDA, 2007).

No entanto, ainda não foi investigada a segurança do uso do derivado do monoterpene em ensaios pré-clínicos. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos, com intuito de avaliar sua segurança para uso como molécula bioativa em formulações farmacêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do epóxilimoneno

O epóxilimoneno é resultado da oxidação do limoneno (**Ilustração 1**) e foi preparado em laboratório, utilizando um balão de 250 mL, contendo uma solução de (R)-(+)-limoneno (1,0 g; 7,35 mmols) em CH_2Cl_2 (40 mL), e seguida foi adicionado, vagarosamente, uma solução de ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB) 70% (1,817 g; 7,35 mmols) em CH_2Cl_2 seco (40 mL), e mantido a temperatura de 0 °C (banho de gelo). O meio reacional foi mantido sob agitação por um período adicional de 4 horas na mesma temperatura. Após esse tempo, foi retirado o banho de gelo e adicionado a mistura reacional quatro porções de 50 mL de solução aquosa de NaHSO_3 10%. A fase aquosa foi extraída com duas porções de 50 mL de CH_2Cl_2 e, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de NaHCO_3 5% (2 porções de 50 mL) e secas com Na_2SO_4 anidro. Em seguida, o solvente foi concentrado em evaporador rotativo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica sendo utilizado como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (9:1). Foi obtido o epóxilimoneno com 48,30% (3,55 mmols) de rendimento (VON HOLLEBEN; SCHUCH, 1997; KAUR et al., 2010).

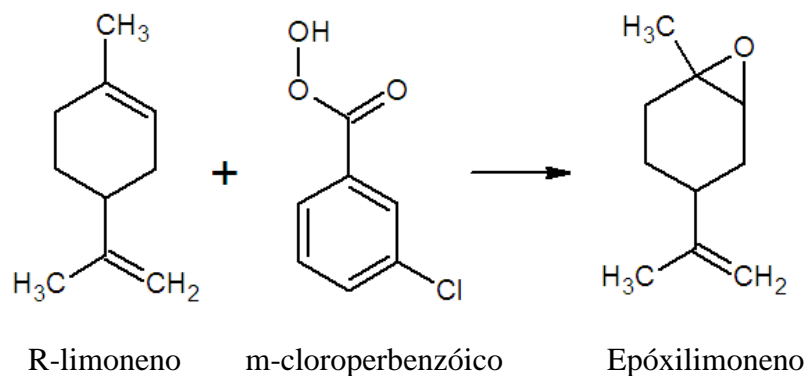


Ilustração 1. Reação de epoxidação do limoneno.

Animais

Camundongos *Swiss* machos com dois meses de idade e peso variando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí foram utilizados nos ensaios pré-clínicos. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (com ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) antes da realização dos protocolos experimentais.

Estudo da toxicidade aguda do epóxilimoneno em parâmetros bioquímicos e hematológicos

Quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados, por via oral de forma aguda com doses repetidas e observados durante 14 dias, com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg emulsionado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (grupos EL25, EL50 e EL75, respectivamente), e com veículo (Tween 80, 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, grupo controle).

Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada diariamente e os animais avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade, produção de excretas, consumo de água e ração. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h e anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg (i.p.). Em seguida, foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST),

alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®.

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

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do número de animais usados nos experimentos. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração por via oral de forma aguda com as diferentes doses de epóxilimoneno, não demonstrou nenhum sinal clínico de toxicidade, bem como não produziu nenhuma alteração no consumo de água e ração. Durante o período de observação não foram verificadas mudanças quando a produção de excretas. Da mesma forma não foi registrada nenhuma morte entre os animais tratados com esse monoterpeneo.

É importante o estudo dos níveis de glicose, uma vez que quando sua concentração está abaixo do normal, pode ser observado um quadro de hipoglicemia. Esse quadro produz vários sintomas (fraqueza, sudorese, desmaio e coma). Por sua vez, a hiperglicemia pode causar polifagia, poliúria e dificuldade de cicatrização (SOARES FILHO; KANAAN; GUZMAN-SILVA, 2010).

No presente estudo não foi verificada alterações significativas na concentração sanguínea de glicose entre os animais dos grupos tratados com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg em comparação ao grupo controle. Dessa forma, pode ser sugerido que epóxilimoneno de forma aguda pode não ser capaz de induzir quadro de hipo e/ou hiperglicemia.

O tratamento com epóxilimoneno em camundongos adultos em doses repetidas não induziu modificações no perfil bioquímico (**Tabela 1**). A maioria dos parâmetros permaneceu dentro da faixa de referência (VIJAYALAKSHMI et al., 2000). No entanto, foi verificada no nível de AST uma redução de 5, 3 e 2% ($p < 0,05$), nos grupos tratados com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg do epóxilimoneno em relação ao grupo controle, respectivamente (**Tabela 1**). Por sua vez, na concentração da ALT foi detectado um aumento semelhante de 2% apenas nas doses de 25 e 50 mg/kg em relação ao grupo controle, sugerindo que o aumento da dose não produz um aumento da toxicidade, uma vez que as alterações observadas em AST e ALT foram detectadas com as menores doses.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com epóxilimoneno.

Parâmetros	Controle (n=10)	EL 25 (n=10)	EL 50 (n=10)	EL 75 (n=10)
Glicose (mg/dL)	88,80 ± 2,53	87,90 ± 0,63	88,20 ± 0,63	89,00 ± 2,87
Uréia (mg/dL)	48,71 ± 5,16	50,56 ± 8,59 ^a	55,70 ± 1,89 ^a	57,10 ± 2,67 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,03 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,06 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	2,21 ± 0,53	2,48 ± 0,55	2,58 ± 0,24	2,58 ± 0,23
Triglicérides (mg/dL)	108,60 ± 1,41	108,80 ± 0,89	108,00 ± 0,80	108,90 ± 2,17
Colesterol Total (mg/dL)	87,50 ± 1,24	87,00 ± 0,44	87,00 ± 0,53	86,80 ± 0,35
Proteínas totais (mg/dL)	6,60 ± 0,16	6,72 ± 0,15	6,64 ± 0,17	6,66 ± 0,18
ALT (U/mL)	56,88 ± 3,47	58,29 ± 4,82 ^a	58,40 ± 0,73 ^a	57,90 ± 1,76 ^a
AST (U/mL)	93,00 ± 15,54	88,40 ± 8,94 ^a	91,20 ± 7,92 ^a	90,60 ± 7,04 ^a
Fosfatase alcalina (U/l)	156,50 ± 2,37	156,90 ± 1,58	156,10 ± 1,25	158,80 ± 2,80 ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	0,29 ± 0,05	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (controle, $n = 10$) e com epóxilimoneno (EL) nas doses 25 mg/kg (EL25, $n=10$), 50 mg/kg (EL50, $n=10$) e 75 mg/kg (EL75, $n=10$) durante 14 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^a $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste);

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não proteico usado para diagnosticar vários problemas renais (VIEIRA et al., 2008). A ureia é outro tipo de exame realizado no laboratório da análises clínicas, sendo o principal produto do metabolismo protéico (SPANNAUS et al., 2011). No entanto, a determinação de seu conteúdo não é tão específica para avaliação da função renal, uma vez que é mais sensível a alterações primárias das condições renais. Dessa

forma, é um marcador que tem forte importância em casos que envolvam esta condição (EMANUELLI et al., 2008).

Outro parâmetro bioquímico importante na toxicidade aguda é o conteúdo do ácido úrico. É encontrado na urina em pequenas quantidades. No sangue humano, a concentração de ácido úrico encontra-se entre 3,5 e 7,2 mg/dL, podendo ser encontrado em níveis mais baixos nos vegetarianos (GUIMARÃES et al., 2004). Os níveis anormais de ácido úrico no organismo podem ser associados a doenças como a gota (WALLACH, 2009).

A fosfatase alcalina é uma enzima mitocondrial que pode ser encontrada em vários tecidos, principalmente tecido ósseo, sistema hepatobiliar e mucosa gastrointestinal; em menor grau nos rins, placenta e baço. Esta enzima é recomendada para avaliar a presença de colestase em animais (VALENTE et al., 2009).

Em nosso estudo para avaliar a toxicidade aguda determinamos os níveis sanguíneos de creatinina e ácido úrico em camundongos tratados com veículo e nos animais tratados com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg por via oral. Após 14 dias da administração não foi verificada alteração sanguínea de ácido úrico entre os animais dos grupos tratados com este monoterpeno em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, quando comparados os níveis de ácido úrico dentre os grupos tratados com epóxilimoneno não foi verificada alterações, sugerindo que esse monoterpeno pode não induzir alterações da função renal, uma vez que não altera o metabolismo do ácido úrico. Outros trabalhos corroboram com o estudo, uma vez que outros monoterpenos também demonstram ausência de alterações destes parâmetros (COSTA et al., 2012; NOGUEIRA NETO et al., 2012)

Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência (DOYAMA et al., 2005), houve exceções para a ureia, creatinina, triglicerídeos, AST e ALT. A alteração significativa verificada nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina apenas nos grupos tratados com epóxilimoneno pode sugerir uma discreta alteração da função renal.

Com relação aos níveis séricos dos triglicerídeos foi detectada uma diminuição significativa nos camundongos tratados apenas com a dose de 25 mg/kg do epóxilimoneno. Diante desses efeitos pode ser sugerido um papel benéfico desse monoterpeno na redução sérica dos triglicerídeos que precisa ser melhor avaliado.

Complementando o nosso estudo foi avaliado a toxicidade após o tratamento com doses repetidas do epóxilimoneno em camundongos adultos (EL25, EL50 e EL75). Após a interpretação dos resultados pode ser sugerido que o monoterpeno avaliado não produz alterações de

importância clínica no perfil hematológico (**Tabela 2**), uma vez que em todos dos parâmetros hematológicos observados encontram-se após o tratamento dentro da faixa de referência para roedores (VASCONCELOS; MODESTO-FILHO, 2007; SOTO et al., 2008).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com epóxilimoneno.

Parâmetros	Controle (n=10)	EL 25 (n=10)	EL 50 (n=10)	EL 75 (n=10)
Eritrócitos (mm ³)	6,71 ± 1,38	6,74 ± 2,37	6,92 ± 1,52	6,78 ± 1,21
Hemoglobina (g/dL)	14,57 ± 1,71	14,99 ± 0,85	14,83 ± 1,18	14,89 ± 1,88
Hematócrito (%)	46,00 ± 5,19	49,31 ± 2,54	46,04 ± 5,19	45,87 ± 5,17
VCM (fL)	66,00 ± 2,16	66,00 ± 1,04	66,10 ± 5,72	66,78 ± 1,30
HCM (pg)	22,43 ± 2,63	22,97 ± 0,50 ^a	22,50 ± 2,94	22,37 ± 4,51
CHCM (g/dL)	33,43 ± 2,87	33,65 ± 0,55	33,50 ± 1,18	33,41 ± 1,07
Plaquetas (mm ³)	445,40 ± 7,69	442,90 ± 58,5	444,10 ± 66,00	446,20 ± 54,42
Leucócitos totais (mm ³)	6,57 ± 1,71	6,66 ± 0,73	6,77 ± 2,12	6,94 ± 1,05
Neutrófilos (%)	22,71 ± 1,79	22,73 ± 14,82	22,80 ± 5,88	22,40 ± 5,37
Linfócitos (%)	65,96 ± 3,28	67,30 ± 4,89	70,10 ± 10,23 ^a	65,60 ± 4,50

Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle, $n=10$) e com epoxi-limoneno (EL) nas doses 25 mg/kg (EL 25, $n=10$), 50 mg/kg (EL 50, $n=10$) e 75 mg/kg (EL 75, $n=10$) durante 14 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^a $p<0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t -Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste);

Os eritrócitos são essenciais para a manutenção da vida, uma vez que carregam e liberam oxigênio para os tecidos. Na formação deficiente de hemoglobina, intervêm fundamentalmente três fatores como a deficiência de ferro por redução da ingestão ou absorção anormal; a interferência na atividade normal das células macrofágicas; e as anormalidades renais que interferem na formação da eritropoietina (RODRIGUES et al., 2009).

O hematócrito pode ser referido como a porcentagem de eritrócitos no sangue. Alterações na massa do eritrócito afetam o hematócrito e a hemoglobina (SOTO et al., 2008). Estudos demonstram que alguns monoterpenos, extrato e o óleo essencial extraído de plantas medicinais como a *Piper aduncum* L., *Calendula officinalis* L., *Spigelia anthelmia* L. e *Citrus limon* B., não produzem alterações nos níveis de eritrócitos (SILVA et al., 2005; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; CAMPÊLO et al., 2011), corroborando com os resultados encontrados no estudo. No presente estudo foi observado um aumento no hematócrito dos animais tratados apenas com a dose de 25 mg/kg com epóxilimoneno, sugerindo que o uso em doses mais elevadas desse monoterpeno pode ser feito de forma segura.

O índice de Hemoglobina Corpuscular Média representa a quantidade média de hemoglobina por eritrócito, e apresenta um valor limitado no diagnóstico diferencial das anemias, uma vez que a sua mensuração pode sofrer alterações, e estar diminuída em anemias microcítica e normocítica (WALLACH, 2009).

A avaliação das plaquetas é de bastante importância uma vez que já foram descritos casos de trombocitose devido à presença de doença crônica, deficiência de ferro, hiperadrenocorticismo, neoplasias e desordens no trato digestório. Por outro lado, a produção pode estar diminuída em problemas relacionados à medula óssea (LOPES et al., 2007; SIMON, 2007).

Os leucócitos são células produzidas na medula óssea que fazem parte do sangue juntamente com os eritrócitos e as plaquetas (FRANCO et al., 2008). Os neutrófilos fazem parte da porção do sangue responsável pela defesa ou imunidade do organismo, sua concentração no sangue pode ser aumentada em infecções bacterianas e diminuída em outras doenças como a anemia falciforme (MALAFAIA; REZENDE, 2009). Dessa forma, trabalhos anteriores corroboram com o estudo, uma vez que outros monoterpenos também demonstram ausência de toxicidade pela avaliação dos parâmetros hematológicos (COSTA et al., 2011; HARIRI et al., 2011)

Os linfócitos representam um grupo heterogêneo de células tanto morfológica quanto funcionalmente sendo a base no desencadeamento e execução da resposta imune. A linfocitose pode ser causada por infecções crônicas, doenças autoimunes e terapias com drogas, por sua vez a linfopenia pode estar relacionada aos efeitos de fármacos como os esteróides (FRANCO et al., 2008; WALLACH, 2009). Em nosso estudo foi detectado um aumento no número de linfócitos em camundongos tratados com baixas doses do epóxilimoneno, corroborando com resultados relatados na literatura, nos quais alguns produtos extraídos de plantas medicinais como o terpenóide nerolidol, extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L., extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* L. e óleo essencial de *Citrus limon* B. não produzem alterações nesse parâmetro (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; SILVA et al., 2005; VASCONCELOS; CAMPÊLO et al., 2011; NOGUEIRA NETO et al., 2012).

Baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos em camundongos adultos pode ser sugerido que a administração do epóxilimoneno não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros analisados de camundongos *Swiss* adultos e pode ser usado de forma segura em outros ensaios pré-clínicos para estabelecer a toxicidade em outras espécies por um período maior de tempo e com doses repetidas do monoterpeno. No entanto, novos estudos precisam ser realizados para avaliar os efeitos desse monoterpeno após o tratamento subcrônico e

crônico para determinar a dose letal 50% (DL₅₀) e avaliar de forma mais detalhada se não há riscos quanto ao seu uso.

REFERÊNCIAS

ARRUDA T.A. **Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Mentha x villosa* Hudson, Rotundifolona e Análogos sobre Microrganismos e Plasmídios de Resistência**. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

BASEIO J.H.B.; SERRA A.A.; BARBOZA J.C.S. “Green chemistry” epoxidação do limoneno sob sonicação com redução de solvente orgânico, empregando ácido metacloroperbenzóico (AMCPB) como agente oxidante. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2005, São José dos Campos - SP. **Anais**. São Paulo: UNIVAP, 2005. p. 24-26.

BETTEGA, P.V.C.; CZLUSNIAK, G.R.; PIVA, R.; NAMBA, E.L.; RIBAS, C.R.; GRÉGIO, A.M.T.; ROSA, E.A.R. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

CASUSCELLI, S.G.; CRIVELLO, M.E.; PEREZ, C.F. Effect of reaction conditions on limonene epoxidation by supported Keggin heteropolycompounds. **Applied Catalysis A: General**, v. 274, n. 1-2, p. 115-122, 2004.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MELO, L.M.; NASCIMENTO, N.R.F.; TEXEIRA, P.G.M.; MENEZES, D.B.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L. Avaliação toxicológica do extrato acetato de etila de *Spigella anthelmia* Linn, em ratos e camundongos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 46-52, 2005.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; SOUZA, G.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 303-310, 2012.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES H.G.; NOVELLI E.L.; CEREDA E.; VILEGAS W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

EMANUELLI, M.P.; LOPES, S.T.A.; MACIEL, R.M.; GARMATZ, B.C.; TAVARES, M.O. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

FRANCO, D.G.; SEGUNDO, J.P.; NARDO, C.D.D.; SUEIRO, F.A.R.; CASTRO, K.F.; DAGNONE, A.S. Leucemia canina: aspectos laboratoriais e clínicos-revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 15-18, 2008.

GUIMARÃES, J.; DEVESA, N.; REIS, R.; PARENTE, F.; ALEXANDRINO, B.; MOURA, J.J.; MOURA, J.J. Ácido úrico e Doença cardiovascular. **Medicina Interna**, v. 11, n. 3, p. 155-160, 2004.

HARIRI A.T, MOALLEMB S.A, MAHMOUDI M, HOSSEINZADEHD H. The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. **Phytomedicine**, v.18, n. 6, p. 499-504, 2011.

CAMPELO, L.M.L. **Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**. 2011. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Piauí.

KAUR D, MANKTALA R, CHAHAL K.K, CHHABRA B.R. Epoxidation studies of terpenes with urea hydrogen peroxide and phosphotungstic acid. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 49, p. 598-602, 2010.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.P.; SANTOS, A.P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

MALAFAIA, G.; REZENDE, S.A. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*: uma breve discussão. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 4, n. 1, p. 38-44, 2009.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R, PASTORE GM. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30 n. 2, p. 382-387, 2007.

NOGUEIRA NETO, J.D.; ALMEIDA, A.A.C.; SILVA, O.A.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 2, 2012.

PONTE, F.L.R. **Toxicidade pré-clínica de fitoterápico a base de mel de abelha, própolis e extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globus* ou da associação *Zingiber officinale* E. *Allium sativum* em roedores**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia)) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia/Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

RODRIGUES, H.G.; BATISTA, M.T.A.; FONSECA, L.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a 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.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da**

planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. cap. 18.

SILVA, E.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; SOUSA, I.M.V.; DIMECH, G.S.; FRANCA, M.C.C.A.; COELHO, M.C.O.C.; WANDERLEY, A.G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SOARES FILHO, P.J.; KANAAN, S.; GUZMAN-SILVA, M.A. Evaluation of hepatic glycogen correlated with serum glucose in castrated rats under tibolone treatment. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 4, n. 5, p. 561-568, 2010.

SOTO, J.C.H.; OLIVEIRA, R.G.; MENEGUETI, V.C.; SACCO, S.R. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, p. 1-7, 2008.

SPANNAUS, K.; KOLLERITS, B.; RITZ, E.; HERSBERGER, M.; KRONENBERG, F.; ECKARDSTEIN, A.V. Serum creatinine, cystatin C, and β -trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2011.

THOMAS, A.F.; BESSIÈRE, Y. Limonene. **Natural Product Reports**, v. 6, n. 3, p. 291-309, 1989.

VALENTE, P.P.; CATTELAN, J. W.; SANTANA, A. E.; MALHEIROS, E.B.; DUARTE, C.A.; RASERA, L.; AITA, A.C. Concentrações de fibrinogênio plasmático, fosfatase alcalina sérica e do fibrinogênio e fosfatase alcalina no fluido peritoneal de quinos submetidos à enterorrafias aposicional e invaginante no cólon descendente. **Nucleus Animalium**, v. 1 n. 2, p. 95-106, 2009.

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.V.L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 14, p. 583-591, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V.F.J. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VIEIRA, R.P.; FRANÇA, R.F.; CARVALHO, C.R.F.; DOLHNIKOFF, M.; RIBEIRO, W.; MARTINS, R.A.B.L. Efeitos da suplementação oral com creatina sobre o metabolismo e a morfologia hepática em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 1, p. 38-41, 2008.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 9-15. 2000.

VON HOLLEBEN, M.L.A, SCHUCH, C.M. Ativação do peróxido de hidrogênio para a epoxidação de olefinas não-funcionalizadas. **Química Nova**. v. 20, n. 1, p. 58-71. 1997.

WALLACH, J. **Interpretação de exames laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009, 1465 p.

WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: WAYNFORTH, B.H. **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980, p. 88-93.

CAPÍTULO II: Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico do epóxi-limoneno

(Artigo publicado no periódico Brain Research)

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DO EFEITO ANSIOLÍTICO DO EPÓXILIMONENO

Antonia Amanda C. de Almeida¹, Jéssica Pereira Costa¹, Rusbene Bruno F. de Carvalho², Damião Pergentino de Sousa³, Rivelilson Mendes de Freitas¹

¹Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil.

²Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Piauí, Brasil.

³Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

RESUMO

O objetivo do estudo foi determinar os efeitos de toxicidade aguda e o efeito ansiolítico do epóxilimoneno em modelos animais de ansiedade. Depois do tratamento agudo com epóxilimoneno, em doses de 25, 50 e 75 mg/kg (i.p.), nenhuma mortalidade foi observada durante 14 dias de observação. Em geral, o consumo de alimento e água não revelou variações significativas. No teste de campo aberto, o tratamento com epóxilimoneno, em doses de 25, 50 e 75 mg/kg via intraperitoneal, produziu uma redução no número de cruzamentos, *grooming* e *rearing* ($p < 0,001$). Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil (25 mg/kg, i.p.), da mesma forma que foi observado com diazepam (2 mg/kg, i.p., controle positivo). No teste do labirinto em cruz elevado, o epóxilimoneno aumentou a permanência e o número de entradas nos braços abertos. Todos estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento flumazenil. Além disso, epóxilimoneno (75 mg/kg) também produziu uma inibição significativa da coordenação motora ($p < 0,01$), que foi revertida pelo flumazenil. Em conclusão, o presente trabalho evidenciou efeitos sedativos e ansiolíticos do epóxilimoneno, o que pode envolver uma ação em receptores do tipo benzodiazepínicos. Estes resultados indicam que as propriedades do epóxilimoneno deve ser melhor examinado para obtenção de novas ferramentas para prevenção e/ou tratamento de doenças do sistema nervoso central.

Palavras-chave: Ansiedade, Epóxilimoneno, Sedação, Toxicidade aguda,

ABSTRACT

The aim of the study is to determine the acute toxicity and anxiolytic-like effects of limonene epoxide in animal models of anxiety. After acute treatment with limonene epoxide at doses of 25, 50 and 75 mg/kg (i.p.) no mortality was noted during 14 days of observation. In general, behavior, food and water consumption showed no significant changes. In open field test, limonene epoxide at doses of 25, 50 and 75 mg/kg, after intraperitoneal administration, significantly decreased the number of crossings, grooming and rearing ($p < 0.001$). All these effects were reversed by the pre-treatment with flumazenil (25 mg/kg, i.p.), similarly to those observed with diazepam used as a positive standard. In the elevated-plus-maze test, limonene epoxide increased the time of permanence and the number of entrances in the open arms. All these effects were reversed by flumazenil, an antagonist of benzodiazepine receptors. In addition, limonene epoxide (75 mg/kg) also produced a significant inhibition of the motor coordination ($p < 0.01$), that was reversed by flumazenil. In conclusion, the present work evidenced sedative and anxiolytic-like effects of limonene epoxide, which might involve an action on benzodiazepine-type receptors. These results indicate that the properties of limonene epoxide should be more thoroughly examined in order to achieve newer tools for management and/or treatment of central nervous system diseases and anxiolytic-like effects.

Keywords: Acute toxicity, Anxiety, Limonene epoxide, Mice, Sedation.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais obtidos de plantas medicinais apresentam várias atividades biológicas, como antioxidante, antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2001.), anticonvulsivante, antidepressivo, sedativo e ansiolítico (ALMEIDA et al., 2004; BUCHBAUER et al., 1993; CAMPÊLO et al., 2011). Muitos desses efeitos relatados são atribuído a monoterpenos (DE SOUSA et al., 2006), que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais (HILALY et al 2004; DE SOUSA et al., 2007a; HAN et al., 2009).

Estudos relatam que os monoterpenos e seus derivados sintéticos têm várias propriedades farmacológicas (CROWELL, 1999; DE SOUSA et al., 2007b), e alguns podem agir sobre o sistema nervoso central (DE SOUSA et al., 2007c; SILVA et al. 2009), como α,β -epoxi-carvona, limoneno, mentol, citronelol, α -terpineol e isopulegol (GALEOTTI et al., 2002, SILVA et al., 2007).

Entre esses monoterpenos, o limoneno, que é um monoterpeno encontrado em muitas plantas medicinais (LEITE et al., 2008), com destaque o gênero *Citrus*. As propriedades relaxantes dos óleos essenciais de *Citrus* têm sido relatadas, por exemplo, o óleo essencial de *Citrus sinensis* L. mostrou atividade ansiolítica em pacientes do sexo feminino. Estudos anteriores têm demonstrado que a inalação de substâncias voláteis a partir da maioria dos óleos essenciais de plantas produzem uma possível ação depressora destes compostos no sistema nervoso central (ROLSETH et al 2002; KOMIYA et al., 2006).

Epóxilimoneno é sintetizado a partir do R-limoneno, sendo utilizado como matérias primas na síntese de vários produtos farmacêuticos, perfumes, cosméticos e aditivos alimentares (THOMAS; BESSIERE, 1989). Dadas essas considerações, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da administração aguda do epóxilimoneno no sistema nervoso central, por meio do teste campo aberto, labirinto em cruz elevada e barra giratória, a fim de avaliar a atividade ansiolítica do epóxilimoneno, com o intuito de esclarecer seu mecanismo de ação.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas e Tratamentos

O composto epóxilimoneno, foi preparado em laboratório, utilizando um balão de 250 mL, contendo uma solução de (D)-(+)-limoneno (1,0 g; 7,35 mmols) em CH_2Cl_2 (40 mL), e seguida foi

adicionado, vagorosamente, uma solução de AMBPB 70% (1,817 g; 7,35 mmols) em CH₂Cl₂ seco (40 mL), e mantido a temperatura de 0 °C (banho de gelo). O meio reacional foi mantido sob agitação por um período adicional de 4 horas na mesma temperatura. Após esse tempo, foi retirado o banho de gelo e adicionado a mistura reacional quatro porções de 50 mL de solução aquosa de NaHSO₃ 10%. A fase aquosa foi extraída com duas porções de 50 mL de CH₂Cl₂ e, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de NaHCO₃ 5% (2 porções de 50 mL) e secas com Na₂SO₄ anidro. Em seguida, o solvente foi concentrado em evaporador rotativo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel sendo utilizado como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (9:1). Foi obtido o epóxilimoneno com 48,30% (3,55 mmols) de rendimento.

Posteriormente, foi emulsionado com Tween 80 0,05% (Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, EUA) dissolvida em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via intraperitoneal nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg para os testes comportamentais, Diazepam (DZP) (Union Chemical, Brasil) foi utilizado como droga padrão. Flumazenil foi obtido da Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo, EUA) e usado como antagonista dos receptores benzodiazepínicos. O grupo controle negativo recebeu veículo com dose de 10 mL/kg, via intraperitoneal.

Animais e testes comportamentais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-30 g). Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada (26 ± 1 °C) e um ciclo de claro/escuro de 12 h, os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. Diferentes grupos de camundongos foram usados para cada teste comportamental, sendo ambientados no local da experimentação 24 horas antes da observação comportamental. Para cada um dos experimentos, os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (7 camundongos por grupo): um grupo controle tratado com o veículo, três grupos tratados com doses de epóxilimoneno a 25, 50 e 75 mg/kg, respectivamente, bem como o grupo da droga de referência foi tratada com DZP 2 mg/kg (nos testes do campo aberto, labirinto em cruz e barra giratória). Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes dos testes (TADANO et al., 2000; HILALY et al., 2004; DHIR; KULKARNI, 2007).

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento dos Estados Unidos da América de Saúde e Serviços Humanos, Washington DC, (1985). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (Nº 013/11).

Estudo de toxicidade aguda em camundongos

Camundongos Swiss (25-30 g) de ambos os sexos foram divididos em 18 grupos de 5 animais. O epóxilimoneno foi administrado via intraperitoneal (i.p.), em única dose de veículo (0,25mL) e doses de 25, 50, 75, 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg/kg do epóxilimoneno. O comportamento geral dos camundongos foi monitorizado continuamente durante 1 h, depois do tratamento, e periodicamente durante as primeiras 24 h (com especial atenção durante as primeiras 4 horas) (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949), e em seguida, depois diariamente, para um total de 14 dias. Durante esse período foram avaliadas as mudanças na atividade geral dos camundongos e seus pesos foram monitorados, sendo registrados os sinais de toxicidade ou morte. De acordo com Hamilton e colaboradores (1977), foi calculado a DL₅₀ do epóxilimoneno em camundongos tratados de forma aguda e por via intraperitoneal.

Protocolo experimental e triagem comportamental

Após o tratamento agudo com epóxilimoneno, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, os animais foram submetidos a uma série de testes, da maneira descrita a seguir. Inicialmente, cada animal foi observado numa sala fechada, com temperatura constante (26 ± 1 °C). Cada animal foi então colocado dentro do labirinto em cruz elevado e observado por 5 minutos. Imediatamente, após o teste de labirinto em cruz, foi colocado na área de campo aberto por 5 min, depois disso, o animal foi removido para barra giratória onde foi avaliado por 3 min. Finalmente, a temperatura foi verificada com um termômetro digital.

Teste de campo aberto

A arena de campo aberto foi confeccionada de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 × 30 × 15 cm), dividido em nove quadrados de áreas iguais (**Ilustração 1**) (ARCHER, 1973). O número de cruzamentos e o número de levantamentos foram medidos durante 5 min. Indicador de atividade locomotora e exploratória, respectivamente. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados cruzados (com as quatro patas) e números de *groomings* e *rearings*.

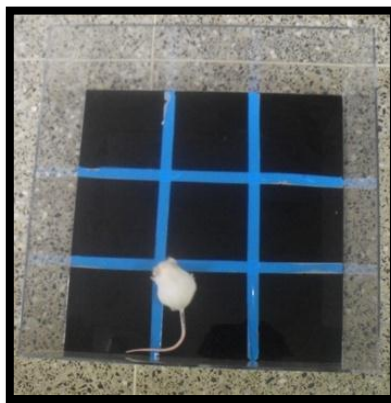


Ilustração 1. Representação do campo aberto usados nos experimentos para avaliar a atividade locomotora.

Teste do labirinto em cruz elevado

Este teste tem sido amplamente validado para medir a ansiedade em roedores (LISTER, 1987). O labirinto em cruz elevado ($30\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 6\text{ cm}$, cada braço) feito de madeira, que inclui dois braços abertos e dois braços fechados colocados 60 cm acima do nível do solo (**Ilustração 2**). Cada camundongo foi colocado na posição central, de frente para um braço aberto e o tempo gasto nos braços abertos foi registrada durante o tempo total de 5 min. O epóxilimoneno (25, 50 ou 75 mg/kg, i.p.), diazepam (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) foi administrado 30 minutos antes da realização do teste em camundongos.



Ilustração 2. Representação do labirinto em cruz elevado usados nos experimentos para avaliar o efeito ansiolítico.

Teste da barra giratória

Os camundongos foram treinados antes do experimento para adquirir capacidade de se manter por 180 s em uma haste de 25 mm de diâmetro girando a 17 rpm (**Ilustração 3**). Dois ou

três ensaios foram suficientes para que os animais aprendam esta tarefa. Os compostos foram testados isoladamente em camundongos para avaliar a capacidade de reproduzir esse desempenho na manhã seguinte. Diazepam (2 mg/kg, i.p.), epóxilimoneno (25, 50 ou 75 mg/kg, i.p.) e veículo (10 ml/kg, i.p.) foram administrados 30 minutos antes do teste em cada um dos grupos experimentais. A capacidade dos camundongos em permanecerem na barra giratória por 180 s, e o número de quedas (até três quedas) foram registrados (DUNHAM; MIYA, 1957).



Ilustração 3. Representação da barra giratória usada para avaliar a coordenação motora.

Análise estatística

Resultados foram expressos por média \pm EPM e analisados com análise de variância (ANOVA) e *t-Student-Neuman-Keuls post hoc* teste. Todas as análises foram realizadas usando o Prism 5,0 software para Windows. Os níveis variaram de significância estatística $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

RESULTADOS

Toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos

Em doses de 25, 50 e 75 mg/kg (i.p.), o tratamento agudo com epóxilimoneno não induziu toxicidade nos animais durante os 14 dias de observação. No entanto, houve um aumento dose-dependente na mortalidade de camundongos após a administração do epóxilimoneno (i.p.). O primeiro camundongo morreu no prazo de 72 horas após a injeção da dose de 2000 mg/kg e a frequência máxima de morte ocorreu em 4000 mg/kg. Dos 50 camundongos tratados com dose única de epóxilimoneno, dez animais morreram, sendo 6 machos e 4 fêmeas, respectivamente, o terpenóide induziu efeitos menores na atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia,

sedação, piloereção, tonturas, hiperventilação, perda de peso e síncope (**Tabela 1**). Para o epóxilimoneno a dose de 1000 mg/kg, foi a dose máxima tolerada (DMT: é a dose mais elevada os camundongos se recuperaram completamente de todos os efeitos da epóxilimoneno) assumido como sendo entre 500 mg e 1000 mg/kg, a dose letal mínima (DLM: a dose mais baixa que induziu a primeira mortalidade em camundongos) 2000 mg/kg e a dose única de 4000 mg/kg foi determinada como a DL_{50} (95% de limite de confiança) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Efeitos de doses únicas de epóxilimoneno administrado por via intraperitoneal em camundongos

Doses (mg/kg)	CAMUNDONGOS			EFEITOS	
	N	Sexos	Morte/Total	Latência de Mortalidade (h)	Sintomas de Toxicidade
00	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
25	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
50	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
75	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
500	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
1000	05	Macho	0/5	-	Nenhum
	05	Fêmea	0/5	-	Nenhum
2000	05	Macho	1/5	>120 e <144	Diminuição da atividade espontânea, perda de apetite, piloereção
	05	Fêmea	1/5	>72 e <120	Ptose palpebral, perda de apetite, piloereção
3000	05	Macho	1/5	>18 e < 72	Diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia e sedação
	05	Fêmea	2/5	>18 e < 48	Diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia e sedação
4000	05	Macho	2/5	>2 e < 36	Ptose palpebral, ataxia, analgesia, síncope e sedação
	05	Fêmea	3/5	>2 e < 24	Ptose palpebral, ataxia, analgesia, síncope e sedação

Efeito sedativo do epóxilimoneno em camundongos

Epóxilimoneno, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p., demonstrou efeito sedativo evidenciados pelo teste do campo aberto. Efeitos significativos foram detectados com as três doses que causaram inibição de 81, 80 e 75%, respectivamente no número de cruzamentos quando comparado ao grupo controle [$p < 0,01$]. O número de *rearing* [$p < 0,01$] e número de *grooming* [$p < 0,01$] foram reduzidos com epóxilimoneno nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.. Estes resultados foram semelhantes aos observados com diazepam (2 mg/kg, i.p.), usado como um controle positivo [$p < 0,01$] (**Tabela 2**). O flumazenil foi utilizado para avaliar o mecanismo de ação do possível efeito sedativo do epóxilimoneno. Para isso, 15 min após a injeção de flumazenil, foi administrado o epóxilimoneno (75 mg/kg, i.p.), e sob essas condições o comportamento do animal foi semelhante ao dos controle, indicando que o epóxilimoneno apresenta efeito sedativo que envolve receptores do tipo GABAérgicos [$p < 0,01$].

Tabela 2. Efeitos de epóxilimoneno em camundongos no teste de campo aberto.

Grupos	Número de quadrados cruzados	Números de <i>rearing</i>	Número de <i>grooming</i>
Veículo	91,38 ± 10,41	38,12 ± 3,59	4,75 ± 0,98
DZP	35,20 ± 6,76 ^a	18,20 ± 5,26 ^a	1,60 ± 0,89 ^a
EL25	17,10 ± 1,73 ^a	12,70 ± 0,69 ^a	2,20 ± 0,15 ^a
EL50	17,90 ± 1,12 ^a	12,65 ± 0,74 ^a	2,12 ± 0,10 ^a
EL75	22,60 ± 1,49 ^a	12,30 ± 0,40 ^a	2,00 ± 0,56 ^a
FLU 25 + DPZ 2	90,79 ± 4,20 ^b	42,09 ± 2,41 ^b	4,97 ± 0,52 ^b
FLU 25	91,77 ± 1,71	37,18 ± 3,09	4,67 ± 0,52
FLU 25 + EL75	91,38 ± 10,41 ^c	41,71 ± 3,65 ^c	4,57 ± 0,88 ^c

Os valores são a média ± E.P.M. para o número de quadrados cruzados, *rearing*s e *grooming*s de 7 camundongos (por grupo) utilizados nos protocolos experimentais. As diferenças nos grupos experimentais foram determinados por *two-tailed* Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. EL = epóxilimoneno (25, 50 ou 75 mg/kg, i.p.); Diazepam = (2 mg/kg, i.p., DZP); Flumazenil = (25 mg/kg, i.p., DZP). ^a $p < 0,01$, comparado ao grupo veículo; ^b $p < 0,01$, comparado ao grupo DZP; ^c $p < 0,01$, comparado ao grupo EL75.

Efeito ansiolítico do epóxilimoneno em camundongos

Os resultados da possível atividade ansiolítica do epóxilimoneno avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado em camundongos adultos, foram apresentados na **Tabela 3**. *One-way* ANOVA indicou uma diferença significativa entre os grupos em relação ao número entradas nos

braços abertos. Os resultados indicam que o número de entradas nos braços abertos (NEBA) foi significativamente aumentada em 54,4, 56,1 e 93,4% nos grupos tratados com epóxilimoneno 25, 50 e 75 mg/kg (i.p.) respectivamente, em comparação com o grupo controle. Além disso, o tempo de permanência no braço aberto (TPBA) também foi significativamente aumentada em 47, 48,2 e 74,4% nos mesmos grupos, respectivamente, em comparação com o controle. Estes efeitos foram semelhantes aos do diazepam [NEBA, $p < 0,01$; TPBA, $p < 0,01$]. Entretanto, o grupo tratado com flumazenil (25 mg/kg, i.p.) reverteu os efeitos do diazepam e do epóxilimoneno na dose de 75 mg/kg.

Tabela 3. Efeitos do epóxilimoneno em camundongos no labirinto em cruz elevado.

Grupos	NEBA	TPBA (segundos)
Veículo	8,71 ± 2,63	116,71 ± 3,54
DZP	15,71 ± 0,75	206,86 ± 7,15
EL25	13,45 ± 1,52 ^a	172,00 ± 25,64 ^a
EL50	13,60 ± 1,95 ^a	173,00 ± 17,89 ^a
EL75	16,40 ± 1,34 ^{a,b,c,d}	203,60 ± 4,16 ^{a,b,c,d}
FLU 25 + DPZ 2	11,7 ± 0,82 ^b	124,09 ± 4,15 ^b
FLU 25	9,14 ± 0,43	115,62 ± 1,28
FLU 25 + EL 75	8,89 ± 0,54 ^c	117,22 ± 2,69 ^c

Os valores foram representados como média ± E.P.M. do número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA). As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por *two-tailed* Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. EL = epóxilimoneno (25, 50 ou 75 mg/kg, i.p.); Diazepam = (2 mg/kg, DZP, i.p.). ^a $p < 0,01$, comparado com o grupo de veículo; ^b $p < 0,01$, em comparação com o grupo DZP; ^c $p < 0,01$, em comparação com o grupo EL25; ^d $p < 0,01$, em comparação com o grupo EL50; ^e $p < 0,01$, em comparação com o grupo EL75.

Efeitos na coordenação motora de camundongos tratados com epóxilimoneno

A Tabela 4 demonstra os efeitos do epóxilimoneno no teste da barra giratória que é realizado para avaliar a coordenação motora e a presença de qualquer efeito relaxante muscular. Houve alterações no número de quedas e no tempo de permanência na barra giratória depois da administração do epóxilimoneno com as doses de 25 e 50 mg/kg (i.p.), quando comparado com veículo (**Tabela 4**). Além disso, foi observado um aumento significativo no

número de quedas no grupo tratado com epóxilimoneno (75 mg/kg, i.p.), quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$). Esses resultados foram semelhantes aos observados com diazepam (2 mg/kg, i.p.), usado como controle positivo ($p < 0,01$) (**Tabela 4**). O flumazenil foi utilizado para avaliar o mecanismo de ação do possível efeito relaxante muscular produzido pelo epóxilimoneno, para isso, 15 min após a injeção de flumazenil, epóxilimoneno (75 mg/kg, i.p.) foi administrado, e nestas condições, o comportamento do animal foi semelhante ao dos controles, indicando que o epóxilimoneno apresenta efeito relaxante muscular mediado provavelmente pelos receptores benzodiazepínicos.

Tabela 4. Efeitos de epóxilimoneno em camundongos no teste da barra giratória.

Grupos	Nº de quedas	Tempo de permanência (segundos)
Veículo	1,16 ± 0,16	179,40 ± 0,29
DZP	2,28 ± 0,47 ^a	171,40 ± 0,84 ^a
EL25	1,21 ± 0,12	178,90 ± 1,24
EL50	1,27 ± 0,14	178,50 ± 1,83
EL75	2,25 ± 0,28 ^a	172,20 ± 2,09 ^a
FLU 25 + DPZ 2	1,35 ± 0,25 ^b	174,32 ± 0,67 ^b
FLU 25	1,25 ± 0,21	178,51 ± 0,65
FLU 25 + EL75	1,22 ± 0,18 ^c	178,42 ± 0,41 ^c

Os valores foram expressos como a média ± E.P.M. do número de quedas e tempo de permanência na barra giratória. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. EL= limoneno epóxido (25, 50 ou 75 mg/kg, i.p.); Diazepam = (DZP; 2 mg/kg, i.p.). ^a $p < 0,01$, comparado com o grupo veículo, ^b $p < 0,01$, quando comparado ao grupo DZP, ^c $p < 0,01$, quando comparado ao grupo EL75.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o epóxilimoneno foi considerado não tóxico em camundongos, quando administrado na dose única de até 1.000 mg/kg, via intraperitoneal. Mortalidade e outros efeitos adversos ocorreram em camundongos que receberam doses relativamente mais elevadas de epóxilimoneno ($DL_{50} = 4000$ mg/kg, i.p.). Com base na classificação de Loomis e Hayes (1996), que as substâncias com DL_{50} compreendido entre 500 e 5.000, e entre 5.000 e 15.000 mg/kg são

considerados ligeiramente tóxico e praticamente não tóxicos, respectivamente. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que a toxicidade do epóxilimoneno pode estar compreendida na faixa de segurança de substâncias ligeiramente tóxicas.

Os efeitos de epóxilimoneno foram examinados no labirinto em cruz elevado, teste da barra giratória e teste do campo aberto, que são modelos clássicos para triagem da atividade no sistema nervoso central e que fornece informações sobre a ansiedade, atividade sedativa e ação relaxante muscular, respectivamente (MASUR et al., 1971; MELO et al., 2005; HAN et al., 2009). O epóxilimoneno foi inicialmente avaliado no teste de campo aberto que demonstra o estado emocional do animal. Os resultados mostraram que o epóxilimoneno foi capaz de diminuir significativamente o número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*, indicativo de um possível efeito sedativo. A redução do número de cruzamentos e *rearing* no teste de campo aberto confirma a atividade central deste terpenóide, uma vez que se admite que o número de *groomings* pode ser indicativo da função do nível da excitabilidade do sistema nervoso central (MORA et al., 2005). O flumazenil reverteu o efeito do epóxilimoneno e do diazepam, sugerindo que os compostos podem apresentar um mecanismo de ação semelhante.

O epóxilimoneno (EL) também mostrou efeito ansiolítico quando avaliado no labirinto em cruz elevado, teste que acompanha os sintomas da ansiedade, caracterizado em seres humanos por um estado de alerta e tensão (JACKSON; TURKINGTON, 2005). Outras espécies exibem uma variedade de reações defensivas em resposta a predadores (RODGERS et al., 1995). Roedores demonstram ansiedade, medo e curiosidade quando colocado em um novo ambiente, e uma avaliação global do comportamento pode ser determinado através da observação de congelamento, *rearing e grooming* (medo), *head dippings* (curiosidade) e do número de bolos fecais (NIC et al., 2003; COSTA-CAMPOS et al., 2004). O labirinto em cruz elevado tem sido frequentemente usado para detectar e avaliar as propriedades ansiolíticas e/ou ansiogênicas de drogas (PELLOW; FILE, 1987; TAKEDA et al., 1998). A frequência e o tempo gasto nos braços abertos é o índice da ansiedade no modelo de labirinto em cruz elevado, considerando que uma área aberta é extremamente aversivo para roedores (PELLOW; FILE, 1986).

A fim de estudar a possível ação ansiolítica do epóxilimoneno, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado, e os resultados mostraram que o EL foi capaz de reduzir significativamente a permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, indicando uma resposta positiva. Os resultados apontam o efeito sedativo que, assim como a ação ansiolítica de epóxilimoneno pode eventualmente envolver receptores do complexo GABA_A. A eficácia

ansiolítica da droga em estudo pode ser demonstrada por um aumento de potência estatisticamente significativa na atividade de roedores nos braços abertos (GRIEBEL et al., 2001, MORA et al., 2005). Um efeito ansiolítico é sugerido quando a droga aumenta entradas nos braços abertos, sem alterar o número total de entradas nos braços. Os camundongos tratados com epóxilimoneno apresentaram aumento de potência significativa na porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, semelhante aos efeitos observados no grupo tratado com diazepam droga referência (WOODE et al., 2009). Estes resultados poderiam indicar uma atividade ansiolítica do epóxilimoneno possivelmente envolvendo os receptores do complexo GABA_A. O flumazenil, um antagonista GABAérgico, reverteu o efeito do epóxilimoneno no tempo permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, o que sugere que este composto e/ou metabólito ativo produzido por sua biotransformação pode apresentar um mecanismo de ação no sistema GABAérgico.

A presença de um efeito ansiolítico nos camundongos tratados com epóxilimoneno e a ausência desse efeito naqueles tratados com limoneno (VALE et al., 2002) sugerem que o efeito ansiolítico observado no presente trabalho pode ser eventualmente relacionado ao metabólito deste componente. Além disso, os nossos resultados indicaram que o epóxilimoneno é, provavelmente, responsável pela maior parte dos efeitos centrais do limoneno. A participação de outros metabolitos nestas e em outras ações, como o ansiolítico, não deve, entretanto, ser descartada.

O epóxilimoneno de forma dose-dependente aumentou a porcentagem do número de entradas nos braços abertos e o tempo que permanência sobre os mesmos. Estes resultados sugerem que, quando administrado por via intraperitoneal, este terpenóide tem um efeito ansiolítico. Tem sido relatado que a neurotransmissão GABAérgica desempenha um papel importante na ansiedade (ZWANZGER; RUPPRECHT, 2005). De fato, drogas benzodiazepínicas são usadas terapeuticamente para o tratamento desses distúrbios (ZWANZGER; RUPPRECHT, 2005), nossos resultados indicam que o epóxilimoneno pode atuar no receptor GABA_A cerebral de camundongos.

No presente estudo, o efeito de relaxamento muscular de epóxilimoneno foi visto depois do tratamento agudo. No entanto, este efeito foi encontrado apenas com a dose mais elevada, não sendo observados com as doses mais baixas. O primeiro conjunto de dados está de acordo com os resultados relatados por Dantas e colaboradores (2004) que o comprometimento observado durante a habituação no teste do campo aberto. Esta é uma questão importante porque as benzodiazepinas, a principal classe medicamento usado para tratar transtorno de ansiedade generalizada, causa

prejuízo significativo na memória e efeito de relaxamento muscular em doses dentro do intervalo de dose que promovem efeito ansiolítico (ANDREATINI et al., 2001). Esta ausência de relaxamento muscular em doses com efeitos ansiolíticos pode indicar que é possível separar os últimos efeitos das propriedades sedativas, embora estudos são necessários para confirmar esta suposição. Além disso, o relaxamento muscular medido pelo teste da barra giratória, foi observado com a dose máxima de limoneno (200 mg/kg de peso do corpo), que mostrou uma diminuição de 76% no tempo de permanência na barra giratória (VALE et al., 2002).

Em conclusão, o presente estudo fornece informações valiosas sobre os perfis de toxicidade aguda do uso intraperitoneal de epóxilimoneno. Essa informação vai auxiliar em futuros estudos pré-clínicos sobre a segurança das plantas medicinais e em estudos experimentais *in vivo* da administração oral de potencialidades farmacológicas deste terpenóide. O epóxilimoneno, quando administrado por via intraperitoneal, apresenta um perfil de toxicidade dependente da dose. A toxicidade aguda foi alcançada com doses elevadas em camundongos. Em doses mais baixas de até 1.0 g/kg, o epóxilimoneno se apresentou não tóxico em camundongos. Assim, nas doses testadas, pode ser considerada com uma larga margem de segurança para ensaios pré-clínicos. Porém, essa toxicidade nem sempre podem ser extrapoladas para seres humanos a partir de estudos inteiramente em animais, a avaliação clínica deve ser realizado para definir com precisão a dosagem segura em humanos.

Nossos resultados evidenciam que o epóxilimoneno possui propriedades sedativa e ansiolítica em camundongos. Entretanto, são necessários mais estudos para confirmar e ampliar estes resultados, bem como os estudos de toxicidade crônica são necessários para avaliar o real perfil toxicológico deste terpenóide.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 361-364, 2004.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n.1, p. 205-235, 1973.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; JAGER, W.; PLANK, C.; DIETRICH, H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 6, p. 660-664, 1993.

CAMPÊLO, L.M.L.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 623-627, 2011.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S.C.; RIGO, A.P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 3, p. 481-489, 2004.

CROWELL, P.M. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, 775S-778S, 1999.

DANTAS, M.C.; DE OLIVEIRA, F.S.; BANDEIRA, S.M.; BATISTA, J.S.; SILVA JR., C.D.; ALVES, P.B.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORO, M. 2004. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n.1, p. 129-133, 2004.

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

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; JUNIOR, E.M.V.; OLIVEIRA, F.S.; ALMEIDA, R.N.; NUNES, X.P.; BARBOSA-FILHO, J.M. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. (1.2), p. 39-42, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α - β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 170-175, 2007b.

DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007c.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, n. 3, p. 145-148, 2002.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SIMIAND, J.; COHEN, C.; GRANGER, P.; DECOBERT, M.; FRANÇON, D.; AVENET, P.; DEPOORTERE, H.S.; TAN, A.; OBLIN, H.; SCHOEMAKER, Y.; EVANNO, M.; SEVRIN, GEORGE, P.; SCATTON, S. SL651498: an anxioselective compound with functional selectivity for 2- and 3-containing-aminobutyric acid_A (GABA_A) receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 2, p. 753-768. 2001.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HAN, H., MA, Y.; EUN, J.S.; LI, R.H.; HONG, J.T.; LEE, M.K.; OH, K.W. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi* Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 2, p. 206-213, 2009.

HILALY, E.J.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSEI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga Iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n.1, p. 43-50, 2004.

JACKSON, M.J.; TURKINGTON, D. Depression and anxiety in epilepsy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 76, p. i45-i47, 2005.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 240-249, 2006.

KOMORI, T.; FUJIWARA, R.; TANIDA, M.; NOMURA, J. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 477-480, 1995.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1248-1254, 2007.

LEITE, M.P.; FASSIN-JÚNIOR, J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 661-666. 2008.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LITCHFIELD, J.T.J.R.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, n. 3, p. 99-113, 1949.

LOOMIS, T.A.; HAYES, A.W. **Loomis's Essentials of Toxicology**. Academic Press, Inc. ed. San Diego, California, 4th ed., 1996. p. 276-282.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) α 9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 338-397, 1971.

MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; DE ARAÚJO, F.L.; LIMA, V.T.; BARBOSA-FILHO, J.M. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2005.

MORA, S.; DÍAZ-VÉLIZ, G.; MILLÁN, R.; LUNGENSTRASS, H.; QUIRÓS, S.; COTO-MORALES, T.; HELLIÓN-IBARROLA, M.C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 2, p. 373-378, 2005.

NIC, D.B.A.; BOURIN, M.; HASCOET, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 140, n. 2, p. 203-214, 2003.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Lack of cross-tolerance in mice between the stimulatory and depressant actions of novel anxiolytics in the holeboard. **Behavioural Brain Research**, n. 23, n. 2, p. 159-166, 1987.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative “anxiogenic” agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 805-813, 1995.

ROLSETH, V.; DJURHUUS, R.; SVARDAL, A.M. Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells. **Toxicology**, v. 170, n. 2, p. 75-88, 2002.

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

SILVA, M.I.; SILVA, M.A.G.; DE AQUINO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 506-513. 2009.

TADANO, T.; NAKAGAWASAI, O.; NIJIMA, F.; TAN-NO, K.; KISARA, K. The effects of traditional tonics on fatigue in mice differ from those of the antidepressant imipramine: a pharmacological and behavioral study. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2000.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, n. 1, p. 21-29, 1998.

THOMAS, A.F.; BESSIÈRE, Y. Limonene. **Natural Product Reports**. n. 6, p. 291-309, 1989.

VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS JR, J.G.; VIANA G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709–714, 2002.

ZWANZGER, P.; RUPPRECHT, R. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 30, n. 3, p. 167-175, 2005

WOODE, E.; POKU, R.A.; AINOOSON, G.K.; BOAKYE-GAISI, E.; ABOTSI, W.K.M.; MENSAH, T.L.; AMOH-BARIMAH, A.K. An evaluation of the anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive effects of *Ficus exasperata* (Vahl) leaf extracts. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 138-151, 2009.

**CAPÍTULO III: Efeito ansiolítico e potencial antioxidante de um derivado semissintético do
limoneno**

Efeito ansiolítico e potencial antioxidante de um derivado semissintético do limoneno

Antonia Amanda C. de Almeida¹, Rusbene Bruno F. de Carvalho², Oskar Almeida Silva¹, Damião Pergentino de Sousa³, Rivelilson Mendes de Freitas¹

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil.

²Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Piauí, Brasil.

³Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade ansiolítica do epóxilimoneno (EL) por meio do teste de esconder as esferas (TEE), o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* no hipocampo de camundongos adultos submetidos ao protocolo experimental de ansiedade. Para os estudos comportamentais e para as análises antioxidantes *in vivo* os camundongos foram tratados por via oral com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo), ácido ascórbico 250 mg/kg, diazepam (2 mg/kg) e com EL (25, 50 e 75 mg/kg). Os resultados sugerem um efeito ansiolítico do epóxilimoneno, sendo observado uma redução no número de esferas escondidas nos grupos tratados com EL nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg em relação ao diazepam e ao veículo. Essa redução foi observada no tratamento com dose única e repetidas, reforçando a hipótese do efeito ansiolítico deste terpenóide. Já para os testes antioxidantes *in vitro* foram testadas as concentrações de 0,9 a 7,2 µg/mL. Os resultados dos testes antioxidantes *in vitro* demonstraram uma concentração efetiva inibitória 50% de 0,7342, 1,296 e 1,169 µg/mL contra a formação do íon nitrito, radical hidroxila e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, respectivamente. O tratamento com EL reduziu o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante *in vivo* uma vez que foi capaz de reduzir formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Além disso, o EL aumentou a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, no hipocampo de camundongos, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido à modulação positiva dessas enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: Ansiedade, Antioxidante, Epóxilimoneno, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The present study evaluated the anxiolytic activity of the limonene oxide (LO) through the test to hide the ball (TEE) and investigated its antioxidant potential *in vitro* and *in vivo* in the hippocampus of adult mice. The results suggest that the anxiolytic effect of epoxy-limonene, being observed a reduction in the number of hidden levels in groups treated with LO doses of 25, 50 and 75 mg/kg (or) and diazepam in relation to the vehicle, the reduction was observed in the treatment with a single dose and repeated, reinforcing the hypothesis of the anxiolytic effect of this terpenoid. The test results demonstrate an *in vivo* antioxidant effective 50% inhibitory concentration of 0.7342, 1.296 and 1.169 mg/mL against the formation of nitrite ion, hydroxyl radical and reactive substances to thiobarbituric acid. For the analyzes antioxidants *in vivo* mice were treated with 0.05% Tween 80 in saline dissolved 0.9% (or), ascorbic acid 250 mg/kg (or) and EL with doses of 25, 50, 75 mg/kg (or). EL treatment reduced the level of lipid peroxidation and nitrite content, suggesting an antioxidant role *in vivo* since it was able to reduce the formation of reactive species derived from oxygen and nitrogen. Furthermore, the LO increased activity of the enzymes catalase and superoxide dismutase in the hippocampus of mice, suggesting that its antioxidant role may be due to upregulation of these enzymes.

KEYWORDS: Anxiety, Antioxidants, Epoxy-limonene, Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais chamados de oxidantes, que são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e, se não controlados, podem provocar danos extensivos. Nesta perspectiva, os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (PEKER et al., 2009; CHO et al., 2011; SLYVKA et al., 2011). Substâncias com esta característica podem proteger as células contra os efeitos danosos causados por espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs), como oxigênio singlete, superóxido e radicais peroxila, hidroxila e espécies reativas de derivados de nitrogênio, os chamados radicais livres. O desequilíbrio entre a formação e a remoção destas substâncias no organismo pode ser decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos devido à menor formação, ao maior consumo, ou do aumento da geração de radicais livres, gerando um estado pró-oxidante denominado estresse oxidativo (HAIDA, 2011).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) que causa danos moleculares às estruturas celulares, que tem sido relacionado à instalação e progressão de diversas doenças degenerativas, por meio de mutações do DNA, oxidação protéica e peroxidação lipídica com consequentes alterações funcionais e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (VALKO et al., 2008; VERMA et al., 2010). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo pode variar consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e dieta (BOLIGON, 2010), estando associado ainda ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas, como o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas, Alzheimer e Parkinson, bem como pode estar envolvido no processo de envelhecimento (KO et al., 2010), transtornos mentais (DEAN et al., 2009; SALUSTRI et al., 2010), artrites, inflamações crônicas, diminuição do sistema imune (PANDE; AKOH, 2009), cirrose, aterosclerose e fibrose (ROESLER, 2007).

O estresse oxidativo pode ser considerado uma ameaça constante para o organismo, uma vez que uma série de defesas antioxidantes e sistemas de reparo em células evoluíram com a função de proteção contra a destruição e danos causados pelos radicais livres. Dessa forma, podem ser citadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), juntamente com catalase e glutiona

peroxidase que promovem a desintoxicação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

Alguns estudos têm demonstrado o papel do estresse oxidativo na ansiedade em roedores (DE OLIVEIRA et al., 2007; MASOOD et al., 2008; SALIM et al., 2011). Masood e colaboradores (2008) relataram que a indução de estresse oxidativo no hipotálamo ocorre em paralelo com a ansiedade em camundongos. O consumo de dietas com altas doses de sacarose foi relatado para aumentar a oxidação das proteínas no córtex frontal e induzir ansiedade em ratos (SOUZA et al., 2007). Ansiedade aumentada foi positivamente correlacionada com o aumento de EROs (BOUAYED et al., 2007). Em outro estudo, estresse oxidativo no hipocampo de ratos adultos foi relatado para ser ansiogênico (DE OLIVEIRA et al., 2007). Curiosamente, a indução de estresse oxidativo por meio de um método não farmacológico, também leva à ansiedade como o comportamento em ratos (VOLLERT et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade ansiolítica do epóxilimoneno por meio do teste de esconder as esferas (TEE) e investigar seu potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* no hipocampo de camundongos adultos submetidos ao TEE. Além de verificar a existência de correlação entre o potencial antioxidante *in vitro* e o efeito antioxidante *in vivo*, assim como correlacionar a ansiedade e os principais marcadores oxidativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do Epóxilimoneno

Em um balão de 250 mL, contendo uma solução de (R)-(+)-limoneno (1,0 g; 7,35 mmols) em CH₂Cl₂ (40 mL), foi adicionado, vagarosamente, uma solução de AMCPB 70% (1,817 g; 7,35 mmols) em CH₂Cl₂ seco (40 mL), e mantido a temperatura de 0 °C (banho de gelo). O meio reacional foi mantido sob agitação por um período adicional de 4 horas na mesma temperatura. Após esse tempo, foi retirado o banho de gelo e adicionado a mistura reacional quatro porções de 50 mL de solução aquosa de NaHSO₃ 10%. A fase aquosa foi extraída com duas porções de 50 mL de CH₂Cl₂ e, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de NaHCO₃ 5% (2 porções de 50 mL) e secas com Na₂SO₄ anidro. Em seguida, o solvente foi concentrado em evaporador rotativo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel sendo utilizado como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (9:1). Foi obtido o epóxilimoneno com 48,30% (3,55 mmols) de rendimento.

O epóxilimoneno (**Ilustração 1**) é um éter cíclico de três elementos formando um anel epóxido. Possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, volume molar de $156,5 \pm 3,0 \text{ cm}^3$, índice de refração de $1,490 \pm 0,02$, tensão superficial de $31,0 \pm 3,0 \text{ dyn/cm}$ e densidade de $0,972 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$.

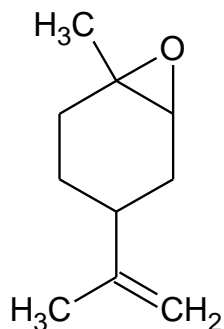


Ilustração 1. Estrutura molecular do epóxilimoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano).

Avaliação do potencial do epóxilimoneno *in vitro* contra a produção do íon nitrito (NO₂⁻)

O óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (FERREIRA et al., 2008). A mistura reacional (1 mL) contendo nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 10 mM e o composto avaliado em concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL foram incubados a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles negativos (apenas 10 mM de nitroprussiato de sódio e veículo) e das preparações para ensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho.

Avaliação do potencial do epóxilimoneno *in vitro* contra a produção do radical hidroxila (OH[•])

A produção do radical hidroxila (OH[•]) foi quantificada por meio da reação de Fenton. Durante esta reação foi determinado o efeito *in vitro* do epóxilimoneno contra a produção do OH[•], produzido pela degradação oxidativa da 2-desoxirribose (LOPES et al., 1999). O princípio do ensaio é a quantificação do produto de degradação da 2-desoxirribose, o malondialdeído (MDA),

por meio da sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciados pela adição de Fe^{2+} (FeSO_4) com concentração final 6 mM para soluções contendo 2-desoxirribose 5 mM, H_2O_2 100 mM e tampão fosfato 20 mM (pH 7,2). Para determinar a atividade antioxidante *in vitro* do EL contra a formação do radical hidroxila, nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do epóxilimoneno foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe^{2+} . As reações foram realizadas durante 15 min em temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v), seguido da adição de TBA 1% (v/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas em banho maria durante 15 min a 95 °C, e depois resfriado à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formada por Fe^{2+} e H_2O_2 .

Avaliação do potencial do epóxilimoneno *in vitro* contra a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação do conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Este método foi usado para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do composto epóxilimoneno usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídio (GUIMARÃES et al., 2010). Brevemente, a gema de ovo foi homogeneizada (1%, w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Deste homogenato 1 mL foi sonificado e homogeneizado com 0,1 mL de epóxilimoneno (EL) em concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do epóxilimoneno. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis 2-amidinopropano; 0,12 M).

O controle foi realizado apenas com veículo (Tween 80 0,05 % dissolvido em solução salina 0,9%) usado para emulsionar a substância avaliada. As reações foram realizadas durante 30 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, foram medidas as absorbâncias a 532 nm dos tubos contendo diferentes concentrações da amostra utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas por AAPH sozinho (controle induzido).

Protocolos Experimentais

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração padrão tipo Purina *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura, (25 ± 2 °C). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais Universidade Federal do Piauí (#013/2011).

Tratamento dos grupos experimentais

O epóxilimoneno foi emulsificado com Tween 80 0,05% e dissolvido em solução salina 0,9%. Os 36 animais foram divididos em 6 grupos experimentais. O primeiro grupo foi tratado com 0,1 mL/10g do veículo (Tween 80 0,05% com salina 0,9%, v.o., grupo controle; n=8). O segundo e terceiro grupos receberam ácido ascórbico, v.o. (grupo AA; n=8) e diazepam, v.o (grupo DZP 2 mg/kg; n=8) respectivamente. Os outros três grupos foram tratados com epóxilimoneno (25, 50 e 75 mg/kg, v.o.; grupos EL25, EL50 e EL75, respectivamente; n=8). Todos os grupos foram observados durante 14 dias. Após os estudos comportamentais e farmacológicos, os animais foram submetidos à eutanásia para remoção do cérebro e dissecação do hipocampo para preparar homogenatos a 10% para realização dos estudos neuroquímicos (determinação dos níveis de peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase).

Avaliação da ação ansiolítica: Teste de esconder esferas (*marble-burying test*)

Este procedimento foi bem descrito em ratos por Poling e colaboradores (1981), mas também tem seus resultados bem reproduzidos em camundongos (BADGUJAR; SURANA, 2010), visto que os roedores exibem o comportamento de esconder esferas na presença de estímulos aversivos como uma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados.

Os animais prétratados por via oral com o EL e DZP conforme o protocolo experimental, foram avaliados após 30 min da primeira dose administrada e após 30 min da última dose administrada após 14 dias de tratamento consecutivos, foram introduzidos individualmente na caixa de acrílico transparente (**Ilustração 2**), contendo 25 esferas de vidros distribuídas sobre a serragem. Após o período de 30 min, cada um dos animais foi retirado da caixa.

Posteriormente, foi registrada a quantidade de esferas de vidro escondidas com a serragem (LAPA et al., 2008). Após o teste de cada animal, foi realizada a troca da serragem e as esferas de vidro foram limpas com solução etanol 10 % e seco com papel toalha. Estudos tem demonstrado o papel do estresse oxidativo na ansiedade em roedores (DE OLIVEIRA et al, 2007; MASOOD et al, 2008; SALIM et al, 2011). Nessa perspectiva grupos EL, veículo e controle foram avaliados por meio do teste de esconder as esferas e em seguida aos protocolos comportamentais os animais foram eutanasiados para remoção do encéfalo e dissecação dos hipocampus para avaliação do estresse oxidativo.

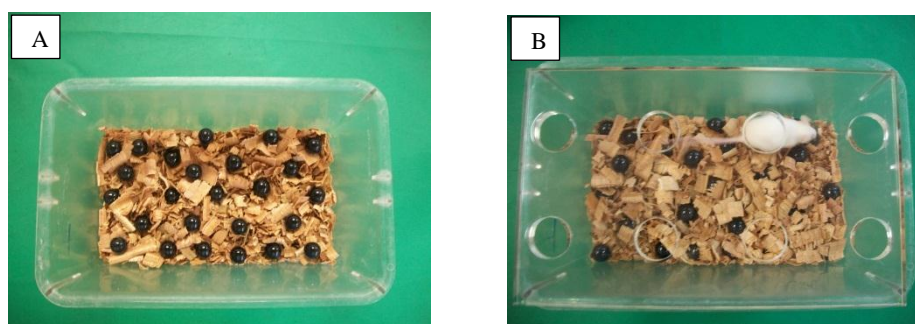


Ilustração 2. Teste de esconder esferas (*marble-burying test*), demonstrando (A) a caixa de acrílico com a distribuição das 25 esferas de vidro e (B) o camundongo *Swiss* escondendo as esferas com a serragem durante o teste.

Método para determinação do conteúdo de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica foi mensurado por meio da determinação dos níveis de TBARS, método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). Dessa forma, foi preparado o homogenato a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 com as áreas hipocampais de todos os grupos, veículo (n=8), AA (n=8) e EL 25, 50 e 75 (n=8) ao qual foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético a 10% de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% e em seguida a mistura foi agitada. Posteriormente, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente por 15 min, a seguir resfriada em água corrente. Após o resfriamento foi adicionada 2 mL de n-butanol, e em seguida agitada por 1 min. Após a agitação a mistura foi centrifugada a 1200 rpm por 5 min.

A fase butanólica de coloração rosa foi tomada para leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído/g de tecido.

Método da determinação do conteúdo de nitrito

O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, controle (n=8), AA (n=8) e EL 25, 50 e 75 (n=8). Em um tubo branco foi adicionado 500 µL do reagente, mais 500 µL de água destilada, em outro tubo teste foi adicionado 500 µL do reagente mais 500 µL do homogenato de tecido a 10% . Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram determinados com base na reação de Griess (GREEN et al., 1981) e expressos em nM.

Método da determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi medida nos grupos experimentais, controle (n=8), AA (n=8) e EL 25, 50 e 75 (n=8). Foi preparado o meio reacional com H₂O₂ (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 nM pH 8,0 (1,0 mL) e H₂O (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 µL do meio reacional mais 20 µL do homogenato a 10% preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4.

Por fim, foi realizada à leitura em espectrofotômetro durante 6 min em 230 nm. Como o branco foi feito pela leitura na absorbância relativa a 230 nm com apenas 1 mL do meio reacional (CHANCE; MAEHLY, 1955). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína (CHANCE; MAEHLY, 1955).

Método da determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os homogenatos hipocâmpais (10%) foram centrifugados (800 g, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para ensaio de atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase. Atividade da SOD nos grupos controle (n=8), AA (n=8) e EL 25, 50 e 75 (n=8) foi testada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina-xantina oxidase como fonte geradora de ânion superóxido (O₂⁻) (ARTHUR; BOYNE, 1985). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da atividade da SOD corresponde à inibição de 50% da reação do O₂⁻ com o citocromo C. A determinação da concentração de proteínas foi usado o método de Lowry e colaboradores (1951).

Análises estatísticas

Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste *t*-

Student-Neuman-Keuls como *post hoc test*. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo e controles positivo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Além disso, o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação entre os resultados dos testes antioxidante *in vitro* e *in vivo*, bem como para avaliar a correlação entre o parâmetro comportamental no teste de esconder as esferas e os marcadores de estresse oxidativo.

RESULTADOS

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Avaliação do potencial do epóxilimoneno in vitro contra a produção do íon nitrito (NO_2^-)

A avaliação do epóxilimoneno como substância sequestradora de NO foi testada por sua capacidade de remoção do íon nitrito pelo método de Griess. Os resultados apresentados na Ilustração 3 demonstram que o EL, nas concentrações testadas de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de remover o conteúdo de nitrito formado de maneira significativa com 54,83; 60,74; 62,35; 62,91 e 64,95% de inibição, em relação ao grupo NPS, respectivamente. O trolox produziu uma diminuição significativa de 59,76% (**Ilustração 3**).

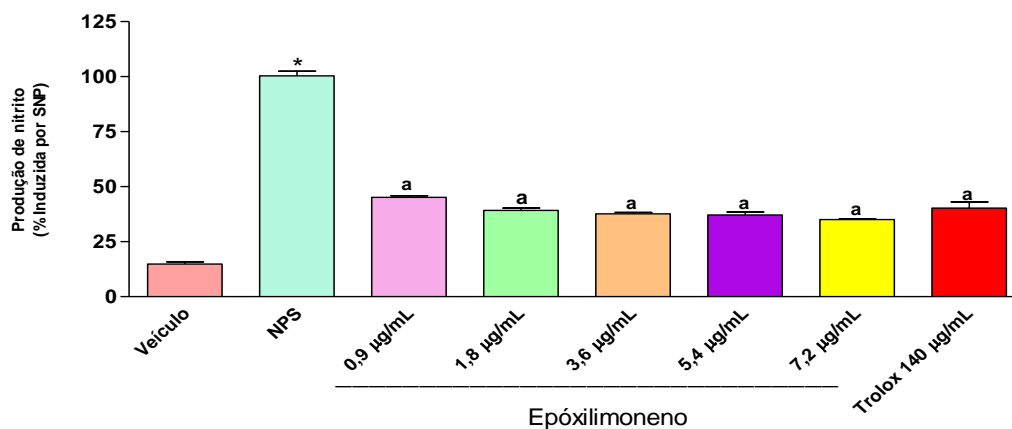


Ilustração 3. Potencial antioxidante do epóxilimoneno contra a formação do íon nitrito.

Valores representam média \pm E.P.M, n=8, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ versus NPS; * $p < 0,001$ versus veículo (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Também foi possível determinar a concentração efetiva inibitória 50% (CE₅₀) do epóxilimoneno de 0,7342 µg/mL ($r^2=0,8456$) contra a formação do íon nitrito com margem de variação na concentração efetiva de 0,3223 a 1,673 µg/mL com 95% de intervalo de confiança. Por sua vez, o trolox (140 µg/mL), apresentou uma CE₅₀ de 5,802 µg/mL ($r^2=0,8200$) contra a formação do íon nitrito com 95% de intervalo de confiança (2,807 a 11,99 µg/mL).

Avaliação do potencial do epóxilimoneno in vitro contra a produção do radical hidroxila (OH[•])

A **Ilustração 4** demonstra o potencial antioxidante do epóxilimoneno contra a formação de radicais hidroxila (OH[•]). Nas concentrações testadas, o epóxilimoneno foi capaz de remover o radical OH[•] de maneira significativa em 25,13, 27,14, 28,38, 31,99 e 36,38%, quando comparado ao sistema reacional nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL de epóxilimoneno, respectivamente. Da mesma forma, o Trolox usado como controle positivo na concentração de 140 µg/mL inibiu a produção do radical hidroxila em 78,01% ($p<0,05$), quando comparado ao meio reacional (**Ilustração 4**).

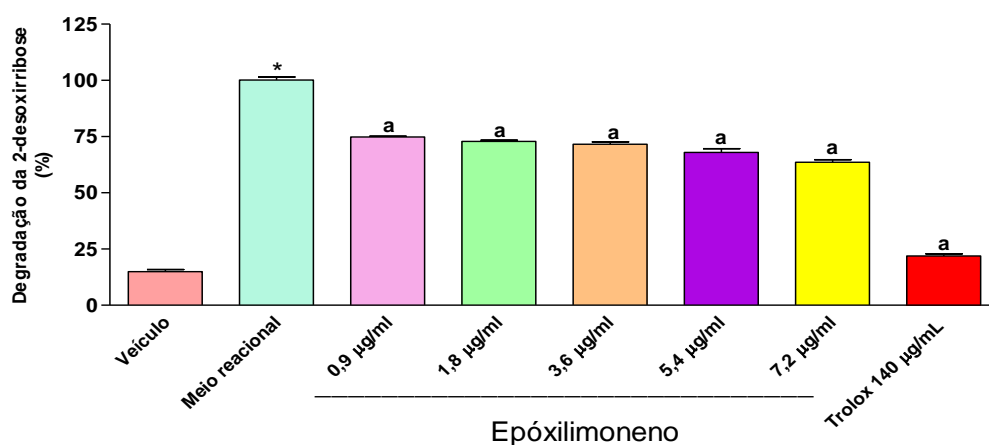


Ilustração 4. Potencial antioxidante do epóxilimoneno contra a formação do radical hidroxila.

Valores representam a média ± E.P.M., n = 5, experimentos em duplicata. ^a $p<0,001$ versus sistema reacional, * $p<0,001$ versus veículo (ANOVA seguido do *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

Após os testes antioxidantes *in vitro* foi possível estabelecer uma CE₅₀ de 1,296 µg/mL ($r^2=0,8334$) contra a formação do radical hidroxila com uma margem de variação de 0,6283 a 2,672 µg/mL (intervalo de confiança de 95%). Por sua vez, o trolox apresentou uma CE₅₀ de 5,288

$\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,8742$) contra a formação do radical hidroxila com 95% de intervalo de confiança de 2,988 a 9,356 $\mu\text{g/mL}$.

Avaliação do potencial da epóxilimoneno in vitro contra a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi analisada pelo método de quantificação do TBARS, que é um ensaio utilizado extensivamente para estimar a peroxidação dos lipídeos nas membranas e sistemas biológicos. Os resultados obtidos mostram que, em todas as concentrações testadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$) de epóxilimoneno causou uma diminuição significativa na produção de TBARS em relação ao grupo AAPH, com inibição de 60,41; 61,65; 62,17; 63,3; 64,33%, respectivamente. O Trolox (droga padrão) também reduziu o parâmetro observado, apresentando 44,64% de inibição (**Ilustração 5**)

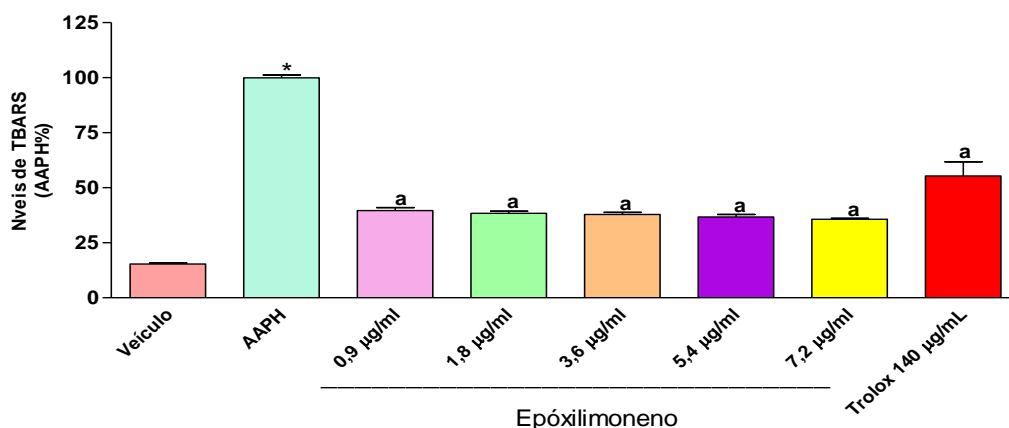


Ilustração 5. Potencial antioxidante do epóxilimoneno contra a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Valores representam média \pm E.P.M, n=8, experimentos em duplicata. ^ap<0.001 versus AAPH, *p<0.001 versus veículo (ANOVA seguido do *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

Por meio de teste antioxidante *in vitro* foi possível verificar que a concentração inibitória 50% (CE₅₀) do epóxilimoneno é de aproximadamente 1,169 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,8339$) contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com margem de variação na concentração efetiva de 0,5565 a 2,455 $\mu\text{g/mL}$ com 95% de intervalo de confiança. Por sua vez, o trolox apresentou uma CE₅₀ de 10,45 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,8660$) contra a formação de TBARS com 95% de intervalo de confiança (4,953 a 22,06 $\mu\text{g/mL}$).

Avaliação do efeito ansiolítico do epóxilimoneno por meio do teste de esconder esferas (*marble-burying test*)

Os camundongos apresentam um comportamento espontâneo de enterrar materiais aversivos presentes em seu ambiente, como objetos, alimentos desagradáveis, pequenos predadores, sendo caracterizado como um comportamento defensivo refletindo no estado de ansiedade dos animais. O teste de esconder esferas é caracterizado por avaliar o comportamento do animal no que diz respeito à tentativa de esconder objetos potencialmente “perigosos”, sendo este comportamento reduzido ou suprimido pela ação de drogas ansiolíticas (LAPA et al., 2008).

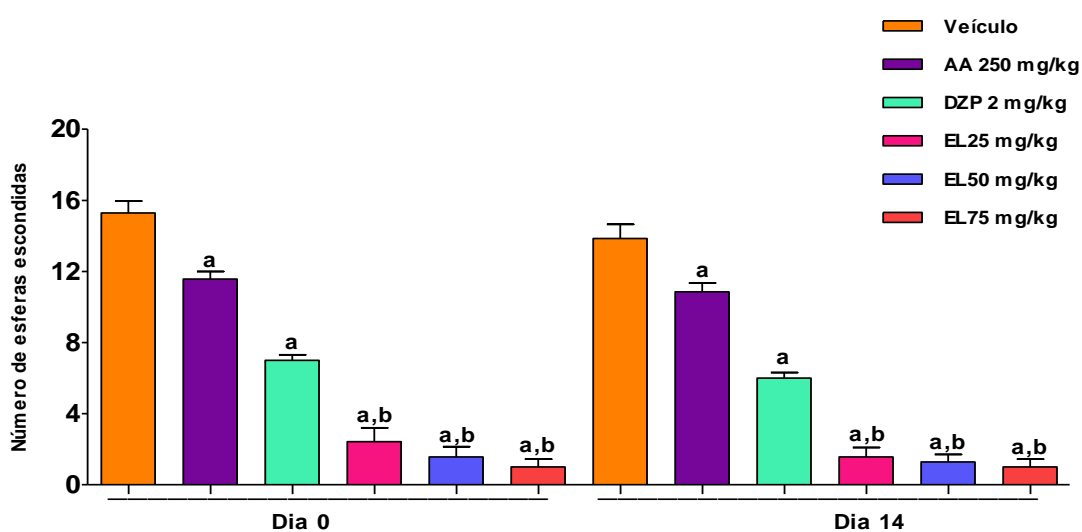


Ilustração 6. Número de esferas escondidas por animais tratados com uma única dose de epóxilimoneno (Dia 0) e com 14 doses de epóxilimoneno (Dia 14), via oral.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=8 por grupo). ^aquando comparado ao grupo veículo, ^bquando comparado ao grupo DZP (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste, $p < 0,05$).

Por meio do teste realizado com os grupos EL (25, 50 e 75 mg/kg), veículo, diazepam e ácido ascórbico foi observado uma redução significativa no número de esferas escondidas nos grupos tratados com EL nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, em relação aos demais grupos (veículo, diazepam e ácido ascórbico).

Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

Determinação dos conteúdos de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados dos efeitos do tratamento com epóxilimoneno na peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos adultos foram apresentados na **Ilustração 7**. No grupo AA 250 ($0,48 \pm 0,03$) foi verificada uma diminuição significativa de 44,18% na peroxidação lipídica em relação ao veículo ($0,86 \pm 0,06$), no hipocampo de camundongos adultos ($p < 0,05$).

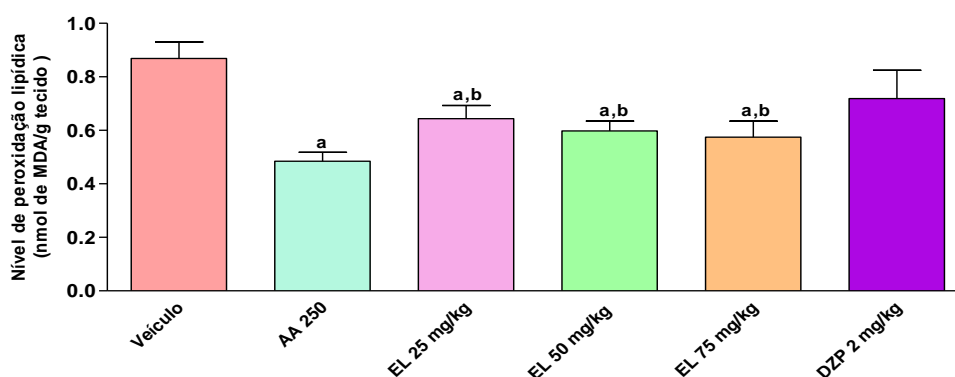


Ilustração 7. Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda e submetidos ao teste de esconder esferas.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos ($n=8$ por grupo). ^aquando comparados ao grupo veículo; ^bquando comparados ao grupo AA 250 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste, $p < 0,05$).

Por sua vez, o tratamento com epóxilimoneno na dose de 25 mg/kg ($0,64 \pm 0,01$), produziu uma redução significativa de 25,58% na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo veículo e um aumento significativo de 33,33% quando comparado ao grupo ácido ascórbico (AA 250). Também foi detectada uma redução significativa no grupo tratado epóxilimoneno na dose de 50 mg/kg ($0,59 \pm 0,01$) em comparação aos valores do grupo veículo (31,39%) e a dose EL25 (7,81%), constatando porem um aumento significativo quando comparado ao grupo AA 250 (22,91%) No grupo que recebeu a dose de 75 mg/kg ($0,57 \pm 0,02$) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (33,72%), EL 25 (10,93%) e EL 50 (3,38%) e um aumento significativo em relação ao grupo AA 250 (18,75%), respectivamente.

Determinação do conteúdo do íon nitrito

Os resultados dos efeitos do epóxilimoneno no conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos foram apresentados na **Ilustração 8**. No grupo ácido ascórbico (AA 250) ($26,75 \pm 1,20$) foi verificada uma diminuição significativa de 41,51% no conteúdo de nitrito em relação ao grupo veículo ($45,74 \pm 1,50$), no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o tratamento com epóxilimoneno na dose de 25 mg/kg ($9,73 \pm 0,38$), produziu uma redução significativa de 78,72% quando comparado ao grupo veículo e 63,62% ao grupo AA 250. Também foi detectada uma redução significativa no grupo tratado epóxilimoneno na dose de 50 mg/kg ($7,95 \pm 0,18$) em comparação aos valores do grupo veículo (82,61%), AA 250 (70,28%) e EL 25 (18,29%). No grupo que recebeu a dose de 75 mg/kg ($5,56 \pm 0,29$) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (87,84%), AA 250 (79,28%), EL 25 (42,85%) e EL 50 (30,06%), respectivamente.

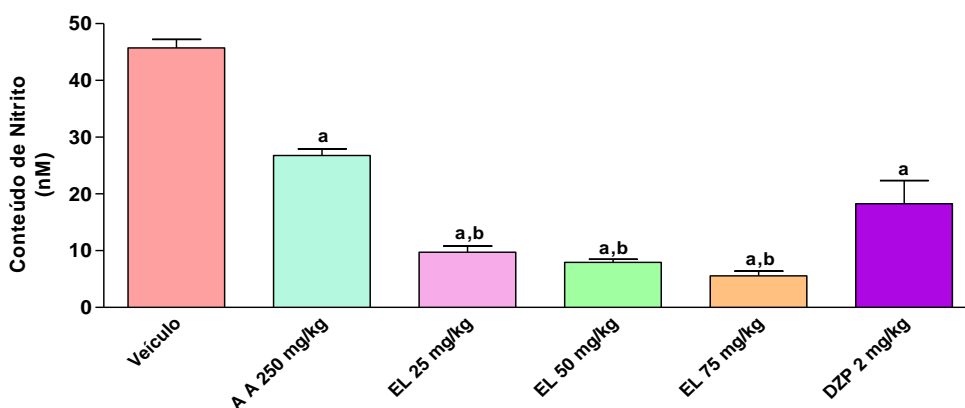


Ilustração 8. Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=8 por grupo).^aquando comparados ao grupo veículo; ^bquando comparados ao grupo AA 250 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste, $p < 0,05$).

Determinação da atividade da catalase

Os resultados apresentados na **Ilustração 9** mostram que o epóxilimoneno, nas concentrações testadas, foi capaz de aumentar a atividade da enzima catalase (CAT) de maneira significativa, em relação ao grupo tratado com o veículo ($16,85 \pm 0,7025$) [EL25: 36,73% ($23,04 \pm$

1,28); EL50: 64,62% ($27,74 \pm 0,88$); EL75: 113,53% ($35,98 \pm 0,63$)]. Por sua vez, houve uma redução significativa da CAT nos grupos tratados com epóxilimoneno quando comparados ao grupo ácido ascórbico (AA 250) ($29,26 \pm 1,27$) em relação as menores doses testadas [EL25: 21,25% ($23,04 \pm 1,28$); EL50: 5,19% ($27,74 \pm 0,88$)], observando um aumento significativo de 22,96% em relação a maior dose EL75 ($35,98 \pm 0,63$), respectivamente.

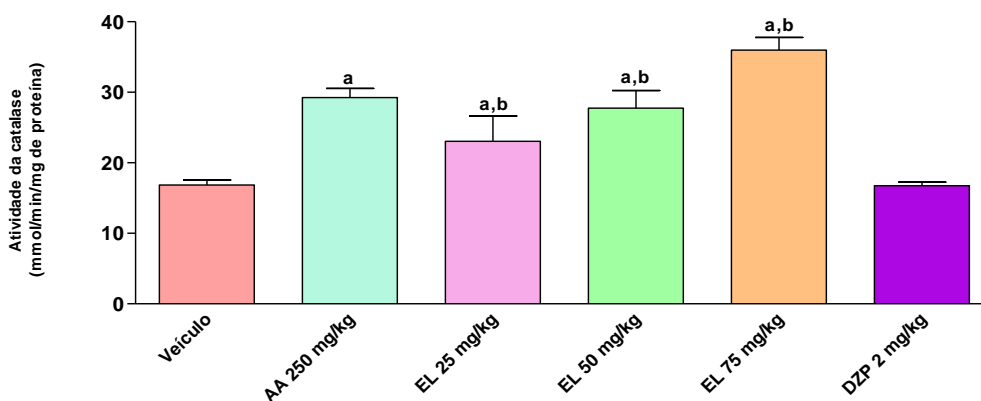


Ilustração 9. Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=8 por grupo). ^aquando comparados ao grupo veículo; ^bquando comparados ao grupo AA 250 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste, $p < 0,05$).

Determinação da atividade da superóxido dismutase

O efeito do tratamento com epóxilimoneno na atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos adultos foram apresentados na **Ilustração 10**.

Os resultados obtidos mostram que, em todas as doses testadas (25, 50 e 75 mg/kg), o epóxilimoneno produz um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase em relação ao grupo tratado com veículo ($1,77 \pm 0,04$) [EL25: 6,21% ($1,88 \pm 0,04$); EL50: 7,34% ($1,90 \pm 0,07$); EL75: 21,46% ($2,15 \pm 0,04$)]. O ácido ascórbico (AA $2,06 \pm 0,01$), droga padrão utilizada, também aumentou o parâmetro observado em relação ao controle 16,38% ($1,77 \pm 0,04$) ($p < 0,05$). Foi verificado uma redução significativa quando comparados os resultados da atividade da superóxido dismutase dos grupos EL25 e EL50 [EL25: 8,73% ($1,88 \pm 0,04$); EL50: 7,76% ($1,90 \pm 0,07$)] e um aumento de 4,36% no grupo EL75 ($2,15 \pm 0,04$) em relação ao grupo controle positivo (AA 250), respectivamente.

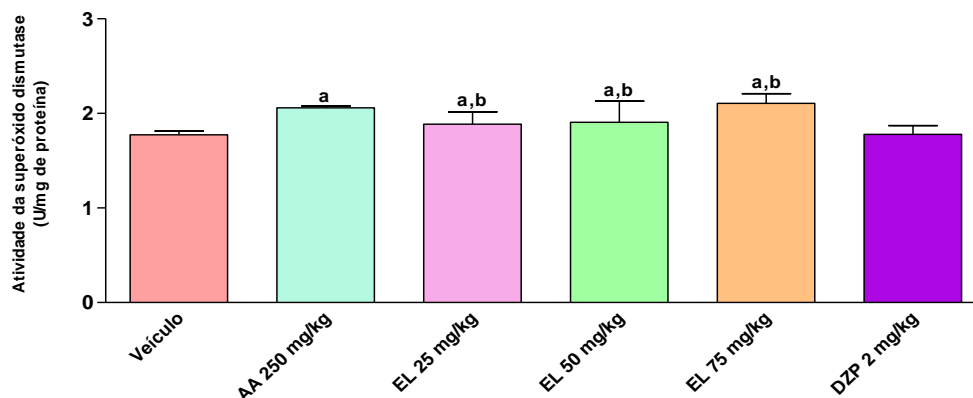


Ilustração 10. Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos tratados com epóxilimoneno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=8 por grupo). ^aquando comparados ao grupo veículo; ^bquando comparados ao grupo AA 250 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O grande interesse no estudo dos antioxidantes é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é indispensável à vida aeróbica e, dessa forma, os radicais livres são produzidos naturalmente. Essas moléculas geradas *in vivo* estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (PEREIRA et al., 2009). O aumento na produção de radicais livres pode ocorrer devido à hiperóxia e à exposição das células ou indivíduos a certos componentes químicos, à radiação ou à inflamação tecidual local, resultando em estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, no qual ocorre predominância de radicais livres (HAIDA, 2011).

Nos estudos de novas moléculas com potencial antioxidante é investigado a concentração efetiva de 50% (CE_{50}) contra a formação dos radicais livres sendo, portanto, a concentração da amostra que proporciona uma inibição de 50% da formação dos radicais, foi calculada a partir do gráfico de percentagem de inibição (%I) em relação à concentração da amostra. Em relação aos valores de CE_{50} , todas as concentrações e os controles devem esgotar as concentrações dos radicais livres em 50% dentro de 1 h. Quanto menor o valor CE_{50} representar, esta terá uma maior potencial antioxidante da amostra (AHMADI et al., 2010).

Os resultados contribuem para ampliar o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes do epóxilimoneno, uma vez que ainda não foram descritos anteriormente na literatura os valores de CE_{50} contra a formação do radical hidroxila, íon nitrito e TBARS para este terpenóide.

Um dos parâmetros avaliados é a peroxidação lipídica, uma das principais consequências do estresse oxidativo, ocorre em ácidos graxos polinsaturados e se inicia com o radical OH^\bullet , que ao capturar um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo, forma um radical. O fato do O_2 ser mais solúvel em meio não polar que em meio polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de O_2 na região hidrofóbica medial, na qual este tem potencial para realizar o maior dano aos ácidos graxos polinsaturados da membrana (REED, 2011).

O epóxilimoneno em todas as concentrações testadas inibiu a quantidade de TBARS gerado pelo meio reacional AAPH, indicando um efeito protetor contra a peroxidação lipídica. Este resultado sugere que o epóxilimoneno pode exercer uma proteção antioxidante em biomoléculas, como fosfolípidos, triacilgliceróis e ácidos graxos poliinsaturados *in vivo*, os quais são lipídeos essenciais para a função da membrana celular e sinalização parácrina. Resultado semelhante foi obtido com o Trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante. Este resultado sugere que o epóxilimoneno pode exercer um efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica, que corroboram com o resultado encontrado no teste *in vivo*, no qual mostra que nos grupo tratados com epóxilimoneno, houve uma redução significativa nos níveis de peroxidação lipídica em todas as doses testadas, indicando uma proteção antioxidante, mais significativa que a produzida pelo ácido ascórbico utilizado como padrão.

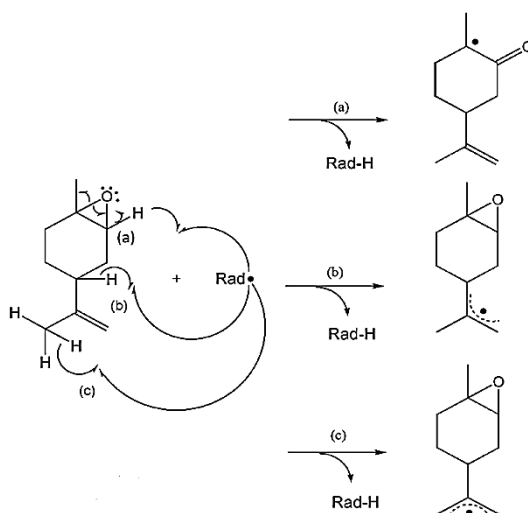
Na análise de correlação de Pearson na redução de TBARS foi encontrada uma correlação positiva ($r^2 = 0,9988$; $p < 0,0307$) entre os resultados encontrados por meio dos testes *in vitro* e *in vivo*. Quando este coeficiente se situa entre os valores de 0,5 e 0,8 podem ser considerado que os parâmetros envolvidos estão moderadamente correlacionados através de uma função linear, quando o coeficiente de correlação de Pearson é superior a 0,8 já é estimado que existe uma correlação linear forte entre os parâmetros em causa (RODRIGUES, 2011) e em nosso estudo foi determinado um valor superior ao considerado como forte. Dessa forma, nossos resultados *in vitro* corroboram com os experimentos *in vivo*, sugerindo que o potencial antioxidante verificado *in vitro* permanece após administração oral em camundongos

O radical (OH^{\bullet}) é indicado como a espécie de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (média vida de 10^{-9} segundos). Essas características os capacitam como o radical livre mais propício para a produção de danos oxidativos. Além disso, pode ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica (BARBOSA et al., 2010). O epóxilimoneno em todas as doses testadas foi capaz de reduzir significativamente a quantidade radical hidroxila, sugerindo, assim, um potencial antioxidante.

Outro parâmetro avaliado foi à produção do nitrito, na qual o epóxilimoneno foi capaz de diminuir significativamente a produção deste íon, demonstrando uma diminuição significativa na produção desse pelo epóxilimoneno durante a decomposição espontânea do óxido nítrico, sugerindo uma propriedade antioxidante, protegendo as biomoléculas, como lipídeos da membrana celular contra danos causados pelos radicais livres derivados do nitrogênio e corroborando com os resultados *in vitro* anteriormente observados para a produção de TBARS e do radical hidroxila. O NO é uma molécula sinalizadora envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive na sinalização da dor e inflamação (KAWANO et al., 2009). O óxido nítrico desempenha um papel importante em vários tipos de processos inflamatórios. Além disso, o NO pode estar implicado na neurogênese de doenças do sistema nervoso central, sendo desta forma de fundamental importância a busca por novos compostos antioxidantes seguros e eficazes.

Os experimentos demonstraram o efeito inibitório do epóxilimoneno sobre a produção do óxido nítrico *in vivo* e *in vitro*, revelando uma diminuição significativa deste íon em todas as doses testadas quando comparadas com o controle positivo, indicando que o epóxilimoneno pode ser altamente eficaz contra a formação de espécies reativas derivadas de nitrogênio, levando em consideração que as concentrações testadas do terpenóide foram aproximadamente 37 vezes menor que a concentração do controle positivo. Por meio da correlação de Pearson foi observada uma correlação linear forte ($r^2 = 0,9207$; $p < 0,0255$) entre os resultados obtidos por meio da metodologia *in vivo* e *in vitro* quanto à determinação da produção de óxido nítrico.

Após a realização dos estudos *in vitro* foi possível propor um mecanismo de ação para o epóxilimoneno com relação ao seu potencial antioxidante contra a formação do radical lipídico, do íon nitrito e dos radicais hidroxilas por meio do sequestro dessas espécies reativas conforme demonstrado na **Ilustração 11**.



Rad• = Radical hidroxila (HO•); Radical lipídico (L•); Íon radical nitrito (NO₂•)

Ilustração 11: Possíveis mecanismos de sequestro de radicais livres (Rad•) pelo epóxilimoneno.

A fonte primária para formação de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) é o aumento do influxo de piruvato e oxigênio na mitocôndria e aumento na produção de EROs (principalmente superóxido) em processos oxidativos na cadeia transportadora de elétrons. A primeira linha de defesa contra os danos oxidativos são os antioxidantes endógenos enzimáticos, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e o sistema de glutatona, dentre elas, glutatona redutase (GSH-Rd) e glutatona peroxidase (GSH-Px). Há também os antioxidantes não enzimáticos que são lipossolúveis (tocoferóis, carotenos, quinonas e bilirrubinas) e hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas ligadas a metais) (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011). O presente estudo mostrou que o epóxilimoneno foi capaz de aumentar de forma significativa à atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, demonstrando uma alteração nas defesas neuroprotetoras cerebral.

A superóxido dismutase é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do radical O₂• a um composto menos reativo, o H₂O₂, que pode ser degradado pelas enzimas GPx e CAT. As principais formas de SOD do sistema biológico são: Cu/Zn- SOD e Mn-SOD. A Cu/Zn-SOD é a principal isoforma envolvida na remoção dos ânions superóxido do citoplasma e, possivelmente, também do peroxissoma, enquanto a função fisiológica da Mn-SOD parece proteger a mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração. Estas enzimas estão distribuídas em diversos órgãos, na seguinte ordem de atividade específica: fígado, cérebro, testículos, rins, coração, estômago, pulmão e pâncreas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, com atividade dependente de NADPH, que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Esta reação é importante, pois o H_2O_2 é nocivo à célula devido a sua capacidade de atacar as cadeias de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas, além de outras macromoléculas, como as proteínas, além de por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH^\bullet , contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Esta enzima está presente em animais, plantas, bactérias e fungos, podendo ser encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado (BARBOSA et al., 2010).

Complementando nossos estudos, foi detectada por meio da relação de Pearson uma relação inversa entre a diminuição quantidade de radical hidroxila e o aumento da atividade das enzimas antioxidantes estudadas como a catalase ($r^2=0,9673$; $p=0,1633$) e a superóxido dismutase ($r^2=0,8663$; $p=0,3330$) produzida pelo epoxilimoneno *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, sugerindo, assim, que o aumento das atividades destas enzimas pode contribuir *in vivo* para a redução da produção desse radical.

Além disso, as enzimas antioxidantes de defesa como, catalase e superóxido dismutase, peroxiredoxina tem mostrado uma diminuição significativa em produtos de peroxidação lipídica (REED, 2011). Dessa forma, esses resultados corroboram com a literatura e pode ser sugerido que a modulação positiva atividade dessas enzimas antioxidantes pelo epóxilimoneno pode prevenir o hipocampo contra a peroxidação lipídica conforme observado nesse estudo.

A atividade dessas enzimas pode proteger contra danos neuronais envolvidos na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (FREITAS et al., 2005). Tem sido demonstrado que o tratamento prévio com epóxilimoneno em todas as doses, produziu um aumento nas atividades de enzimas antioxidantes no hipocampo de camundongos. Tendo em vista que a SOD e CAT podem ser consideradas as defesas antioxidantes enzimáticas endógenas mais importantes do organismo no combate a produção de radicais livres, o aumento da sua atividade sugere que o epóxilimoneno pode apresentar um efeito antioxidante relacionado à modulação da atividade enzimática.

Particularmente, o cérebro produz constantemente EROs e na ausência de um mecanismo de defesa eficiente, estas EROs podem causar peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana gerando dano neuronal (CAMPELO et al., 2011a). O cérebro é suscetível à peroxidação devido à presença simultânea de altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e de ferro, que é o alvo de danos dos radicais livres (CAMPELO et al., 2011b), sendo dessa forma de extrema

importância a investigação de novas fontes naturais de antioxidantes seguros, eficazes e mais baratos com ênfase em aplicações industriais.

Além da avaliação do potencial e do efeito antioxidante e para corroborar com esses resultados esse estudo foi iniciado pelo teste de esconder esferas com animais tratados com epóxilimoneno. É sabido que esse teste pode ser usado para *screening* de drogas com propriedades ansiolíticas. Foi realizado, assim, o uso desse teste inicialmente com o intuito de monitorar pela primeira vez na literatura a relação ao estresse oxidativo e as propriedades ansiolíticas desse monoterpnoide. Na tentativa de esclarecer seu mecanismo de ação e para observar a interação entre o nível de estresse oxidativo e o desempenho dos animais tratados com epóxilimoneno (EL25, EL50 e EL75, v.o).

Os grupos EL25, EL50 e EL75 tiveram melhor desempenho no teste de esconder as esferas em relação aos grupos tratados com veículo, diazepam e ácido ascórbico, sendo verificada uma redução de radicais livres e uma modulação positiva na atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT no hipocampo dos camundongos tratados com epóxilimoneno. Esses resultados corroboram com estudos descritos na literatura que relacionam o estresse oxidativo a vários distúrbios psicossociais e doenças neurodegenerativas (SALIM et al., 2010; SALIM et al., 2011; MARCOLIN et al., 2012).

Complementando essa análise foi feita a correlação de Pearson e observada uma relação positiva entre o efeito ansiolítico e a redução de nitrito no hipocampo dos camundongos ($r^2=0,8069$; $p<0,0402$). De forma semelhante após a correlação foi detectado que associado ao efeito ansiolítico no teste de esconder esferas o epóxilimoneno produz uma diminuição significativa no conteúdo das espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico ($r^2=0,8235$; $p<0,047$). Por outro lado, uma correlação foi negativa entre o efeito ansiolítico e a atividade das enzimas antioxidante SOD ($r^2=0,9581$; $p=0,1850$) e CAT ($r^2=0,8487$; $p=0,3547$). No entanto, esses resultados sugerem que associado ao efeito ansiolítico pode ser verificado um aumento da atividade antioxidante que pode contribuir para o seu potencial neuroprotetor que precisa ser melhor investigado. Por meio destes resultados pode ser sugerido que o efeito ansiolítico pode estar relacionado com a redução do estresse oxidativo, corroborando com estudos anteriores descritos na literatura (HOVATTA et al., 2010; RECKZIEGEL et al., 2011).

No entanto, novos estudos devem ser relacionados para verificar o estado de fosforilação e se pode estar havendo ou não a síntese de novas proteínas das enzimas investigadas no hipocampo dos camundongos tratados com epóxilimoneno.

REFERÊNCIAS

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

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sciences**, v. 36, n. 16, p. 1569-1575, 1985.

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1137-1144, 2010.

BADGUJAR, V.B.; SURANA, S.J. Anxiolytic effects of *Dolichandrone falcata* Seem., Bignoniaceae, stem-bark in elevated plus maze and marble burying test on mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 773-780, 2010.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BOLIGON, A.A. **Atividade antioxidante de flavonóides e terpenóides obtidos das folhas e da casca do tronco de *Scutia Buxifolia* Rissek**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 564, n. 1-3, p. 146-149, 2007.

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

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011b.

CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CHO, M.; LEE, H.; KANG, I.; WON, M.; YOU, S. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p.999-1006, 2011.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 367-373, 2011.

DEAN, O.M.; VAN DEN BUUSE, M.; BUSH, A.I.; COPOLOV, D.L.; NG, F.; DODD, S.; BERK, M. A role for glutathione in the pathophysiology of bipolar disorder and schizophrenia? Animal models and relevance to clinical practice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, p. 2965–2976, 2009.

DE OLIVEIRA, M.R.; SILVESTREIN, R.B.; MELLO, E.; SOUZA, T.; MOREIRA, J.C. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1191–1199, 2007.

DRAPER, H.H., HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

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

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. Moringa oleifera: Bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

GREEN, LC, TANNENBAUM, SR, GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

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.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

HAIDA, K.S.; BARON, A; SILVA, F.J.; ARCELES, M.L; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A.P. COSTA, J.H.B. Free radicals' sequestrating activities and the determination of total phenolic contents of sage and eucalyptus. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61-66, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007. 851 p.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 261-275, 2010.

KAWANO, S.; YAMANO, K.; NAOÉ, M.; MOMOSE, T.; TERAOKA, K.; NISHIKAWA, S.; WATANABE N.; ENDO T. Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n. 34, p. 14403-14407, 2009.

KO, S.H.; CAO, W.; LIU, Z. Hypertension management and microvascular insulin resistance in diabetes. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 243-251, 2012.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A. Caracterização Farmacológica da Atividade Farmaco-lógica no Sistema Nervoso Central. In: LAPA, A.J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). 2008, p. 88-115.

LOPES, G.K.B.; SCHULMAN, H.M.; LIMA, M.H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARCOLIN, M.L.; BENITZ, A.N.D.; ARCEGO, D.M.; NOSCHANG, C.; KROLOW, R.; DALMAZ, C. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 4, p. 491-498, 2012.

MASOOD, A.; NADEEM, A.; MUSTAFA, S.J.; O'DONNELL, J.M. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 326, n. 2, p. 369-379, 2008.

PANDE, G.; AKOH, C.C. Scientific Research and Essays. Scientific Research and Essays. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9427-9436, 2009.

PEKER, E.; OKTAR, S.; ARI, M.; KOZAN, R.; DOGAN, M.; ÇAGAN, E.; SOGUT, S. Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. **Brain Research**, v. 1297, p. 194-197, 2009.

PEREIRA, A.L.F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P.B.L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

POLING, A.; CLEARY, J.; MONAGHAN, M. Burying by rats in response to aversive and non-aversive stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 35, n. 1, p. 31-44, 1981.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVENÚ, D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770-1778, 2011.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.

RODRIGUES, J.A. **Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar - Qualidade Alimentar) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; CHUGH, G.; TANEJA, M.; XIA, Z.; SAHA, K. Oxidative stress: A potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. **Brain Research**, v. 1359, p. 178-185, 2010.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA, M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; VU, A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. **Brain Research**, v. 1404, p. 63-71, 2011.

SALUSTRI, C.; SQUITTI, R.; ZAPPASODI, F.; VENTRIGLIA, M.; BEVACQUA, M.G.; FONTANA, M.; TECCHIO, F. Oxidative stress and brain glutamate-mediated excitability in depressed patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 127, n. 1-3, p. 321-325, 2010.

SLYVKA, Y.; WANG, Z.; YEE, J.; INMAN, S.R.; NOWAK, F.V. Antioxidant diet, gender and age affect renal expression of nitric oxide synthases in obese diabetic rats. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 1, p. 50–60, 2011.

SOUZA, C.G.; MOREIRA, J.D.; SIQUEIRA, I.R.; PEREIRA, A.G.; RIEGER, D.K.; SOUZA, D.O.; SOUZA, T.M.; PORTELA, L.V.; PERRY, M.L. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sciences**, v. 81, n. 3, p. 198–192, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2008.

VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M.; RAO, C.V.; MATHELA, C.S. In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 704-709, 2010.

VOLLERT, C.; ZAGACR, M.; HOVATTA, I.; TANEJA, M.; VU, A.; DAO, A.; LEVINE, A.; ALKADHI, K.; SALIM, S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behavioural Brain** 233-240, 2011.

**CAPÍTULO IV: Composições à base de epóxi-limoneno para o tratamento de doenças
relacionadas ao sistema nervoso central**

**Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com
número de Processo N°: BR1020120135167.**

RESUMO

“COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXILIMONENO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL”

A presente invenção diz respeito ao uso do epóxilimoneno, 1-metil-4-(prop-1-en-2-il)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano, como agente ansiolítico. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao potencial sedativo, hipnótico e ansiolítico do produto natural e a sua utilização na formulação de produto(s) farmacêuticos para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central, principalmente transtornos do sono e ansiedade. A avaliação das atividades sedativa e ansiolítica do epóxilimoneno foi comprovada experimentalmente por meio das etapas que avaliaram a toxicidade aguda, atividade ansiolítica e efeito sedativo, após a administração do epóxilimoneno. Os resultados dão suporte à hipótese de que epóxilimoneno interage com o receptor GABA_A, provavelmente nos subtipos de receptores que mediam os efeitos benzodiazepínicos, para produzir atividades sedativas e hipnóticas.

REIVINDICAÇÕES

1. “COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXILIMONENO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL” produto natural ou derivado de um monoterpene natural, **caracterizado por** ser o princípio ativo para preparar fármacos (semissintético, fitofármaco, biológico, biotecnológico, fitoterápico ou fitomedicamento) com atividade farmacológica ansiolítica e sedativa para o tratamento de transtornos mentais.
2. “COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXILIMONENO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL” produto natural da Reivindicação 1, **caracterizado por** ser usado com diversas formas farmacêuticas de apresentação, que poderá ser administrada como solução; xarope; elixir; suspensão; emulsão; aerossol; comprimido; drágea e/ou cápsula.
3. “COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXILIMONENO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL” produto referente a Reivindicação 1, **caracterizado por** veiculado em qualquer apresentação farmacêutica, esteja esta na forma de produtos farmacêuticos sólidos, semi-sólidos e/ou líquidos, estéreis ou não, independente da via de administração, posologia, concentração do produto sintético na formulação e forma de liberação dos ativos (liberação imediata, liberação controlada, e etc.).
4. “COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXILIMONENO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL” produto farmacêutico da Reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** apresentar a ação farmacológica de interesse quando isolado ou quando associado a qualquer outro fármaco que potencialize a ação ansiolítica do mesmo para uso em humanos, que pode ser destinado a administração pediátrica, adulta ou geriátrica para tratar distúrbios do sono e da ansiedade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento agudo com epóxilimoneno revelou uma DL_{50} de aproximadamente 4000 mg kg^{-1} . Os resultados indicam ausência de toxicidade aguda, uma vez que o epóxilimoneno não produz alterações hematológicas e bioquímicas em camundongos adultos. O epóxilimoneno possui atividades psicofarmacológicas incluindo atividades sedativa e ansiolítica, esses efeitos podem ser mediados pela transmissão GABAérgica.

Foi realizado o depósito do pedido de patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de Processo N°: BR 10 2012 006336 0.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA**

- *Artigos Publicados*

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

- *Artigos Submetidos*

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; COSTA, J.P.; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; SOUZA, G.F.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos. Artigo submetido ao **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**.

- *Depósito de pedido de patente*

ALMEIDA, A.A.C.; NUNES, L.C.C.; CARVALHO, R.B.F.; LIMA, T.C.; MORAES, J.; NAKANO, E.; SOUSA, D.P. ; FREITAS, R.M. **Aplicação Farmacêutica do Epóxilimoneno no Tratamento da Esquistossomose** - Patente requerida junto ao INPI -Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de Processo Nº: BR 10 2012 006336 0. 2012.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. **Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno**. In: IV Simpósio de Produtividade em Pesquisa e IV Encontro de Iniciação Científica, 2012, Teresina - PI. IV Simpósio de Produtividade em Pesquisa e IV Encontro de Iniciação Científica, 2012.

ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.M. **Ensaio pré-clínicos com epóxilimoneno: perspectivas de um novo fitomedicamento**. In: I Workshop de Projetos e Dissertações, 2012, Teresina, PI. I Workshop de Projetos e Dissertações, 2012. v. 5. p. 1-105.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; COSTA, J.P.; COSTA, I.H.F.; FREITAS, R.M. **Estudos pré-clínicos do epóxilimoneno e avaliação de sua ação ansiolítica em camundongos**. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2012, Aguas de Lindóia, SP. FESBE 2012, 2012.

ANEXOS

ANEXO A: Confirmação de submissão ao Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas



BOLETÍN LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS

Dr
Rivelilson Mendes de Freitas
Universidade Federal do Piauí
Teresina
Brasil

En referencia a su artículo: “**Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos**”. (BLACPMA Nº 417). Este ha sido recibido y nos pondremos en contacto con usted en cuanto tengamos los comentarios de su artículo por parte de dos referees de nuestro Comité Editorial.

BLACPMA es una revista ISI con Factor de Impacto 0.323

EN LO SUCESIVO ESCRÍBAME SOLO AL E-MAIL editor.blacpma@usach.cl

Agradeciendo la preferencia para publicar en BLACPMA le saluda

José L. Martínez
Editor Jefe
BLACPMA
Visite www.blacpma.usach.cl



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Evaluation of acute toxicity of a natural compound
(+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action

Antonia Amanda C. de Almeida^a, Jéssica Pereira Costa^b, Rusbene Bruno F. de Carvalho^a,
Damião Pergentino de Sousa^c, Rivelilson Mendes de Freitas^b,

^aDepartment of Chemistry of Federal University of Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Pharmacology, Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science of Federal University of Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

^cDepartment of Physiology, Federal University of Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 January 2012

Available online 10 February 2012

Keywords:

Acute toxicity

Anxiety

(+)-Limonene epoxide

Mice

Sedation

ABSTRACT

The aim of the study is to determine the acute toxicity and anxiolytic-like effects of a mixture of cis and trans of (+)-limonene epoxide in animal models of anxiety. After acute treatment with (+)-limonene epoxide at doses of 25, 50 and 75 mg/kg (i.p.) no mortality was noted during 14 days of observation. In general, behavior, food and water consumption showed no significant changes. In open field test, (+)-limonene epoxide at doses of 25, 50 and 75 mg/kg, after intraperitoneal administration, significantly decreased the number of crossings, grooming and rearing ($p < 0.001$). All these effects were reversed by the pre-treatment with flumazenil (25 mg/kg, i.p.), similar to those observed with diazepam used as a positive standard. In the elevated-plus-maze test, (+)-limonene epoxide increased the time of permanence and the number of entrances in the open arms. All these effects were reversed by flumazenil, an antagonist of benzodiazepine receptors. In addition, (+)-limonene epoxide (75 mg/kg) also produced a significant inhibition of the motor coordination ($p < 0.01$), that was reversed by flumazenil. In conclusion, the present work evidenced sedative and anxiolytic-like effects of (+)-limonene epoxide, which might involve an action on benzodiazepine-type receptors. These results indicate that the properties of (+)-limonene epoxide should be more thoroughly examined in order to achieve newer tools for management and/or treatment of central nervous system diseases and anxiolytic-like effects. The LD₅₀ obtained for the acute toxicity studies using intraperitoneal route of administration was 4.0 g/kg. These findings suggest that acute administration of the (+)-limonene epoxide exerts an anxiolytic-like effect on mice, and it could serve as a new approach for the treatment anxiety, since it practically does not produce toxic effects.

Published by Elsevier B.V.

Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Cep: 64.049-550, Brazil. Fax: +55 85 4883316.



E-mail address: rivelilson@pq.cnpq.br (R.M. de Freitas).

0006-8993/\$ – see front matter. Published by Elsevier B.V.

doi:10.1016/j.brainres.2012.01.

ANEXO C: Pedido de Depósito de Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

< Uso exclusivo do INPI

Espaço reservado ao protocolo	 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 30/05/2012 03212000095 10:09 REPI  BR 10 2012 013516 7 Espaço para etiqueta
-------------------------------	--

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: RUSBENE BRUNO FONSECA DE CARVALHO
1.2 Qualificação Graduado
1.3 CNPJ/CPF: 03055188365
1.4 Endereço Completo Conj. Tancredo Neves Q-02 B1-13 Apt-102
1.5 CEP: 64076520 1.6 Telefone (86) 94452259 1.7 Fax:
1.8 E-mail: rusbenebruno@hotmail.com

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

COMPOSIÇÕES À BASE DE EPÓXI-LIMONENO PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: RUSBENE BRUNO FONSECA DE CARVALHO
6.2 Qualificação Graduado 6.3 CPF: 03055188365
6.4 Endereço completo Conj. Tancredo Neves Q-02 B1-13 Apt-102
6.5 CEP: 64076520 6.6 Telefone: (86) 94452259 6.7 Fax:
6.8 E-Mail: rusbenebruno@hotmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	09 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)				11 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Teresina, 30 de maio de 2012

Local e Data

Rubene Bruno Fonseca de Carvalho
Assinatura e Carimbo

Continuação do Item 6 – inventor (72)

6.1 Nome: Antonia Amanda Cardoso de Almeida
6.2 Qualificação: Mestrando 6.3 CPF: 03972930380
6.4 Endereço completo: Rua Inhuma, nº 5771, Renascença II, Teresina-PI
6.5 CEP: 64082-650
6.6 Telefone: (86) 94325951 / (86)30844227 6.7 Fax: (--)
6.8 E-mail: amanda_wxz@hotmail.com

6.1 Nome: Paulo Michel Pinheiro Ferreira
6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: 835.051213-04
6.4 Endereço completo: Rua Nossa Senhora Aparecida, 3733 – 1º andar, Junco, Picos,
PI, Brasil
6.5 CEP: 64.600-000
6.6 Telefone: (89) 34221008 6.7 Fax: (89) 34221024
6.8 E-mail: pmifepe@yahoo.com.br

6.1 Nome: Damião Pergentino de Sousa
6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: 759.619.894-53
6.4 Endereço completo: Rua Jorge Pereira Porto, 248, ap. 1203SP, Salgado Filho,
Aracaju, SE, Brasil
6.5 CEP: 49020-140
6.6 Telefone: (79) 3246-4973/(79) 8832-9710 6.7 Fax: ()
6.8 E-mail: damiao_desousa@yahoo.com.br

6.1 Nome: Rivelilson Mendes de Freitas
6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: 77580745372
6.4 Endereço completo: Rua Visconde da Parnaíba, 2340 apto 101, Horto Florestal
Teresina-PI
6.5 CEP: 64.049-570
6.6 Telefone: (86)32371240/88182379 6.7 Fax: ()
6.8 E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br