



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

Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos

DAYANE ALVES COSTA

Teresina – Piauí

2012

DAYANE ALVES COSTA

Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos

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

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2012

DAYANE ALVES COSTA

Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos

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 da Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim Santos

Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

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

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

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

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“ A natureza é exatamente simples, se conseguirmos encará-la de modo apropriado... Essa crença tem me auxiliado, durante toda a minha vida, a não perder as esperanças, quando surgem grandes dificuldades de investigação.”

Albert Einstein

“ Se és incapaz de sonhar, nasceste velho. Se teu sonho te impede de agir conforme a realidade, nasceste inútil. Se, porém, sabes transformar sonhos em realidade e focar a realidade com a luz do teu sonho, então serás grande no teu mundo e o mundo será grande em ti.”

Plínio Salgado

Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha família pelo esforço,
dedicação e compreensão em todos os momentos da minha
vida,*

*E ao meu orientador pela atenção e cuidado diante desse
desafio que muito contribuiu para minha formação pessoal e
profissional.*

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a:

Deus, por sempre me iluminar, me guiar e me proteger.

Minha **grande FAMÍLIA**, que me dá existencialmente motivos para acreditar nos meus sonhos, que me faz rir e chorar com as dificuldades, em especial aos meus pais, **Gabriel Costa Neto** e **Teresinha Alves Pereira**, minha madrinha, **Maria Júlia Alves do Nascimento**, meu padrinho **Edmilson Ferreira do Nascimento** e minha mainha **Otilia Gonçalves Pereira**.

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** que diariamente me fez acreditar na realização desse sonho, pelo auxílio e paciência nas orientações e conselhos para eu continuar nessa caminhada e por diuturnamente se dedicar a ciência. E por eu ter a sorte de encontrá-lo no meu caminho.

Aos amigos ‘friends forever’ pelo companheirismo, felicidade e distração ao longo da minha vida: **Geyson Igo**, **Jakellyne**, **Lina Clara**, **Marina**, **Ítalo**, **Hilton Danilo**, minha prima-irmã **Juliana**, minha irmã **Tatyane** e a também a **Eliamara** por toda ajuda até mesmo antes do mestrado e aos colegas que também fazem parte da alegria desse momento.

Aos **Profs. Drs. Livio César Cunha Nunes**, **Hercília Maria Lins Rolim Santos**, **José Arimatéia Dantas Lopes** e a **Profa. Dra. Francilene Amaral da Silva** pela disposição em se fazerem presentes e ajudarem na correção da dissertação, com brilhantes sugestões e conhecimentos.

Aos Colaboradores que contribuíram e foram indispensáveis para a realização desta Dissertação, **Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa**, pela disponibilização da substância utilizada nesse estudo, a ciano-carvona; E a **Profa. Ma. Geane Félix de Souza** pelas análises hematológicas e bioquímicas. A **Profa. Dra. Antônia Maria das Graça Lopes Citó** e ao **Everton França** pelo auxílio na realização dos estudos químicos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização dessa dissertação de mestrado, por todo o apoio científico. Em especial ao **Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes** por tamanha alegria e disposição em participar do programa.

Aos meus companheiros de Mestrado, Mayara, Débora Cássia, Patrícia Regia José Jauro, Talita, Daniella, Lyghia, Ulisses, Alisson, Luis Alberto, em especial a **Jéssica Pereira Costa** que foi mais que uma companheira, me auxiliou em todas as etapas e me ajudou nas dificuldades.

Aos colegas do LAPNEX pela ajuda quando necessário e em especial, o **Guilherme Antônio Lopes de Oliveira**, meu adorável aluno de iniciação científica, que foi indispensável para a realização desse trabalho, que não apenas me auxiliou nos experimentos, mas incorporou o espírito científico compreendendo todas as etapas do processo de investigação.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização dessa pesquisa.

Ao CNPq, FAPEPI e CAPES pelo incentivo financeiro dispensado durante a pesquisa.

Muito Obrigada!

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 Plantas medicinais	20
3.2 Monoterpenos	21
3.3 Ciano-carvona	23
3.4 Ansiedade	24
3.5 Epilepsia	25
Referências	26
4. CAPÍTULO I: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> da ciano-carvona	36
Resumo	37
Abstract	38
Introdução	39
Objetivos	40
Material e Métodos	40
Resultados	43
Discussão	50
Referências	54
5. CAPÍTULO II: Efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes de ciano-carvona sobre a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos	59
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Objetivos	62

Material e Métodos	63
Resultados	65
Discussão	71
Referências	74
6. CAPÍTULO III: Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona	80
Resumo	81
Abstract	82
Introdução	83
Objetivos	83
Material e Métodos	84
Resultados e Discussão	88
Conclusão	95
Referências	96
7. CAPÍTULO IV: Formulações farmacêuticas à base da ciano-carvona para tratamento de doenças neurodegenerativas	100
Resumo	101
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	103
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2'2-azobis-2-amidinopropano
AChE	Acetilcolinesterase
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
BZP	Benzodiazepínicos
CC	Ciano-carvona
ChAT	Colina acetiltransferase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Colesterol total
DAE	Drogas antiepilépticas
DL ₅₀	Dose que mata 50% da amostra
DZP	Diazepam
EME	Estado de mal epiléptico
E.P.M.	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
fL	Fentolitros
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
i.p.	Via intraperitoneal
LIEME	Latência para instalação de estado de mal epiléptico
LIPC	Latência da instalação da primeira convulsão
ME	Mal epiléptico
NEBA	Número de entrada nos braços abertos
PEBA	Porcentagem de entradas para os braços abertos

Pg	Picograma
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
SNC	Sistema Nervoso Central
SCP	Sinais colinérgicos periféricos
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
χ^2	Teste do Qui Quadrado
v.o.	Via oral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Ilustração 1 Estrutura química dos compostos: isopreno, monoterpene e sesquiterpenos.....	22
Ilustração 2 Estruturas químicas de monoterpenos com propriedades farmacológicas definidas	23
Ilustração 3- Modificação estrutural da R-(-)-carvona por meio de uma cianificação para obtenção da ciano-carvona	24

Capítulo I

Ilustração 1 Modificação estrutural da R-(-)-carvona por meio de uma cianificação para obtenção da ciano-carvona	42
Ilustração 2 Avaliação dos efeitos de ciano-carvona contra a formação de TBARS <i>in vitro</i>	45
Ilustração 3 Proposta dos possíveis mecanismos da ação antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica	46
Ilustração 4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> da ciano-carvona contra a formação do radical nitrito (NO ₂ ⁻)	47
Ilustração 5 Proposta dos possíveis mecanismos da ação antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical nitrito	48
Ilustração 6 Avaliação da atividade antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila	49
Ilustração 7 Proposta dos possíveis mecanismos da ação antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila	50

Capítulo II

Ilustração 1 Efeitos da ciano-carvona (CC) sobre o nível de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina	68
Ilustração 2 Efeitos da ciano-carvona (CC) sobre o teor de nitrito no hipocampo ratinhos após convulsões induzidas por pilocarpina	70
Ilustração 3 Efeitos de ciano-carvona (CC) em acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina	71

Capítulo III

Ilustração 1 Estrutura química ciano-carvona (1S,2S,5R)-5-isoprenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila	85
--	----

Ilustração 2 Processo de obtenção do composto ciano-carvona	85
Ilustração 3 Reação de obtenção do composto ciano-carvona	86

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do composto ciano-carvona (1S, 2S, 5R)-5 Isopropenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila	44
---	----

Capítulo II

Tabela 1 Efeitos do tratamento prévio com ciano-carvona (CC) em convulsões induzidas por pilocarpina, estado de mal epilético e letalidade em camundongos adultos	67
--	----

Capítulo III

Tabela 1 Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) obtidas da substância ciano-carvona	86
Tabela 2 Efeitos da administração aguda por via oral da ciano-carvona em camundongos durante 14 dias de observação	91
Tabela 3 Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com ciano-carvona por via oral	92
Tabela 4 Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com ciano-carvona por via oral	93
Tabela 5 Efeitos da ciano-carvona no teste de campo aberto em camundongos	94
Tabela 6 Efeitos da ciano-carvona no teste do <i>rota rod</i> em camundongos	95
Tabela 7 Efeito da ciano-carvona no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	96

Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos. DAYANE ALVES COSTA. Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

O composto ciano-carvona (CC), derivado sintético da carvona, foi o objeto de estudo deste trabalho, obtido a partir da síntese da substância R-(-)-carvona, um monoterpene monocíclico. No primeiro capítulo, objetivou-se investigar a atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona, sendo capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por AAPH, por inibição a quantidade de substâncias ácidas reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) formado. A ciano-carvona também produziu uma remoção do radical hidroxila podendo ser devido a uma atividade antioxidante, sugerindo uma possível capacidade de proteção contra danos celulares *in vivo* produzidos por este radical. Na avaliação de produção de óxido nítrico, houve uma diminuição significativa na produção deste composto pela CC, demonstrando uma propriedade antioxidante *in vitro*, que pode ser explorada para a proteção *in vivo* das biomoléculas, como lipídios da membrana celular, contra danos causados pelos radicais livres. A CC apresentou um forte potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxilas e do nitrito, bem como preveniu a formação de TBARS. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar melhor as propriedades antioxidantes da ciano-carvona. No segundo capítulo foram investigados os efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes de ciano-carvona e sua ação sobre a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos após tratamento com CC nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹. O efeito anticonvulsivante de CC foi investigada no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. Esse monoterpene foi capaz de promover um aumento de latência para a instalação de estado de mal epilético induzido por pilocarpina e apresentou uma proteção significativa contra a peroxidação lipídica e formação de nitrito no hipocampo de camundongos. Além disso, o pré-tratamento com CC aumentou a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina. Os resultados indicam a capacidade de CC modular os efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes. No terceiro capítulo, foi realizado a avaliação da toxicidade aguda por via oral da CC para o cálculo da dose letal 50% (DL₅₀) e determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como o efeito ansiolítico por meio dos testes de campo aberto, *rota rod* e labirinto em cruz elevado em camundongos *Swiss* machos. O tratamento não causou nenhuma morte ou toxicidade nos animais, não sendo possível calcular a DL₅₀, como também não apresentou nenhuma alteração bioquímica e hematológica após tratamento com CC nas doses 25, 50 e 75 mg kg⁻¹. Não foi observada alteração no número de *groomings* e houve uma diminuição do número de *rearings*. Em relação ao labirinto em cruz elevado houve um maior número de entradas nos braços abertos, bem como um maior tempo de permanência nos braços abertos, sugerindo um possível efeito ansiolítico. Em relação ao teste do *rota rod* não foi verificada alteração no tempo de permanência na barra giratória, bem como não foi detectado mudanças no número de quedas. O quarto capítulo refere-se ao pedido de registro de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) por meios do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NINTEC), com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica utilizando a ciano-carvona para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-Chave: Ansiedade, Anticonvulsivante, Antioxidante, Monoterpene, Ciano-carvona.

Preclinical study of biochemical and pharmacological effects of the cyano-carvone in mice: a support for the development of phytomedicines. DAYANE ALVES COSTA.

Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2011.

ABSTRACT

The compound cyano-carvone (CC), a synthetic derivative the carvone, was the object of study of this work, obtained from the synthesis of the substance R-(-)-carvone, a monoterpene monocyclic. The first chapter aimed to investigate the *in vitro* antioxidant activity of cyano-carvone, being able to prevent lipid peroxidation induced by 2'2'-azobis-2-amidino proprano (AAPH), inhibiting the amount of thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS) formed. The cyano-carvone also produced a removal of the hydroxyl radical may be due to an antioxidant activity, suggesting a potential ability to protect against cell damage *in vivo* produced by this radical. In the evaluation of nitric oxide production, a significant reduction in the production of this compound by CC, showing an antioxidant properties *in vitro*, which can be exploited *in vivo* to protect the biomolecules such as lipids of cell membrane damage caused by free radicals. The cyano-carvone had a strong antioxidant potential *in vitro*, by removal capacity from hydroxyl radicals and nitrite, and prevented the formation of TBARS. However, more studies are needed to better characterize the antioxidant properties of cyano-carvone. In the second chapter we investigated the effects of anticonvulsants and antioxidants cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in the hippocampus of mice after treatment with CC in doses of 25, 50 and 75 mg kg⁻¹. The anticonvulsant effect of CC was investigated in model of epilepsy induced by pilocarpine. This monoterpene was able to promote an increased latency for the installation of status epilepticus induced by pilocarpine and showed significant protection against lipid peroxidation and nitrite formation in the hippocampus of mice. Furthermore, the CC pretreatment increased the acetylcholinesterase activity in the hippocampus of mice after pilocarpine-induced seizures. The results indicate the ability to modulate the CC anticonvulsant effects and antioxidants. In the third chapter was conducted to evaluate the acute oral toxicity of CC to determination of Lethal Dose 50% (LD₅₀) and investigation of biochemical and hematological parameters as well as the anxiolytic effect through the open field test, *rota rod* and elevated plus maze in male Swiss mice. The treatment caused no deaths or toxicity in animals, it is not possible to calculate the LD₅₀, but showed no biochemical and hematological changes after treatment with CC in doses 25, 50 and 75 mg kg⁻¹. There was no change in the number of *groomings* and there was a decrease in the number of *rearings*. In relation to the elevated plus-maze was a greater number of entries into open arms, and a greater time spent in open arms, suggesting a potential anxiolytic effect. With regard to route test rod was not observed change in residence time in the rotating bar and was not detected changes in the number of falls. The fourth chapter refers to the patent application for registration submitted to the National Institute of Industrial Property (INPI) by Center for Innovation and Technology Transfer (NINTEC), in order to subsidize the development of a new pharmaceutical formulation using cyano-carvone for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: Anxiety, Anticonvulsant, Antioxidant, Monoterpene, Cyano-carvone

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a demanda por medicamentos à base de plantas medicinais é crescente. Esta nova alternativa terapêutica pode ser considerada uma forma mais saudável e menos danosa de tratamento. Além disso, pode reduzir a ausência de acesso aos medicamentos farmacológicos e apresentar uma menor incidência de efeitos colaterais (OLIVEIRA et al., 2008).

Até o século XIX, os medicamentos disponíveis eram quase que exclusivamente formulados à base de plantas medicinais. Segundo Oliveira e Akisue (1998), planta medicinal é todo vegetal que contém em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou precursores de substâncias para este fim. Fato que pode ser justificado pela diversidade de constituintes químicos em que os terpenos constituem a classe de produtos naturais com maior número de substâncias descritas (DEWICK et al., 2009), motivo que reforça a utilização de um monoterpeneo no presente estudo.

De acordo com Santos (2005) os terpenos podem ser divididos em três grupos, a saber: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, classificados nos subgrupos dos hidrocarbonetos insaturados como o limoneno, os álcoois como o mentol, lactonas ou terpenos lactônicos denominados de iridóides como a nepelactona, as tropolonas como γ -tujaplicina e os aldeídos ou cetonas como a carvona, um monoterpeneo monocíclico cetônico, do qual foi obtido por meio de uma modificação estrutural de cianificação o derivado sintético ciano-carvona que é a substância de interesse do presente estudo.

Dessa forma a carvona (*p*-mentha-6,8-dien-2-ona) um monoterpeneo cetônico encontrado como o principal componente ativo de diversos óleos essenciais de plantas medicinais, como hortelã (*Mentha spicata* L.), aneto (*Anethum graveolens* L.), cominho (*Carum carvi* L.) e capim-cidreira (*Lippia alba* Mill.) apresenta várias propriedades farmacológicas como antimicrobiana (DUARTE, 2006), antifúngica (SARTORATTO et al., 2004), anti-inflamatória e anti-septica (SOUSA, 2004) e pode ser empregado na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Normalmente este monoterpeneo é obtido por hidrodestilação e ocorre naturalmente como os enantiômeros (+)- e (-)-carvona em várias plantas medicinais (GONÇALVES et al., 2010), sendo desta forma utilizado pela química medicinal como precursor de vários derivados sintéticos.

Alguns destes estudos têm relatado que os terpenos e seus derivados sintéticos apresentam várias propriedades farmacológicas, dentre as quais podemos citar algumas delas com atividade no sistema nervoso central (SNC) como a α,β -epóxi-carvona com atividade

antinociceptiva (SOUSA et al., 2007b) e o limoneno (VIANA et al., 2000), o mentol (GALEOTTI et al., 2002), o citronelol (SOUSA et al., 2006), α -terpineol (SOUSA et al., 2007d) e o isopulegol (SOUSA et al., 2009) com ação anticonvulsivante.

No estudo de Buchbauer e colaboradores (2005) foi verificado que o efeito da carvona sobre a atividade locomotora de ratos depende da quiralidade deste terpeno cetônico. Nesse estudo os autores demonstraram que a (-)-carvona apresenta maior efeito sedativo e relaxante muscular, enquanto que a (+)-carvona produz tanto sedação quanto um aumento da atividade locomotora em ratos.

Apesar disso, existem poucos estudos que demonstram claramente os efeitos da carvona e derivados sintéticos deste composto no SNC (GONÇALVES et al., 2010). Assim, a potencial atividade farmacológica da ciano-carvona um derivado sintético da carvona foi avaliado em modelos experimentais para a elucidação dos seus efeitos neurofarmacológicos, bem como foi investigada a sua toxicidade aguda para garantir que o seu uso pode ser feito de forma segura em humanos, de acordo com as propriedades farmacológicas identificadas.

Dentre os efeitos neurofarmacológicos, no presente estudo avaliamos o potencial ansiolítico e anticonvulsivante da ciano-carvona em modelos animais, uma vez que os transtornos de ansiedade e a epilepsia são as condições psiquiátricas mais comuns em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Atualmente em algum momento da sua vida uma grande parte da população é acometida com estas condições. Devido à limitada eficácia e o elevado número de efeitos colaterais das drogas disponíveis, a necessidade de tratamentos mais eficazes e seguros é cada vez maior (MORA et al., 2005).

Nesse sentido a comprovação das atividades farmacológicas das plantas medicinais utilizadas popularmente ou a descoberta de seus constituintes ativos responsáveis pelas suas propriedades curativas e/ou toxicológicas se faz essencial na busca de novos agentes terapêuticos. Dessa forma, a ciano-carvona como derivado de um composto natural, em estudos preliminares demonstrou atividades no SNC, sugerindo uma possível atividade ansiolítica e anticonvulsivante, reforçando o interesse no presente estudo, uma vez que os dados poderão subsidiar o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas com este monoterpeneo para o tratamento destas patologias como novas perspectivas de psicofármacos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos por meio da determinação da toxicidade aguda, atividade ansiolítica, anticonvulsivante e antioxidante *in vitro* da ciano-carvona para subsidiar o desenvolvimento de um fitomedicamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a dose letal 50% (DL₅₀) e avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Avaliar o possível efeito ansiolítico da ciano-carvona em modelos experimentais em camundongos adultos;
- Avaliar a atividade anticonvulsivante da ciano-carvona caracterizando seu mecanismo de ação sobre convulsões induzidas por pilocarpina;
- Examinar a atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Atualmente as plantas medicinais desempenham um grande papel na saúde humana em todo o mundo (WONDIMU et al., 2007). Os estudos com plantas medicinais são crescentes devido à sua capacidade de produzir moléculas com atividade terapêutica. Uma planta é tida como medicinal por possuir substâncias que têm ação farmacológica (atuação dos componentes químicos das plantas no organismo) (YUNES et al., 2005). O conhecimento da atividade medicinal das plantas vem desde os primórdios da humanidade até a atualidade, sendo utilizada pra diversos fins, como para a alimentação, na prevenção e no tratamento de doenças.

A fitoterapia é a área da medicina que utiliza matérias-primas ativas de origem vegetal, cujos princípios ativos são substâncias ou classes de substâncias quimicamente definidas de plantas medicinais. Estas plantas medicinais utilizadas na medicina popular podem ter suas ações farmacológicas já comprovadas por meio de estudos científicos devido aos seus efeitos terapêuticos em modelos experimentais (BRASIL, 2006). Diante disso, a utilização de plantas na medicina se deve ao esclarecimento e comprovação das ações farmacológicas dessas entidades por diversos estudos científicos.

Dessa forma, a presença de compostos secundários na constituição química das plantas medicinais tem sido bastante explorada. Este fato pode ser justificado pela grande diversidade estrutural, como a presença dos terpenos, alcalóides, flavonóides, cumarinas, entre outros. A utilização destas plantas para fins terapêuticos deve levar em consideração não apenas a ação farmacológica, como também a eficácia e segurança terapêutica para uso clínico em humanos (MATOS, 2000).

Segundo Mariz e colaboradores (2008) pesquisas com plantas medicinais no Brasil ainda são limitadas, o crescimento de pesquisas nessa área pode corresponder apenas a 10% ao ano. Desta forma, existe ainda no Brasil uma diversidade de plantas que necessitam de estudos para elucidar e comprovar atividades biológicas já observadas empiricamente.

Vários medicamentos fitoterápicos são reconhecidos com atividades no sistema nervoso central (SNC). O uso popular destes produtos farmacêuticos pode ser relacionado ao potencial efeito no tratamento de diversas patologias crônicas, como depressão, enxaqueca, epilepsia e ansiedade (SILVA et al., 2011). Assim, a ciano-carvona como um derivado de um composto natural, a carvona, apesar de ter poucos estudos acerca da sua ação farmacológica se apresenta como uma perspectiva para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos.

Portanto, se faz necessário a realização de estudos para avaliar sua toxicidade aguda, bem como para subsidiar o esclarecimento do seu mecanismo de ação sobre o SNC para uma possível utilização no tratamento clínico de doenças neurodegenerativas.

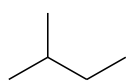
3.2 MONOTERPENOS

Entre os compostos isolados de plantas medicinais podemos destacar os monoterpenos. Estes compostos representam os principais componentes dos óleos essenciais e são produzidos em diferentes partes das plantas (OSTERHAVEN et al., 1995). As atividades biológicas de muitas ervas medicinais têm sido atribuídas aos monoterpenos (GRANGER et al., 2005), justificando a sua utilização na medicina tradicional no tratamento de ansiedade (PANOSSIAN et al., 2010), insônia (GYLLENHAAL et al., 2000) e convulsão (LINCK et al., 2009).

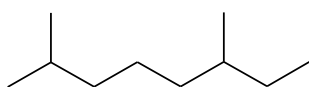
Na composição dos óleos essenciais os terpenos são os constituintes mais importantes abrangendo uma grande variedade de substâncias de origem vegetal. Suas moléculas são constituídas por unidades básicas de isopreno e normalmente contêm 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono (DEGENHARDT et al., 2009). Destes podemos destacar a importância farmacológica dos monoterpenos, uma vez que após realizar uma revisão de literatura os compostos como linalol, limoneno, α -felodreno e isopulegol demonstram efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes, antinociceptivos e antidepressivos, respectivamente (SILVA et al., 2007; PASSOS et al., 2009; LINCK et al., 2010; LIMA et al., 2011).

Os componentes dos óleos essenciais das plantas são divididos em duas classes químicas inteiramente distintas, terpenóides e fenilpropanóides, que se originam de metabolismos precursores diferentes e são gerados por rotas biossintéticas completamente distintas. Os terpenóides são preponderantes nos óleos voláteis e são originados a partir do ácido mevalônico e os fenilpropanóides, provenientes do ácido chiquímico (SANGWAN et al., 2001).

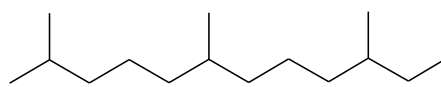
Ilustração 1: Estrutura química dos compostos: isopreno, monoterpeno e sesquiterpenos.



Isopreno



Monoterpeno

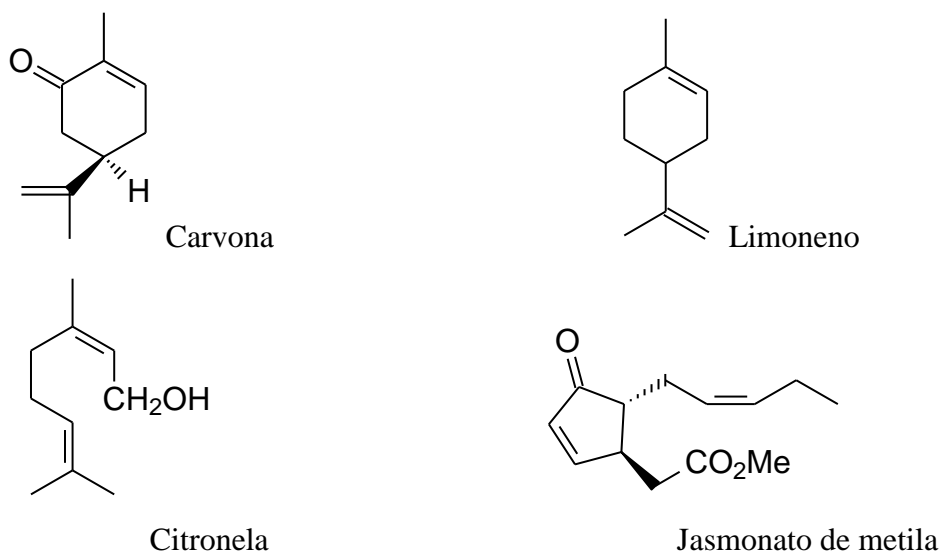


Sesquiterpenos

É bem estabelecido que os terpenóides são derivados a partir de cinco unidades de carbono, chamadas de isopreno, conforme ilustração 1. Os principais terpenos são os monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}) (BAKKALI et al., 2008).

Entre os terpenóides podemos relatar a importância farmacológica e para a indústria farmacêutica dos monoterpenos, uma vez que na literatura há diversos estudos que demonstram as ações de terpenos carbonilados sobre o SNC, como por exemplo, os terpenos do tipo cetona (carvona), aldeído (citronela), ácido carboxílico (ácido caurenóico) e éster (jasmonato de metila) que apresentam significativa atividade antinociceptiva em roedores (BLOCK et al., 1998; HERZBERG et al., 2009; MELO et al., 2010). A ilustração 2 representa as principais estruturas químicas destes monoterpenos já estudados farmacologicamente.

Ilustração 2: Estruturas químicas de monoterpenos com propriedades farmacologicamente definidas.



Os terpenos de menor massa molecular (monoterpenos) são encontrados nos óleos essenciais de diversas plantas medicinais que exercem atividade farmacológica no SNC, sendo, portanto, de extrema relevância a realização de estudos toxicológicos e farmacológicos de derivados sintéticos destes compostos naturais, para subsidiar o desenvolvimento farmacêutico de novos fitomedicamentos.

3.3 CIANO-CARVONA

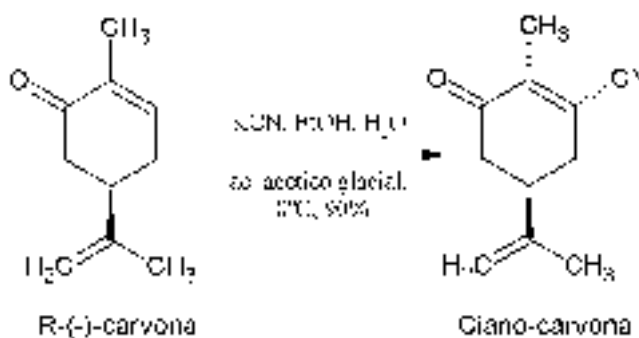
Como alternativas para produção de novos fármacos, modificações estruturais podem ser propostas, em um processo de biotransformação de compostos orgânicos para a obtenção de grande diversidade de moléculas, havendo, assim, um aumento da perspectiva de novos fitomedicamentos para o tratamento clínico de diversas doenças que acometem a saúde humana e/ou animal (CARVALHO et al., 2003)

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).

Em pesquisas realizadas em bancos de dados, como SCIENCE DIRECT, MEDLINE, SCIELO não foram encontrados nenhum estudo com a ciano-carvona (CC), derivado sintético obtido a partir do monoterpeno cetônico, carvona, um monoterpeno monocíclico que pode ser encontrado no óleo essencial de *Carum carvi* L. (IACOBELIS et al., 2005), *Kaempferia galanga* L. (JIROVETZ et al., 2001), *Lippia alba* Mill. (OLIVEIRA, 2010). Diante dessa informação é evidente a necessidade da realização do presente estudo uma vez que essa dissertação de mestrado há o propósito de investigar a toxicidade aguda, bem como os efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes deste monoterpeno sintético em modelos experimentais farmacológicos.

Para este estudo o composto ciano-carvona (Ilustração 1), foi obtido por meio de síntese a partir da substância R(-)-carvona. Sendo este monoterpeno um análogo de vários compostos monoterpênicos como o limoneno, mentol, mentona, pulegona e hidroxidihidrocarvona (UMEZU et al., 2001; SOUSA et al., 2006), que possuem atividade farmacológica sobre o SNC de roedores (UMEZU et al., 2001).

Ilustração 1- Modificação estrutural da R(-)-carvona por meio de uma cianificação para obtenção da ciano-carvona



Na literatura são relatados efeitos farmacológicos semelhantes sobre o SNC para análogos da carvona (PASSOS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010). Dentre estes análogos podemos citar a α,β -epoxy-carvona, um monoterpene originado de óleos essenciais de *Carum carvi* L. e *Kaempferia galanga* L., bem como em outras plantas medicinais e por meio de processos de síntese (ALMEIDA et al., 2008). Vários estudos demonstram efeitos diversos da α,β -epoxy-carvona (SIQUEIRA et al., 2011; ARRUDA et al., 2006). No entanto, Sousa e colaboradores (2007c) demonstraram que estes efeitos farmacológicos podem ser prioritariamente sobre o SNC. Estas informações reforçam e justificam a atual pesquisa com a ciano-carvona, uma vez que pretende-se identificar os efeitos no SNC, bem como o seu mecanismo de ação para propor seu uso terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente para a ansiedade e epilepsia.

3.4 ANSIEDADE

A ansiedade é considerada a mais comum desordem psiquiátrica afetando entre 10 a 30% da população em geral (SEO et al., 2007). Ansiedade em excesso pode ser debilitante e prejudicar a qualidade de vida do indivíduo. Transtornos de ansiedade na sociedade moderna tem uma prevalência relativamente elevada e estão se tornando um grave problema de saúde pública.

Esta patologia consiste em um estado de tensão ou apreensão constante cujas causas não são necessariamente produtoras de medo, mas sim da expectativa de alguma coisa (nem sempre ruim) que acontecerá num futuro próximo. Neste quadro patológico podemos observar reações normais até o momento em que começam a provocar sofrimento no indivíduo (LENT, 2004). Há vários tipos de ansiedade, sendo os mais comuns os distúrbios do pânico, as fobias e o transtorno do estresse pós-traumático (GARAKANI et al., 2006).

Os transtornos psiquiátricos de ansiedade caracterizam-se por sintomas cognitivos, comportamentais, somáticos e perceptivos. Podendo ser induzida por muitas alterações fisiopatológicas como endócrinas, auto-imunes, metabólicas e distúrbios neurotóxicos, bem como pelos efeitos adversos de alguns medicamentos (KESSLER et al., 2005).

A taxa de prevalência dessas doenças está aumentando em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima quase 500 milhões de pessoas no mundo sofrem de um transtorno mental ou comportamental. Esses dados justificam novas investigações orientadas para o isolamento e identificação de novos produtos com atividade no SNC, na busca de alternativas,

mais específicas, com custos menores e com maior utilização de medicamentos sintéticos obtidos a partir de compostos naturais (HERRERA-RUIZ et al., 2006).

Atualmente, os medicamentos mais amplamente prescritos para distúrbios de ansiedade são benzodiazepínicos. Entretanto, seu uso clínico é limitado por seus efeitos colaterais, como comprometimento psicomotor, potenciação de outras drogas centrais, depressão e vários sintomas de dependência (YAMADA et al., 2009). Assim como a buspirona e antidepressivos que também apresentam efeitos indesejáveis como amnésia e dependência (RAUPP et al., 2008).

O desenvolvimento de novos fitomedicamentos ansiolíticos tem sido uma área de interesse. Recentemente vários tipos de medicamentos fitoterápicos têm sido usados como ansiolíticos no mundo (REX et al., 2002). Compostos isolados de fontes vegetais também fornecem moldes estruturais para a obtenção de substâncias sintéticas e, além disso, podem ser empregados como ferramentas na identificação de mecanismos de ação (PASSOS et al., 2009).

O estudo com plantas medicinais para o tratamento de doenças psiquiátricas tem progredido significativamente nos últimos anos. Essa busca por novos agentes terapêuticos provenientes de produtos naturais remete ao aumento no número de preparações herbárias para as quais o potencial psicoterapêutico tem sido avaliado em diversos modelos animais, reforçando e justificando a realização do presente estudo (SOUSA et al., 2008).

Nessa perspectiva a ciano-carvona pode ser uma nova alternativa como fitomedicamento ansiolítico, sendo necessária a realização de estudos para elucidação do seu efeito sobre o SNC e possível atividade no tratamento de transtornos de ansiedade.

3.5 EPILEPSIA

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns que afeta pessoas de todas as idades, raças, classes sociais, nacionalidades (BOER et al., 2007) e dados recentes da Organização Mundial de Saúde relatam que a doença chega a atingir cerca de 50 milhões de pessoas no mundo e cerca de três quartos das pessoas afetadas nos países em desenvolvimento não recebem o tratamento que necessitam. Há estimativas que mais de 80% das pessoas com epilepsia vivem em países em desenvolvimento (WHO, 2005).

Esse distúrbio neurológico causa convulsões, estes ataques podem variar de muito leve, com ruptura da atenção por alguns segundos, a grave, com espasmos musculares e perda

de consciência (CRAMER et al., 2007). Segundo Freitas (2008) a epilepsia é uma doença crônica de causa diversa, caracterizada por crises repetidas justificadas por uma descarga excessiva dos neurônios cerebrais em diferentes estruturas apresentando diversas manifestações clínicas, podendo ocorrer também quando há um aumento em nível basal de excitação do SNC, superior ao limiar da convulsão.

Na década de 90 houve um aumento significativo na regulamentação de drogas anticonvulsivantes, o clobazam® e a vigabatrina são as drogas padrão no tratamento de epilepsia e muitos ensaios com novas drogas estão em andamento (KARCESKI et al., 2005). A possibilidade de novos tratamentos promete uma melhor qualidade de vida para muitas pessoas com epilepsia. Dessa forma, medicamentos que aumentam a adesão do paciente e diminuem a tolerabilidade são promissores no tratamento da epilepsia.

Houve um aumento na busca por novos agentes terapêuticos utilizando plantas medicinais aromáticas para o tratamento de distúrbios psiquiátricos (CAMPELO et al., 2011), por isso estudos com fitoterápicos estão sendo bastante reconhecidos como uma perspectiva no tratamentos de doenças neurodegenerativas.

Beyenburg e colaboradores (2005) mostraram que há uma relação entre epilepsia e outros transtornos do SNC, como depressão e ansiedade, chegando a uma taxa de 50 a 60% dos pacientes com essas apresentações (McCAGH et al., 2009). Assim, medicamentos que tratam esses transtornos psicossociais como a ciano-carvona se mostram como ótima alternativa para melhorar o tratamento dessa doença.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N.; SOUSA, D.P.; FARIAS, F.F.N.; CLAUDINO, F.S.; ARAÚJO, D.A.M.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Anticonvulsant effect of a natural compound α,β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neuroscience Letters**, v. 443, p. 51–55, 2008.
- ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUSA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA, J.M.; CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BEYENBURG, S.; MITCHELL, A.J.; SCHMIDT, D.; ELGER, C.E.; REUBER, M. Anxiety in patients with epilepsy: Systematic review and suggestions for clinical management. **Epilepsy & Behavior**, v. 7, p. 161-171, 2005.
- BLOCK, L.C.; SANTOS, A.R.S.; SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONACHE F.D.; FILHO, V.C. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85–89, 1998.
- BOER, H.M.; MULA, M.; SANDER, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 12, p. 540-546, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aspectos técnicos, dúvidas e exigências mais frequentes nas análises técnicas dos processos de registro de medicamentos específicos e fitoterápicos**. 1º Seminário de Orientação ao Setor Regulado na Área de Medicamentos. Brasília, DF, 2006.
- BUCHBAUER, G.; JAGER, W.; GRUBER, A.; DIETRICH, H. R-(+)- and S-(–)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 686–689, 2005.
- CAMPELO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOME, A.R.; FREITAS, R.M. Evaluation of neuroprotective potential of *C. limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 116-126, 2011.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. INTRODUÇÃO A MODELAGEM MOLECULAR DE FÁRMACOS NO CURSO EXPERIMENTAL DE QUÍMICA. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

- CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, p. 413-422, 2006.
- COSTA, V.V.; ROCHA, K.A.S; SOUSA, L.F.; ROBLES-DUTENHEFNER, P.A.; GUSEVSKAYA, E.V. Isomerization of α -pinene oxide over cerium and tin catalysts: Selectiv synthesis of trans-carveol and trans-sobrerol. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 345, p. 69-74, 2011.
- CRAMER, J.A.; GORDON, J.; SCHACHTER, S.; DEVINSKY, O. Women with epilepsy: Hormonal issues from menarche through menopause. **Epilepsy & Behavior**, v. 11, p. 160–178, 2007.
- DEGENHARD, J.; KÖLLNER, T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-1637, 2009.
- DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. 3^a Edition. **Englan: John Wiley & Sons**. 2009.
- DUARTE, M.C.T. **Construindo a história dos produtos naturais**. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil, v. 7, 2006.
- FREITAS, R.M. Alterações comportamentais e neuroquímicas durante a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 60-70, 2008.
- FREITAS, R.M. Vigabatrina aumenta atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após crises convulsivas induzidas por pilocarpina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 1, p. 36-40, 2010.
- GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145-148, 2002.

- GARAKANI, A.M.D.; MATHEUS, S.J.M.D.; CHARNEY, D.S.M.D. Neurobiology of Anxiety. Disorders and Implications for treatment. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 73, p. 941-949, 2006.
- GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A.M.H.; ARAÚJO, A.E.V.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 108-112, 2010.
- GRANGER, R.E.; CAMPBELL, E.L.; JOHNSTON, G.A.R. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1101-1111, 2005.
- GYLLENHALL, C.; MERRITT, S.L.; PETERSON, S.D.; BLOCK, K.I.; GOCHENOUR, T. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. **Sleep Medicine Reviews**, v. 4, p. 229-251, 2000.
- HERRERA-RUIZ, M.; JIMENEZ-FERRER, J.E.; LIMA, T.C.M.; AVILES-MONTES, D.; PEREZ-GARCIA, D.; Gonzalez-Cortazar, M.; TORTORIELLO, J. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 23-28, 2006.
- HERZBERG, M.; BORENTSHTAIN, R.; SZILAGYI, C. Jasmonate derivatives for analgesia. (Sepal Pharma SA, Fr.). **Patent Cooperation Treaty**. 59 p, 2009.
- IACOBELLIS, N.S.; CANTORE, P.L.; CAPASSO F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.
- JIROVETZ L.; BUCHBAUER, G; SHAFI, P.M.; ABRAHAM, G.T. Analysis of the essential oil of the roots of the medicinal plant *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) from South-India. **Acta Pharmaceutica Turcica**, v.43, p.107-110, 2001.
- KARCESKI, S.; MORRELL, M. J.; CARPENTER, D. Treatment of epilepsy in adults: expert opinion. **Epilepsy & Behavior**, v. 7, p. S1-S64, 2005.

- KESSLER, R.C.; BRANDENBURG, N.; LANE, M.; ROY-BYRNE, P.; STANG, P.D.; STEIN, D.J.; WITTCHEN, H.U. Rethinking the duration requirement for generalized anxiety disorder: evidence from the National Comorbidity Survey Replication. **Psychological Medicine**, v. 35, p. 1073-1082, 2005.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos Fundamentais de Neurociências**. Editora Atheneu, p. 651-668, 2004.
- LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.R.S.; CARVALHO, F.A.A.; MIÚRA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandren in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 283-292, 2011.
- LINCK, V.M.; SILVA, A.L.; FIGUEIRO, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.; BIRCK, F.D.; CARAMÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.H.; ELISABETSK, E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 303–307, 2009.
- LINCK, V.M.; SILVA, A.L.; FIGUEIRO, A.L.M.; CARAMÃO, E.B.; MORENO, P.R.H.; ELISABETSK, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, p. 679-683, 2010.
- MARIZ, S.R.; ARAÚJO, M.S.T.; CERQUEIRA, G.S.; ARAÚJO, W.C.; DUARTE, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 213-216, 2008.
- MATOS, F.A. Proposta de validação farmacognóstica de drogas vegetais, plantas medicinais e fitoterápicas. **Infarma**, Brasília, v. 3, p. 9-14, 1994.
- MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2^a ed. **Fortaleza: Imprensa Universitária – UFC**, 2000.

- MCCAGH, J.; FISK, J.E.; BAKER, G.A. Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. **Epilepsy Research**, v. 86, p. 1-14, 2009.
- MELO, M.S.; SENA, L.C.S.; BARRETO, F.J.N.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MELO, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. Antinociceptive Effect of Citronellal in Mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 411-416, 2010.
- MORA, S.; DIAZ-VELIZ, G.; MILLÁN, R.; LUNGENSTRASS, H. QUIROS, 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, p. 373 -378, 2005.
- OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J. S-Carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 23-31, 1995.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M.V.M.; VALADARES, M.C.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; CUNHA, L.C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos Rodrigo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.
- OLIVEIRA, G.I.S.; MOMENTÉ, V.G.; NASCIMENTO, I.R.; BARRETO, H.G.; SILVA, R.R.; TAVARES, I.B. Efeito da adubação orgânica sobre a biomassa da parte aérea de quimiotipos de erva cidreira. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n. 2, p. 154-160, 2010.
- PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; SARRIS, J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. **Phytomedicine**, v. 17, p. 481-493, 2010.

- PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; RATES, S.M.K.; POSER, G.L.V. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.
- RAUPP, I.M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI, E.L.; SILVA, TREBIEND, H.A.; MIGUEL, O.G.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 295-299, 2008.
- REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test - a comparison with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 855-860, 2002.
- RUSCIO, A.M.; CHIU, W.T.; ROY-BYRNE, P.; STANG, P.E.; STEIN, D.J.; WITTCHEN, H.U.; KESSLER, R.C. Broadening the definition of generalized anxiety disorder: Effects on prevalence and associations with other disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 21, p. 662-676, 2007.
- SANGWAN, N.S.; FAROOQI A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.
- SANTOS, F.A., JEFERSON, F.A.; SANTOS, C.C.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- SEO, J.J.; LEE, S.H.; LEE, Y.S.; KWON, B.M.; YUAN MAD, B.Y.H.; HONG, J.T.; OH, K.W. Anxiolytic-like effects of obovatol isolated from *Magnolia obovata* Involvement of GABA/benzodiazepine receptors complex. **Progress. Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1363-1369, 2007.

- SILVA, M.I.G.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA, P.F.; MOURA, B.A.; AMARAL, J.F.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 141-147, 2007.
- SILVA, F.O.; SILVA, M.G.V.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, p. 255-259, 2011.
- SIQUEIRA, B.P.J.; MENEZES, C.T.; SILVA, J.P.; SOUSA, D.P.; BATISTA, J.S. Antiulcer effect of epoxy-carvone. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 144-149, 2011.
- SOUSA, O.V.; SOARES-JÚNIOR, D.T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R.G.; GATTAS, C.R.; KAPLAN, M.A.C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14, p. 11-14, 2004.
- SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.
- SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of alfa-Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007a.
- SOUSA, D.P.; JUNIOR, E.V.M.; OLIVEIRA, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; NUNES, X.P.; BARBOSA-FILHO, J.M. Antinociceptive Activity of Structural Analogues of Rotundifolone: Structure-Activity Relationship. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 39-42, 2007b.
- 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. 2, p. 170-175, 2007c.

- SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the Chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the Central Nervous System: A Comparative Study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007d.
- SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA, J.M.B.F.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 42-654, 2008.
- SOUSA, F.C.F.; SILVA, M.I.G.; SILVA, M.A.G.; DE AQUINO, M.R.N.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, H.L.; DE LAVOR, E.P.H.; DE VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.
- UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promotion effect of peppermint oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 69, p. 383-390, 2001.
- VIANA, G.S.D.; VALE, T.G.; SILVA, C.M.M.; MATOS, F.J.D. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.
- WONDIMU, T.; ASFAW, Z.; KELBESSA, E. Ethnobotanical study of medicinal plants around 'Dheeraa' town, Arsi Zone, Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 152-161, 2007.
- YAMADA, T.; YAMADA, Y.; OKANO, Y.; TERASHIMA, T.; YOKOGOSH, H. Anxiolytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 948-955, 2009.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. The use of natural products as sources of new analgesic drugs. Atta-ur-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 191-212, 2005.

CAPÍTULO I: Atividade antioxidante in vitro da ciano-carvona

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

Atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona

COSTA, DA ¹; OLIVEIRA, GAL ¹; SOUSA, DP ²; FREITAS, RM ¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPI. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

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

RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona (CC) contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico. Após a análise dos resultados foi observado que a ciano-carvona nas concentrações testadas, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por 2'2'-azobis-2-amidinoproprano (AAPH), inibindo a quantidade de TBARS formado. 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 a ciano-carvona pode exercer um efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica *in vivo*. A ciano-carvona também produziu uma remoção do radical hidroxila podendo ser devido a uma atividade antioxidante, sugerindo uma possível capacidade de proteção contra danos celulares *in vivo* produzidos por este radical. O Trolox, droga usada como padrão, também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Na avaliação de produção de óxido nítrico, houve uma diminuição significativa na produção deste composto pela ciano-carvona, demonstrando uma propriedade antioxidante *in vitro*, que pode ser explorada para a proteção *in vivo* das biomoléculas, como lipídios da membrana celular, contra danos causados pelos radicais livres. A CC apresentou um forte potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxilas e do óxido nítrico, bem como preveniu a formação de TBARS. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar melhor as propriedades antioxidantes da ciano-carvona.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante, Ciano-carvona, Óxido Nítrico, Peroxidação lipídica, Radical Hidroxila.

ABSTRACT: Evaluation of antioxidant activity *in vitro* of the cyano-carvone: a natural compound

This study evaluated the *in vitro* antioxidant activity of cyano-carvone (CC) against the formation of reactive species with thiobarbituric acid (TBARS), hydroxyl radical and nitric oxide production. After analysis of the results was observed that the cyano-carvone in concentrations was able to prevent lipid peroxidation induced by AAPH, inhibiting amount of TBARS formed. Similar results were obtained with Trolox, a synthetic analogue of the hydrophilic α -tocopherol, which is widely used as antioxidant standard. This result suggests that the cyano-carvone can exert an antioxidant effect against lipid peroxidation *in vivo*. The cyano-carvone also produced a removal of the hydroxyl radical may be due to an antioxidant activity, suggesting a potential ability to protect against cell damage *in vivo* produced by this radical. The Trolox, a drug used as standard, also significantly reduced the amount of this radical. In the evaluation of nitric oxide production, a significant reduction in the production of this compound by CC, showing an antioxidant property *in vitro*, that can be investigated *in vivo* to protect the biomolecules such as lipids of cell membrane against the damage caused by radicals. The CC had a strong antioxidant potential *in vitro*, and by removal capacity of from hydroxyl radicals and nitric oxide, and prevented the formation of TBARS. However, more studies are needed to better characterize the antioxidant properties of cyano-carvone.

KEYWORDS: Antioxidant, Cyano-carvone, Nitric oxide, Lipidic peroxidation, Hydroxyl radical.

INTRODUÇÃO

Radical livre é todo átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1991), e é constantemente formado em processos biológicos e pode ser removido por defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem atuar como defesas biologicamente importantes contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Durante a redução do oxigênio molecular as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) podem ser formadas, bem como podem ser produzidos radicais livres derivados do nitrogênio (ERNS) (ANDERSON; PHILLIPS, 1999).

Estas espécies reativas estão envolvidas em muitas doenças, incluindo aterosclerose (XI et al., 2007), distúrbios do trato respiratório (RICCIARDOLO et al., 2006), doenças neurodegenerativas (REED, 2011), doença inflamatória intestinal (RAHMAN et al., 1992), neoplasias (VALENÇA; PORTO, 2008) e também no processo fisiológico do envelhecimento (CADENAS; DAVIES, 2000).

Agentes antioxidantes podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos nos tecidos humanos produzidos por EROS e ERNS. Dessa forma, pode ser definido como um grupo diverso de moléculas naturais, que podem estar presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas com ação antioxidante (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

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, podemos citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), juntamente com catalase e glutathione peroxidase que promovem a desintoxicação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente (WICKENS, 2001).

O desenvolvimento de novos fármacos com ação antioxidante tem sido um importante objeto de estudo, uma vez que a terapêutica farmacológica atual para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington e alguns tipos de neoplasias pode ser realizada devido às propriedades antioxidantes de muitos compostos naturais e/ou sintéticos (REED, 2011). Além disso, compostos com ação antioxidante podem retardar o envelhecimento. Dessa forma, a busca por novos agentes antioxidantes é extremamente necessária e atualmente é objeto de interesse em novas pesquisas pela indústria farmacêutica.

Diversos estudos demonstram atividade antioxidante dos monoterpenos α -terpineol (BICAS et al., 2011), α -tujona, (MOTHANA et al., 2011), 1,8-cineol, α -pineno (WANNES et al., 2010) e γ -terpineno (RUBERTO; BARATTA, 2000). Neste sentido, vários compostos de origem vegetal encontrados em abundância na natureza têm sido estudados, entre eles os monoterpenos.

Entre os monoterpenos, podemos destacar a carvona de ocorrência natural na forma dos enantiômeros (+)- e (-)-carvona. A carvona (*p-mentha-6,8-dien-2-ona*) é um monoterpeno cetônico encontrado como o principal componente ativo de diversos óleos essenciais de plantas medicinais, como hortelã (*Mentha spicata* L.), aneto (*Anethum graveolens* L.), cominho (*Carum carvi* L.) e capim-cidreira (*Lippia alba* Mill.) (GONÇALVES et al., 2010). A partir de um processo de destilação e uma modificação estrutural da carvona por meio de uma cianificação podemos obter a ciano-carvona (Ilustração 1) (SOUSA et al., 2010). Após revisão da literatura verificamos que este monoterpeno ainda não foi avaliado quanto ao seu potencial antioxidante *in vitro*.

Diante disto, este estudo teve como objetivo inicial caracterizar a atividade antioxidante da ciano-carvona em metodologias *in vitro* e posteriormente propor seu mecanismo de ação por meio das reações químicas envolvidas nas reações do composto ciano-carvona com os radicais L \cdot (radical lipídico) durante a peroxidação lipídica, bem como com o radical NO $_2\cdot$ (nitrito) durante a decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio. E com o radical HO \cdot (radical hidroxila) durante a decomposição da 2-desoxirribose.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da ciano-carvona

Para preparar o composto avaliado no presente estudo foi realizada uma primeira etapa com adição de cianeto em meio aquoso a R-(-)-carvona a 0 °C, sendo em seguida acrescentado ácido acético à mistura conforme descrito na ilustração 1. A partir desta reação foi obtido o composto (cetronitrila ou ciano carvona) com 90% de rendimento. Esta reação ocorreu por meio da adição de 1,4 do ânion cianeto, que é termodinamicamente mais favorável e irreversível, contudo mais lenta que a adição 1,2.

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto ciano-carvona (1S, 2S, 5R)-5-isopropenil-2-metil-3-oxo ciclohexanocarbonitrila estão descritos na Tabela 1.

Avaliação dos efeitos da ciano-carvona *in vitro* contra a produção do radical 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 diferentes concentrações 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 dos efeitos da ciano-carvona *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* da ciano-carvona contra a produção 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, por meio da sua condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciados pela adição de Fe²⁺ (FeSO₄) com concentração final 6 mM para soluções contendo 2-desoxirribose 5 mM, H₂O₂ 100 mM e tampão fosfato 20 mM (pH 7,2). Para determinar a atividade antioxidante *in vitro* da CC contra a formação do radical hidroxila, diferentes concentrações da CC foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe²⁺. 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 Fe²⁺ e H₂O₂.

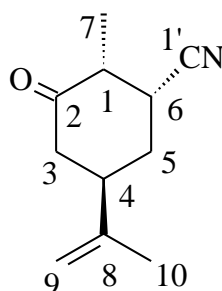
Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto ciano-carvona estão de acordo com os descritos por Verstegen-Haaksma e colaboradores (1994) (**Tabela 1**).

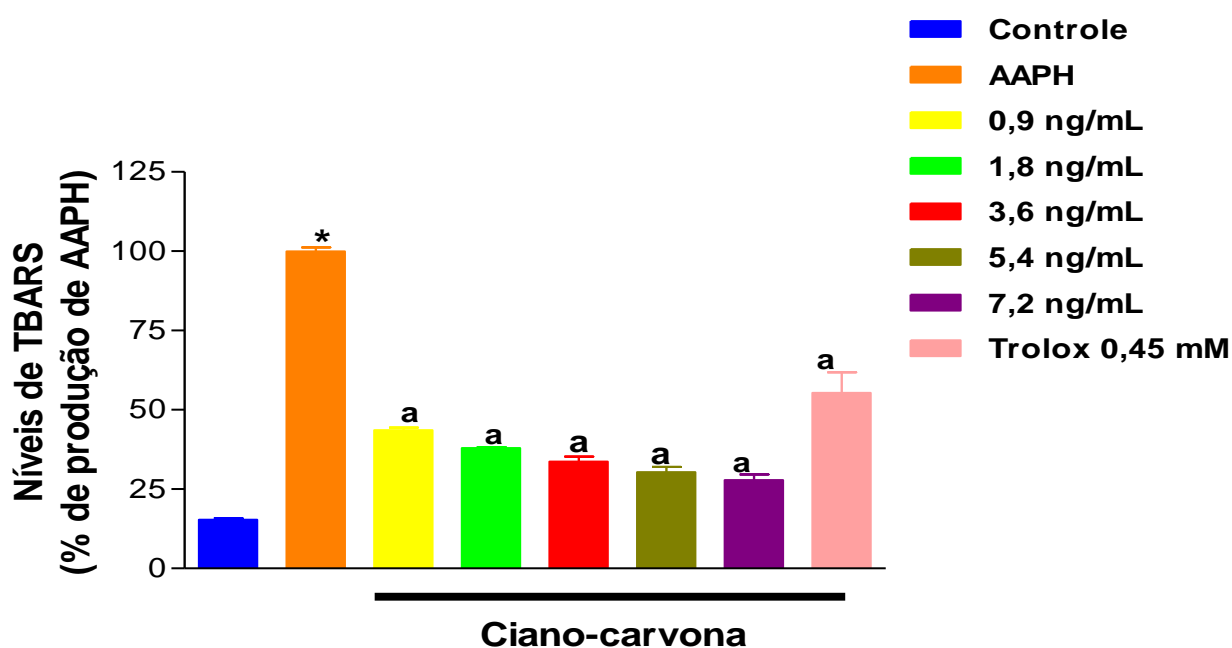
Tabela 1: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto ciano-carvona (1S, 2S, 5R)-5 isopropenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila.



N ^o	RMN ¹³ C-DEPT (50 MHz-CDCl ₃)	RMN ¹ H (200 MHz-CDCl ₃)
	δ	δ
1	44,9	2,65-2,55 (m, 1H)
2	206,7	
3	45,8	2,63 (dd, J = 2,1; 6,6 Hz, 1H); 2,33-2,29 (m, 1H)
4	35,6	2,78 (tt, J = 3,8 Hz; 12,6 Hz, 1H)
5	32,8	2,26-2,22 (m, 1H) 2,04-1,97 (m, 1H)
6	42,2	3,38-3,32 (m, 1H)
7	12,5	1,20-1,30 (m, 3H)
8	145,5	
9	111,1	4,83 (d, J = 12,4 Hz, 2H)
10	20,4	1,77 (s, 3H)
1'	118,6	

A peroxidação lipídica foi analisada pelo método de quantificação do TBARS, que é um ensaio que utilizado extensivamente para estimar a peroxidação dos lípidos 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 ng/mL) a ciano-carvona causou uma diminuição significativa na produção de TBARS em relação ao grupo AAPH, com inibição de 56; 62; 66; 69,6 e 72,1%, respectivamente. O Trolox (droga padrão) também reduziu o parâmetro observado, apresentando 47,7% de inibição (**Ilustração 2**).

Ilustração 2: Avaliação dos efeitos de ciano-carvona contra a formação de TBARS *in vitro*.

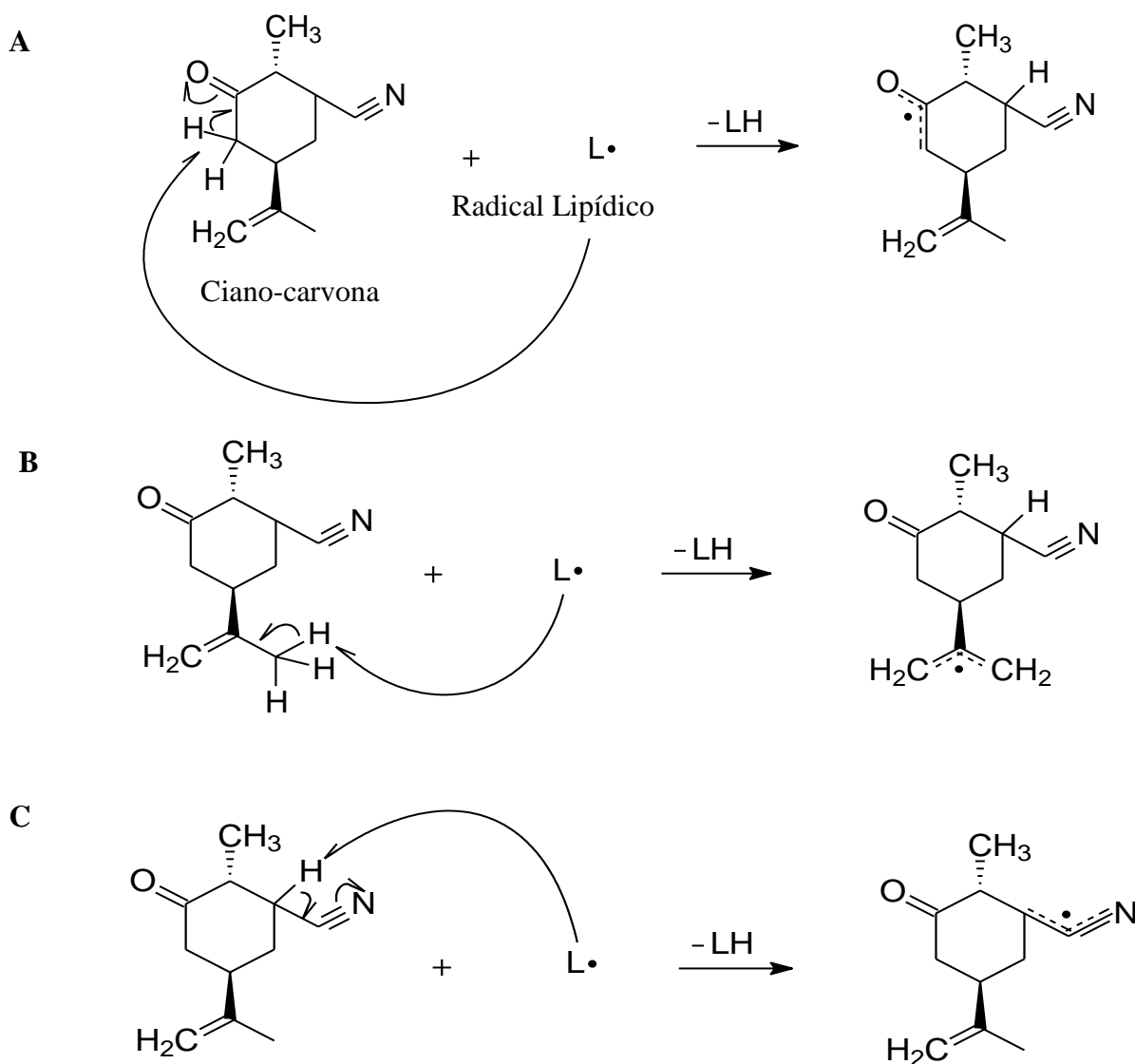


Lipídeos extraídos da gema do ovo submetido a danos oxidativos por incubação com AAPH e a capacidade de diferentes concentrações de ciano-carvona para prevenir a formação de TBARS foi analisado. Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); Grupo AAPH é considerado 100% de dano oxidativo. Valores representam média \pm E.P.M, n= 5, experimentos em duplicata. ^ap<0.001 versus AAPH; *p<0.001 versus controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A ciano-carvona diminuiu os níveis de peroxidação lipídica *in vitro* e promoveu a inibição de 50% da produção das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com um valor de CI₅₀ de aproximadamente de 0,66 ng/mL variando de 0,35 a 1,24 ng/mL com intervalo de confiança de 95%.

A quantificação de TBARS mostrou que a CC exerceu um efeito antioxidante significativo contra os radicais peróxil gerados pelo AAPH, protegendo os lipídios da oxidação em todas as concentrações (**Ilustração 2**). Trolox (300 μM), um análogo sintético da vitamina E, que protege as membranas do dano oxidativo *in vivo*, foi usado como padrão antioxidante de referência. Como base nesses resultados, elaboramos a proposta de três possíveis mecanismos da ação antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica conforme descritos nas etapas A, B e C da ilustração 3.

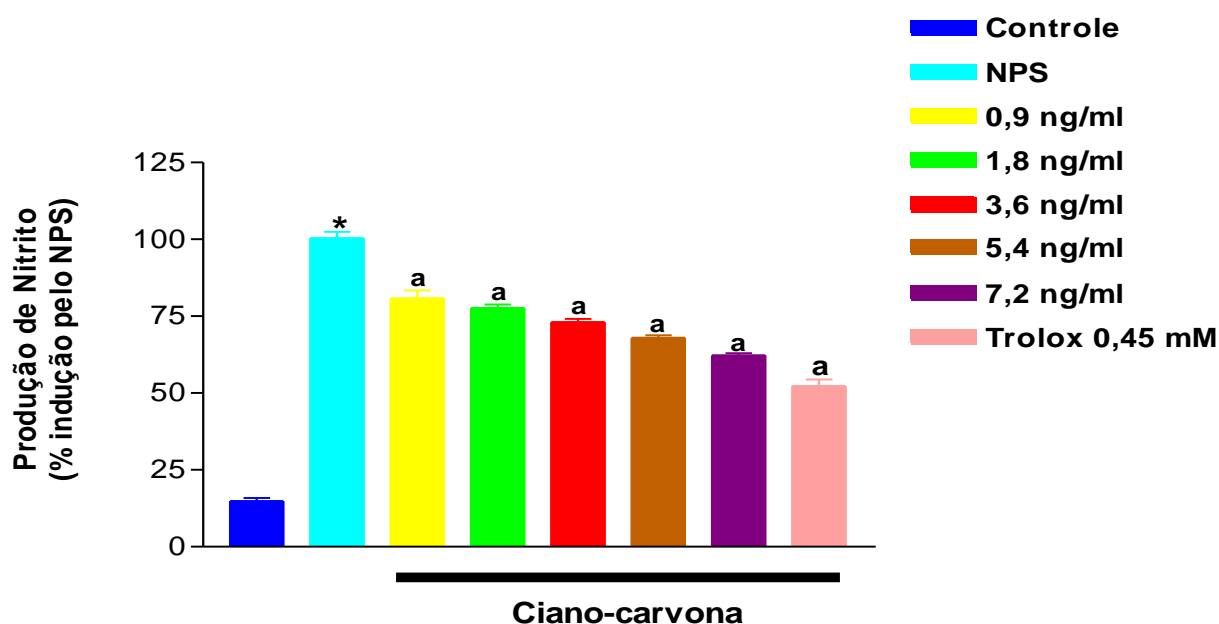
Ilustração 3: Proposta dos possíveis mecanismos da ação antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica.



A avaliação da ciano-carvona como substância sequestradora de NO também foi testada pela sua capacidade de remoção do radical nitrito pelo método de Griess. Os resultados apresentados na ilustração 4 demonstram que a CC, nas concentrações testadas de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 ng/mL foram capazes de remover o conteúdo de nitrito formado de maneira significativa de 19,6; 22,6; 26,9; 32,3 e 32,1% de inibição, em relação ao grupo NPS, respectivamente. O trolox produziu uma diminuição significativa de 47,96% (**Ilustração 4**).

CI₅₀ expressa à concentração da ciano-carvona (ng/mL) que remove 50% do radical livre formado. Para a inibição de 50% contra a formação do radical nitrito foi encontrado um valor de aproximadamente 0,13 ng/mL para a CI₅₀ variando de 0,07 a 0,24 ng/mL com intervalo de confiança de 95%.

Ilustração 4: Atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical nitrito (NO₂⁻).



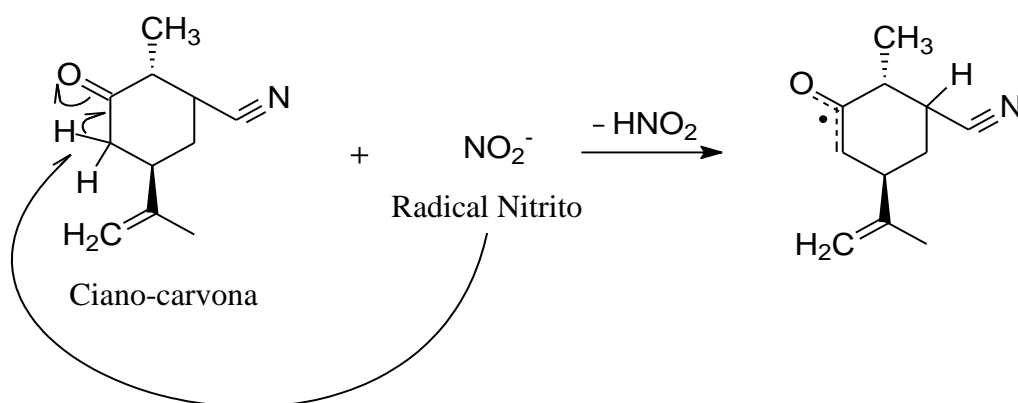
O Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) na ausência de uma fonte geradora de NO (sem NPS); Grupo NPS, reflete a produção de nitrito por meio da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) considerada 100% da produção de NO. O efeito de diferentes concentrações de ciano-carvona contra NPS foi determinada pelo método de Griess. Valores representam média \pm E.P.M, n= 5, experimentos em duplicata. ^ap<0,001 *versus* NPS (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); *p<0.001 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Após análise do potencial antioxidante *in vitro* da CC contra diferentes espécies reativas derivadas do nitrogênio, foram propostos três possíveis mecanismos de ação

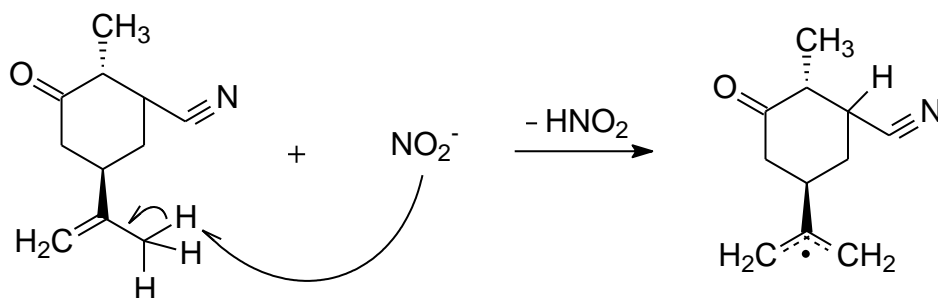
antioxidante contra o nitrito e outras espécies reativas geradas pela sua decomposição espontânea do NO (**Ilustração 5**).

Ilustração 5: Propostas dos possíveis mecanismos de ação antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical nitrito (NO_2^\cdot).

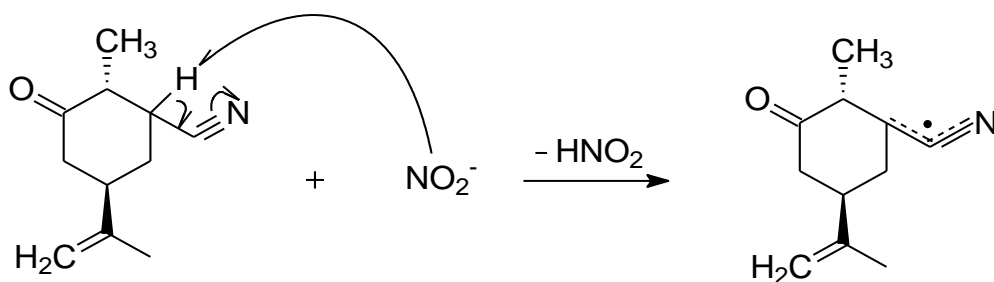
A



B



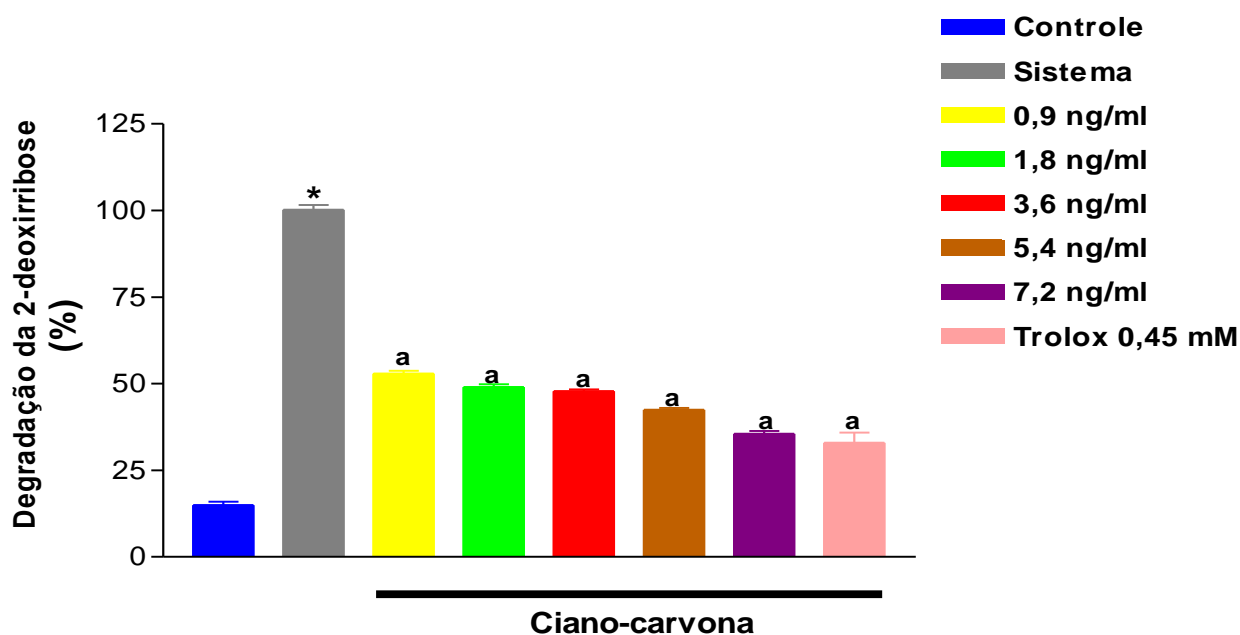
C



A Ilustração 6 demonstra a atividade antioxidante da ciano-carvona contra a formação de radicais hidroxila (OH^\cdot). Nas concentrações testadas, a ciano-carvona foi capaz de remover o radical OH^\cdot de maneira significativa em 47,2, 51,1, 52,2, 57,6 e 64,6%, quando comparado ao sistema reacional nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 ng/mL, respectivamente. Da

mesma forma, o Trolox usado como controle positivo na concentração de 0,45 mM inibiu a produção do radical hidroxila em 67,1% ($p < 0,05$), quando comparado ao meio reacional (**Ilustração 6**).

Ilustração 6: Avaliação da atividade antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila.

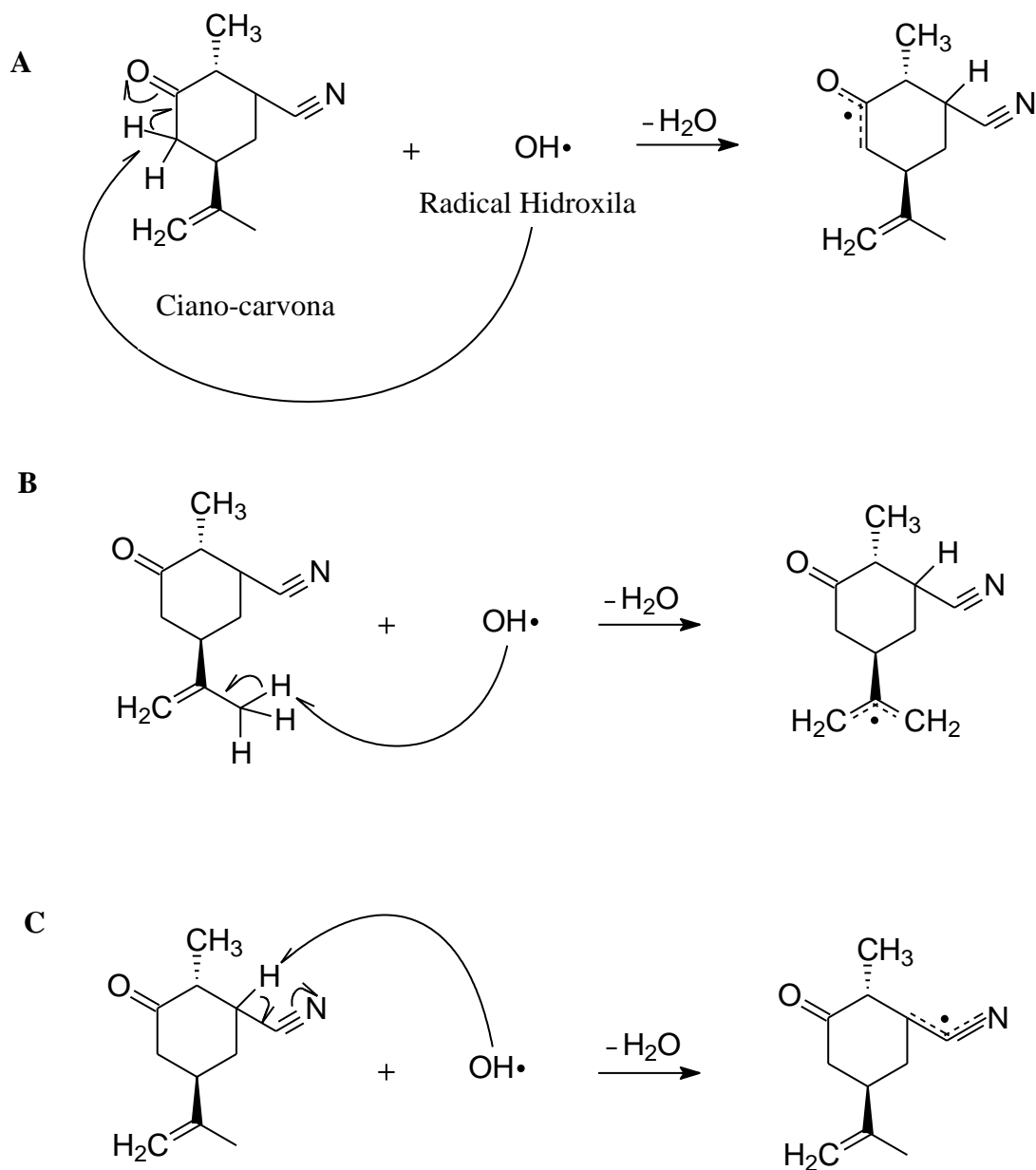


Atividade de ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila foi quantificada usando degradação oxidativa da 2-desoxirribose *in vitro*, que produz malonaldeído (MDA) por condensação com 2-ácido tiobarbitúrico (TBA). O sistema de produção de MDA foi gerado pela degradação da 2-desoxirribose na presença do FeSO_4 e H_2O_2 . Outros grupos denotam produção MDA pelo meio reacional na presença de diferentes concentrações de ciano-carvona (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 ng/mL). Valores representam a média \pm E.P.M., $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ versus sistema reacional (ANOVA seguido do *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). * $p < 0,001$ versus controle (ANOVA seguido do *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O poder antioxidante da ciano-carvona pode ser devido à presença de sítios susceptíveis, podendo ocorrer variações quanto à intensidade da atividade antioxidante em função da capacidade dessas estruturas. Assim, a principal característica de um antioxidante é a sua capacidade para interceptar radicais livres.

A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila foi determinada como aproximadamente 0,20 ng/mL variando de 0,11 a 0,36 com intervalo de confiança de 95%.

Ilustração 7: Proposta do possível mecanismo de ação da atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila.



A alta reatividade da ciano-carvona deve-se a presença de três sítios susceptíveis de ataque via radical contra a formação de radicais livres. Dentre essas características relacionadas a essa reatividade há o grupamento da ligação H α ao grupo carbonila, ao H na posição alílica, como possivelmente o H α grupo C \equiv N gerando intermediários de grande estabilidade. Comparativamente com o composto carvona pode ser verificada a presença de

apenas dois sítios ativos, justificando sua maior reatividade conforme descrito nos possíveis mecanismos de ação contra a formação dos radicais lipídicos, nitrito e hidroxila *in vitro*.

DISCUSSÃO

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, não possuindo papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nesses processos (SOUSA et al., 2007; ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007). 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 (EL-HABIT et al., 2000).

A concentração efetiva para inibição de 50% (CI_{50}) contra a formação dos radicais livres sendo portanto, a concentração da amostra que proporciona uma inibição de 50% da formação dos radicais foi calculado a partir do gráfico de percentagem de inibição (% I) em relação à concentração da amostra. Em relação aos valores de CI_{50} , todas as concentrações e os controles devem esgotar as concentrações dos radicais livres em 50% dentro de 1 h. Quanto menor o valor CI_{50} representar, esta terá uma maior atividade antioxidante da amostra (AHMADI et al., 2010). Os resultados contribuem para ampliar o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes da ciano-carvona, uma vez que ainda não foram descritos anteriormente na literatura os valores de CI_{50} para os radicais hidroxila, nitrito e TBARS deste monoterpeno.

A peroxidação lipídica pode ser definida como os danos biológicos causados por radicais livres que são formados durante estresse oxidativo (ZIN et al., 2002). Vários extratos de plantas medicinais têm demonstrado efeito inibitório contra a peroxidação lipídica conforme verificado pelo método de produção de TBARS *in vitro*. Os fosfolipídios de membrana estão continuamente sujeitos a processos pró- e oxidantes.

Durante o processo oxidativo ocorre a doação de um átomo de hidrogênio a partir de uma cadeia de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios da membrana iniciando o processo de peroxidação lipídica, que por sua vez se propaga como uma reação em cadeia. Neste processo são gerados peróxidos lipídicos e finalmente peróxidos cíclicos, que em última

análise são fragmentados de aldeídos combinados como malonildialdeído (SREELATHA; PADMA, 2009).

A ciano-carvona 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 a ciano-carvona pode exercer uma proteção antioxidante em biomoléculas, como fosfolípidos, triacilgliceróis e ácidos graxos poliinsaturados *in vivo*, os quais são lípideos essenciais para a função da membrana celular e sinalização parácrina.

Os danos causados por radicais livres são formados após a indução do estresse oxidativo em sistemas biológicos (ZIN et al., 2002). Esse efeito biológico pode ser verificado durante a peroxidação lipídica. Este último processo precisa ser evitado ou suprimido pelas atividades antioxidantes disponíveis no organismo por meio de substâncias naturais ou sintéticas exógenas e/ou de substâncias endógenas enzimáticas ou não enzimáticas produzidas pelo organismo humano para evitar a lesão de membranas de órgãos.

Neste estudo foi observado que a ciano-carvona utilizando os métodos *in vitro* propostos, foi capaz de reduzir a produção de radicais livres conforme observado pelo efeito da CC nas concentrações testadas contra a peroxidação lipídica induzida por AAPH *in vitro* inibindo a quantidade de TBARS formado (GUIMARÃES et al., 2010). 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 a CC pode exercer um efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica, uma vez que demonstrou resultados semelhantes aos observados com o carvacrol durante a peroxidação lipídica induzida por AAPH (GUIMARÃES et al., 2010).

Na avaliação de produção de nitrito, houve uma diminuição significativa na produção de nitrito pela ciano-carvona, demonstrando uma propriedade antioxidante, protegendo as biomoléculas, como lípidios da membrana celular contra danos causados pelos radicais livres derivados do nitrogênio. Comparativamente a outros estudos nossos resultados quanto à capacidade de remover *in vitro* o radical nitrito se mostram melhores que os estudos com o linalol (PEANA et al., 2006) e a *Morinda citrifolia* Linn (SERAFINI et al., 2011), sugerindo que o composto avaliado apresenta um efeito melhor contra a formação de ERNS.

O NO é uma molécula sinalizadora envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive na sinalização da dor e inflamação (SOUSA; PRADO, 2001; KAWANO et al., 2009). O óxido nítrico desempenha um papel importante em vários tipos de processos inflamatórios. É produzido por macrófagos no decurso da resposta inflamatória. Também pode ser mutagênico e interferir com os processos de reparo do DNA (OKOKO,

2009). Além disso, acredita-se que 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 naturais seguros e eficazes.

Neste estudo, foi investigado os efeitos antioxidantes de um composto sintético de origem natural derivado da R-(-)-carvona que ainda não havia estudo *in vitro* quanto aos efeitos antioxidantes. Os experimentos demonstraram o efeito inibitório da ciano-carvona sobre a produção do óxido nítrico. Para determinar a capacidade antioxidante da ciano-carvona como um removedor de espécies reativas derivadas do nitrogênio, foi avaliada a atividade de remoção contra o óxido nítrico após incubação deste monoterpene com o nitroprussiato de sódio, um indutor químico da produção de óxido nítrico e consequentemente medido pela sua biotransformação em nitrito pelo método de Griess.

Além dos efeitos antioxidantes contra TBARS e nitrito, também foi visto que a ciano-carvona apresenta uma significativa atividade na remoção do radical hidroxila presente no meio reacional, sugerindo que este efeito pode ser devido a uma atividade antioxidante. Desta forma nossos dados sugerem uma possível capacidade de proteção celular contra danos em biomoléculas proteicas *in vivo* que precisa ainda ser melhor investigada. O Trolox (droga padrão) também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Nossos resultados quanto à capacidade de remover *in vitro* o radical hidroxila são semelhantes aos estudos observados com ácido tânico, um polifenol com comprovada atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (LOPES et al., 1999).

Este radical hidroxila é uma espécie extremamente reativa formada em sistemas biológicos e tem sido implicada como uma espécie altamente prejudicial dos radicais livres em várias patologias. Este radical tem a capacidade de induzir mutações nos nucleotídeos presentes no DNA, bem como de causar a ruptura dos resíduos de aminoácidos em proteínas, o que pode contribuir para a carcinogênese, mutagênese e citotoxicidade (HOCHSTEIN, 1998; MANIAN et al., 2008; SHUKLA et al, 2009).

Desta forma, a capacidade de remoção contra o radical hidroxila de um extrato de uma planta medicinal pode estar diretamente relacionada à sua atividade antioxidante. O radical hidroxila é altamente reativo e pode causar dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas (SHUKLA et al, 2009). Neste estudo foi verificado que a ciano-carvona reduziu a oxidação da 2-desoxirribose em todas as concentrações. Este monoterpene foi altamente eficaz na inibição dos danos oxidativos produzidos pelo radical hidroxila. Todas as concentrações testadas exibiram uma atividade antioxidante significativa, que foi semelhante ao Trolox, um análogo sintético do α -tocoferol utilizado como um antioxidante padrão.

Estudos anteriores com a R-(-)-carvona (GONÇALVES et al., 2010; BICAS et al., 2011) demonstram que este monoterpene precursor da ciano-carvona induz a expressão da enzima desintoxicante glutathione S-transferase, que tem uma ação quimiopreventiva, uma vez que a atividade anticarcinogênica de compostos naturais pode estar correlacionada com a expressão aumentada destas enzimas. No entanto, ainda não verificados efeitos da ciano-carvona nesta enzima, bem como ainda é necessário avaliar em novos estudos se a expressão aumentada desta enzima é causa ou consequência da atividade antioxidante observada.

A importância da avaliação do potencial antioxidante se deve as disfunções celulares que são amplamente considerados como sendo responsáveis pela degeneração cerebral ou danos em outros órgãos quando há um aumento do estresse oxidativo, resultante de danos causados pelos radicais livres (JEONG et al., 2011). É fundamental que metodologias *in vivo* também sejam empregadas para uma melhor caracterização dos resultados obtidos (SARMADI; ISMAIL, 2010). No entanto, pode ser sugerido que a ciano-carvona pode retardar ou prevenir significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibir a iniciação e/ou propagação da reação de oxidação em cadeia.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio *in vitro*. Os resultados obtidos indicam que a ciano-carvona pode exercer um efeito antioxidante que precisa ser explorados *in vivo* para justificar o seu possível uso no tratamento de doenças em detrimento e suas propriedades antioxidantes verificadas *in vitro*.

Diante destes resultados sugere-se uma possível atividade antioxidante da ciano-carvona. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a ciano-carvona produz efeito antioxidante pelos métodos *in vitro* utilizados. Mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação que medeiam à ação antioxidante da ciano-carvona, principalmente *in vivo* para justificar seu possível uso no tratamento clínico de doenças humanas.

Os resultados indicam que ciano-carvona possui atividade antioxidante que fornece subsídios para a exploração do seu efeito farmacológico. A ciano-carvona contém grupamentos químicos com alta reatividade no grupo carbonila, com o H α na posição alílica e o H α com o grupamento C \equiv N capazes de produzir a remoção *in vitro* de radicais hidroxila e nitrito, bem como para agir contra a peroxidação lipídica. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a toxicidade da ciano-carvona e a dose segura e terapêuticamente eficaz para doenças em seres humanos, bem como para esclarecer seu mecanismo antioxidante para correlacionar a atividade farmacológica com sua estrutura química.

Diante dos resultados o presente trabalho contribuirá para investigações futuras por meio da pesquisa com uma molécula bioativa originada de um composto natural, que já mostram resultados promissores nos testes antioxidantes *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio técnico do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível técnico (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI).

REFERÊNCIAS

- ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. **Food Chemical**, v. 104, p. 21-9, 2007
- 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, p. 1137-1144, 2010.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.
- BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1610-1615, 2011.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 222-230, 2000.
- EL-HABIT, O.H.M. The modifying of b-carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in males. **Mutation Research**, v. 466, p. 179-85, 2000.

- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- 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.
- GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, P.; DÍAS, E.; HEINZEN, H.; MENÉNDEZ, P. Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 59, p. 173-176, 2009.
- GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A.M.H.; ARAÚJO, A.E.V. ; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D. A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 108-112, 2010.
- 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, p. 949-957, 2010.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 561-564, 2010.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 30, p. 14S-22S, 1991.
- HOCHESTEIN, P.; ATALLAH , A.S. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 202, p. 363-375, 1998.
- KAWANO, T.; ZOGA, V.; KIMURA, M.; LIANG, M.; WU, H.; GEMES, G.; MCCALLUM, J.B.; KWOK, W.; HOGAN, Q.H. Sarantopoulos CD: Nitric oxide

activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular Pain**, v. 5, p. 12, 2009.

JEONG , C.H.; KWAK, J. H.; KIMB, J. H.; CHOI, G.N.; KIM, D.; HEO, H. J. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. **Food Chemistry**, v. 125, p. 417-422, 2011.

LOPES, G.K.B.; SCHULMAN, H.M.; LIMA, M.H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions1. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1472, p. 142-152, 1999.

MANIAN, R.; ANUSUYA, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1000-1007, 2008.

MOTHANA, R.A.A.; HASSON, S.S.; SCHULTZE, W.; MOWITZ, A.; LINDEQUIST ,U. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1149-1154, 2011.

OKOKO, T. Chromatographic characterisation, in vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 7133-7137, 2009.

PEANA, A.T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Science**, v. 78, p. 719-723, 2006.

RAHMAN, S.; DOBSON, P.R.M.; BUNNING, R.A.D.; RUSSELL, R.G.G.; BROWN, B.L. The regulation of connective tissue metabolism by vasoactive intestinal polypeptide. **Regulatory Peptides**, v. 37, p. 111-121, 1992.

- REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.
- RICCIARDOLO, F.L.M.; DI STEFANO, A.; SABATINI, F.; FOLKERTS, G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 240-252, 2006.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.
- SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.
- SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, J.P.A.; SANTOS, A.D.C.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; NOGUEIRA, P.C.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**, v. XX , n. X, p. 1-8, 2011.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; BAJPAI, V.; SHUKLA, S. In vitro antioxidante activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2338-2343, 2009.
- SILVA, T.C.L.; ALMEIDA, C.C.B.R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; AMORIM, E.L.C.; COSTA, E.P.; ARAÚJO, J.M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011.
- SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, p. 9-19, 2001.
- SOUSA, D.P.; RAPHAEL, E.; BROCKSOM, T.J. Synthesis of (R) -(-)- Carvone Derivates. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65b, p. 1381-1383, 2010.

- SREELATHA, S.; PADMA, P.R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 303-311, 2009.
- VALENÇA, S.S.; PORTO, L.C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 787-795, 2008.
- VERSTEGEN-HAAKSMA, A.; SWARTS, H.J.; JANSEN, B.J.M.; GROOT, A. S(-)-Carvone as Starting Material in Synthesis (Part 4)¹. Conjugate Addition of Cyanide and Grignard Nucleophiles Followed by Annulation to Functionalized Decalones. **Tetrahedron**, v. 50, n. 33, p. 10073-10082, 1994.
- WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OUCHIKH, O.; HAMD AOUI, G.; Kchouk, M. E. ; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362-1370, 2010.
- WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 379-391, 2001.
- XI, H.; AKISHITA, M.; NAGAI, K.; YU, W.; HASEGAWA, H.; ETO, M.; KOZAKI, K.; TOBA, K. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 191, p. 281-289, 2007.
- ZIN, Z.M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A.; Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

CAPÍTULO II: Efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes da ciano-carvona e sua ação sobre a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos.

(Artigo publicado na Revista Cellular and Molecular Neurobiology)

Efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes de ciano-carvona e sua ação sobre a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos.

COSTA, DA¹; OLIVEIRA, GAL¹, LIMA, TC²; SANTOS, PS¹, SOUSA, DP²; FREITAS, RM¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

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

RESUMO

O efeito anticonvulsivante de ciano-carvona (CC), um monoterpeno monocíclico, foi investigada em modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. A CC nas doses 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ promoveu proteção de 33,3, 67 e 83,3%, respectivamente, contra convulsões induzidas por pilocarpina e foi eficiente em aumentar a latência para a primeira convulsão e porcentagem de sobrevivência nas doses de 25, 50 ou 75 mg kg⁻¹, resultando em 33,3, 67 e 83,3% de proteção, respectivamente. CC promoveu proteção significativa contra a mortalidade induzida pelo processo convulsivo nas doses de 25 (33,3%), 50 (83,3%), e 75 mg kg⁻¹ (91,7%). A atropina uma droga de referência de (25 mg kg⁻¹) também produziu uma proteção significativa (100%). Esse monoterpeno também foi capaz de promover um aumento de latência para a instalação de estado de mal epiléptico induzido por pilocarpina em 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ e apresentou uma proteção significativa contra a peroxidação lipídica e formação de nitrito no hipocampo de camundongos. Além disso observou-se que o pré-tratamento com CC aumentou a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina. Os resultados indicam claramente a capacidade de CC para modular os efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes. Nossos dados sugerem que os mecanismos de ação são devidos a uma ativação direta da enzima acetilcolinesterase e poderia ser associada a redução do estresse oxidativo, possivelmente envolvendo uma inibição da produção de radicais livres.

PALAVRAS-CHAVE: Ciano-carvona; Acetilcolinesterase; Estresse oxidativo; Convulsões; Pilocarpina.

ABSTRACT: Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus

The anticonvulsant effect of cyano-carvone (CC), a monoterpene monocyclic, was investigated in epilepsy model induced by pilocarpine. CC at 25, 50 or 75 mg kg⁻¹ promoted protection of 33.3, 67 and 83.3%, respectively, against pilocarpine-induced seizures and it was efficient in increases the latency to first seizures and survival percentage in doses of 25, 50 or 75 mg kg⁻¹, resulting in 33.3, 67 and 83.3% of protection, respectively. CC promoted significant protection against mortality induced by convulsive process at doses of 25 (33.3%), 50 (83.3%), and 75 mg kg⁻¹ (91.7%). The reference drug atropine (25 mg kg⁻¹) also produced a significant protection (100%). Its monoterpene was also capable to promote an increase of latency to installation of status epilepticus induced by pilocarpine at 25, 50 and 75 mg kg⁻¹ and presented a significant protection against lipid peroxidation and nitrite formation in mice hippocampus. Additionally was observed that the CC pretreatment increased the acetylcholinesterase activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. The present results clearly indicate the ability of CC to modulate the anticonvulsant and antioxidant effects. Our data suggests that the action mechanisms are due a direct activation of the acetylcholinesterase enzyme, and could be associated with the reduction of oxidative stress, possibly involving an inhibition of radical free production.

Keywords: Cyano-carvone; Acetylcholinesterase; Oxidative stress; Seizures; Pilocarpine.

INTRODUÇÃO

Há evidências que uma maior formação de radicais livres pode ocorrer durante as convulsões induzidas por pilocarpina (FREITAS et al., 2005; BARROS et al., 2007; XAVIER et al., 2007), com consequentes alterações nos níveis das monoaminas (CAVALHEIRO et al., 1994), atividade da acetilcolinesterase (FREITAS et al., 2006) conteúdo de nitrito e, especialmente, lipídios insaturados presentes na membrana celular (SANTOS et al., 2011a). Entre as outras conseqüências deste processo é a presença de alterações em δ -aminolevulínico desidratase, na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e Mg^{2+} -ATPase (FREITAS et al., 2011), alterações nos receptores muscarínicos e dopaminérgicos (MARINHO et al., 1998), peroxidação de fosfolipídios, alterações no metabolismo de óxido nítrico (TOMÉ et al., 2010a) e dano neuronal (SANTOS et al., 2011b).

Esses efeitos deletérios podem ser atenuados por interferência, ou modulação, dos processos fisiopatológicos que ocorrem durante convulsões induzidas por pilocarpina (MILITÃO et al., 2010). Além disso, os efeitos deletérios dos radicais livres podem ser inibidos pela presença de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico (TOMÉ et al., 2010b), alfa-tocoferol (BARROS et al., 2007), ácido lipóico (FREITAS et al., 2009) e ubiquinona (SANTOS et al., 2010) que podem inibir a ocorrência de peroxidação lipídica e formação de nitrito. No entanto, a busca de novos compostos antioxidantes com potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas é um processo complexo e muito desafiador. Assim, o presente estudo foi realizado para avaliar a atividade anticonvulsivante da ciano-carvona.

O uso de plantas medicinais na medicina tradicional ainda representa uma grande fonte de antioxidantes naturais que podem servir como alternativas para o desenvolvimento de novos medicamentos. S-(+)-carvona é o composto principal do óleo do alcaravia (*Carum carvi* L.) Este monoterpene apresenta algumas atividades biológicas já descritas na literatura. Ele apresenta, por exemplo, efeitos antimicrobianos (FARAG et al., 1989), nematicida (SAXENA et al., 1987), antitumoral (ZHENG et al., 1992) e propriedades reguladoras do crescimento de plantas (REYNOLDS, 1987). Em alguns casos, a estrutura menos prevalente a R-(-)-carvona mostra similares ou as mesmas atividades biológicas do S-(+)-carvona. Ambos os enantiômeros da carvona têm sido amplamente utilizados como matérias-primas para a síntese enantiosseletiva de produtos naturais (HO, 1992). Assim, a atividade fisiológica dos dois enantiômeros nem sempre é completamente diferente.

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a atividade anticonvulsivante da ciano-carvona, bem como seus efeitos sobre os níveis de peroxidação lipídica, teor de nitrito e

atividade da acetilcolinesterase após convulsões induzidas por pilocarpina no hipocampo de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Reagentes

Camundongos *Swiss*, adultos, machos (25-30 g; 2 meses de idade) foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (26 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h e comida e água *ad libitum* (Nutrilabor, Campinas, Brazil). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos, dos EUA, Washington, DC (1985).

O composto ciano-carvona foi preparado como descrito anteriormente (DE SOUSA et al., 2010). Foi emulsionado com Tween 80 0,05% (Sigma, USA), dissolvido em solução salina a 0,9% (veículo) e administrado intraperitoneal nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ para a avaliação da atividade anticonvulsivante. As dosagens de cloridrato de pilocarpina e atropina (Sigma, USA), e ciano-carvona são expressos em miligramas por quilograma de peso corporal e foram administrados em um volume de 10 ml/kg injetado por via intraperitoneal (i.p). Os controles receberam os veículos com o mesmo volume (10 ml/kg) e através da mesma via de administração que os outros grupos tratados. Todas as outras drogas foram de grau analítico.

Procedimentos experimentais

Um total de 108 camundongos foram tratados por via intraperitoneal com doses de 25, 50 ou 75 mg kg⁻¹ de ciano-carvona, atropina (25 mg kg⁻¹) ou veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%). Trinta minutos após os tratamentos doze camundongos de cada grupo acima foram randomizados para administração de cloridrato de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, grupo P400). Assim, há nove grupos de camundongos, neste conjunto de experimentos: grupo 1, ciano-carvona associado P400 (Grupo CC 25 associado P400, n=12); grupo 2, ciano-carvona e co-administração de pilocarpina (Grupo CC 50 associado P400, n=12), grupo 3, ciano-carvona e co-administração de pilocarpina (Grupo CC 75 associado P400, n=12), grupo 4, pilocarpina após o tratamento com a atropina (Grupo controle positivo, n=12), grupo 5, tratamento da pilocarpina com veículo (Grupo P400, n=12); grupo 6, ciano-carvona administrado sozinho (Grupo CC 25, n=12); grupo 7, ciano-carvona administrado sozinho (Grupo CC 50, n=12), grupo 8, ciano-carvona administrado sozinho (Grupo CC 75, n=12) e grupo 9, veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%) (controle negativo, n = 24).

Após os tratamentos, os animais foram colocados em uma câmara 30 cm x 30 cm e observados em relação: a latência para primeira crise (qualquer um dos índices de comportamento normalmente observado após a administração de pilocarpina: movimentos estereotipados, movimentos tônicos e clônicos, convulsões tônico-clônicas e o número de animais que morreram após a administração de pilocarpina. Anteriormente, outro estudo mostrou que as convulsões e as mortes ocorreram dentro de 1 e 24 h, respectivamente, após a injeção de pilocarpina (TURSKI et al., 1983), o comportamento dos animais foi observado por 24 h após a administração de pilocarpina.

Após esse período, os sobreviventes foram mortos por decapitação e seus cérebros foram dissecados sobre gelo para a remoção do hipocampo para as determinações do nível de peroxidação lipídica, teor de nitrito e atividade de acetilcolinesterase (Ilustração 1). O grupo pilocarpina foi constituído por aqueles que apresentaram convulsões, estado epiléticos por mais de 30 min e não sobreviveram. Doses de pilocarpina (400 mg kg^{-1}) e ciano-carvona (25, 50 ou 75 mg kg^{-1}) foram determinadas por estudo anterior em nosso laboratório.

Determinações do nível de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina

Para todos os procedimentos experimentais, homogenatos a 10% (v/v) da área do cérebro investigados estavam preparados para todos os grupos. Concentração de proteína foi medida (LOWRY et al., 1951). Níveis de peroxidação lipídica no grupo controle (n=12), grupo P400 (n=7), grupo CC 25 associado P400 (n=7), grupo CC 50 associado P400 (n=7), grupo CC 75 associado P400 (n=7), grupo CC 25 (n=7), grupo CC 50 (n=7) e grupo CC 75 (n=7) e foram analisados através do homogeneizados a medição da reação de substâncias com o ácido tiobarbitúrico (DRAPER; HADLEY, 1990), e expressa como nmol de malonildialdeído (MDA)/g de tecido (nmol de MDA/g tecido homogenato).

Determinações do teor de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina

Para determinação do conteúdo de nitrito do grupo controle (n=12), grupo P400 (n=7), grupo CC 25 associado P400 (n=7), grupo CC 50 associado P400 (n=7), grupo CC 75 associado P400 (n=7), grupo CC 25 (n=7), grupo CC 50 (n=7) e grupo CC 75 (n=7), os homogenatos a 10% (w/v) foram centrifugados ($800 \times g$, 10 min). Os sobrenadantes foram

coletados e produção de óxido nítrico foi determinada com a reação Griess (GREEN et al., 1981). Os resultados acima foram expressos em nM.

Determinação da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina

A atividade da acetilcolinesterase no grupo controle ($n=12$), grupo P400 ($n=7$), grupo CC 25 associado P400 ($n=7$), grupo CC 50 associado P400 ($n=7$), grupo CC 75 associado P400 ($n=7$), grupo CC 25 ($n=7$), grupo CC 50 ($n=7$) e grupo CC 75 ($n=7$) foi medida pelo método de Ellman e colaboradores (1961) usando 1 mM de acetilcolina, 1mM de 5,5'-dithiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) num período de incubação de 10 min a 37 °C. Os resultados foram expressos em nmol acetilcolina hidrolisado/mg proteína/min (nmol/mg proteína/min).

Análise estatística

Resultados de latência para primeira convulsão, alterações neuroquímicas foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de *t*-Student-Newman Keuls como *post hoc* teste ($p<0,05$) (Programa Graphpad, Software para a Ciência, em San Diego, CA). O número de animais que apresentaram convulsões e o número de sobreviventes foram calculados como porcentagens (porcentagem de convulsões, porcentagem de estado de mal epilético e porcentagem de sobrevivência, respectivamente) e comparado com um teste não paramétrico (χ^2).

RESULTADOS

Alterações comportamentais após pré-tratamento com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina

Pilocarpina induziu a primeira convulsão em $7,90 \pm 1,68$ min. Todos os animais tratados com pilocarpina mostraram sinais colinérgicos periféricos, tremores, movimentos estereotipados, convulsões tônico-clônicas com estado de mal epilético, nenhum desses animais sobreviveram ao processo convulsivo. O pré-tratamento com ciano-carvona em doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ não foi capaz de reverter os sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados induzidos por pilocarpina. A ciano-carvona causou uma proteção dose-dependente contra convulsões induzidas por pilocarpina, nas doses de 25 (33,3%; $p<0,05$), 50 (67%, $p<0,01$), e 75 mg kg⁻¹ (83,3%, $p<0,001$). Um efeito protetor claro também

foi observado com atropina (25 mg kg⁻¹), usada como medicamento de referência. Como ilustrado na tabela 1, ciano-carvona foi eficaz para aumentar a latência para as primeiras convulsões induzidas por pilocarpina na dose de 25 (15%; p<0,05), 50 (56%, p<0,01) e 75 mg kg⁻¹ (98%, p<0,001).

Tabela 1. Efeitos do tratamento prévio com ciano-carvona (CC) em convulsões induzidas por pilocarpina, estado de mal epilético e letalidade em camundongos adultos.

Grupos	LIPC (min)	LIEME (min)	% Convulsão	% EME	% TS
P400	7,9 ± 1,7	14,9 ± 1,57	100	100	00
ATR + P400	00	00	00	00	100
CC 25 + P400	9,1 ± 1,9 ^d	17,6 ± 2,4 ^d	33,3 ^a	33,3 ^a	33,3 ^a
CC 50 + P400	12,3 ± 1,3 ^{d,e}	18,6 ± 1,9 ^{d,e}	67 ^{a,b}	67 ^{a,b}	83,3 ^{a,b}
CC 75 + P400	15,7 ± 2,3 ^{d,e,f}	22,4 ± 2,4 ^{d,e,f}	83,3 ^{a,b,c}	83,3 ^{a,b,c}	91,7 ^{a,b,c}

Latência para instalação da primeira convulsão - LIPC; Latência instalação de mal epilético - LIEME; Taxa de sobrevivência – TS; n=12.

Os animais foram pré-tratadas de forma aguda, por via intraperitoneal, com ciano-carvona nas doses 25, 50 ou 75 mg kg⁻¹ (ip) e 30 depois recebido pilocarpina 400 mg kg⁻¹ (P400, ip). Os resultados para a latência para instalação da primeira convulsão (LIPC) e latência para o estado mal epilético (LIEME) foram expressos como média ± E.P.M. Resultado para convulsões, estado de mal epileptico (EME) e de sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental. ^ap<0,05, em comparação ao grupo P400 (χ^2 -teste); ^bp<0,05 em comparação com CC 25 associado a P400 (χ^2 -teste); ^cp<0,05 em comparação com CC 50 associado a P400 (χ^2 -teste); ^dp <0,05, em comparação com o grupo P400 (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); ^ep <0,05, em comparação com o grupo CC 25 associado P400 (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); ^fp <0,05 em comparação com CC 50 associado P400 (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

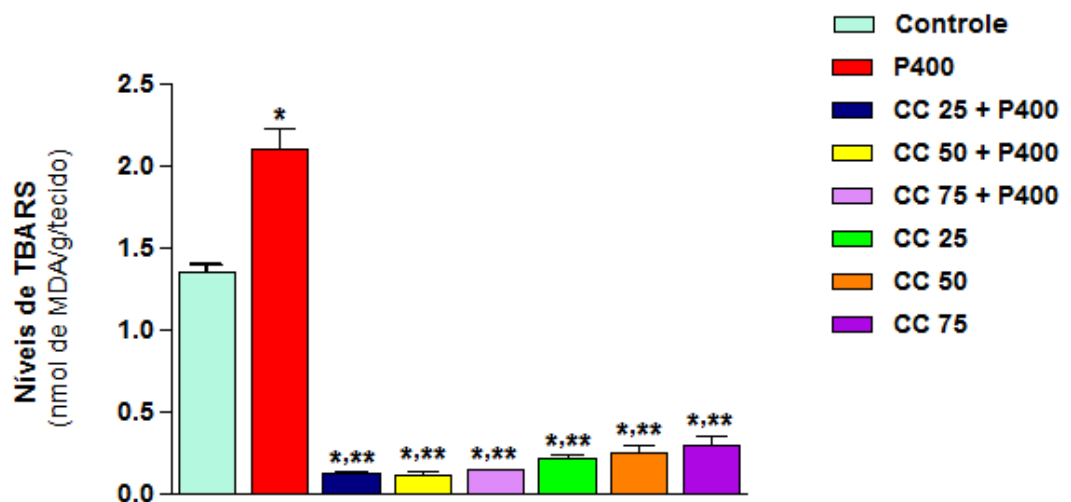
De acordo com a Tabela 1, a ciano-carvona causou um aumento de latência para a instalação de estado de mal epilético induzido por pilocarpina (400 mg kg⁻¹) nas doses de 25 (17%, p<0,05), 50 (24%, p<0,01) e 75 mg kg⁻¹ (49,9%, p<0,001). A Tabela 1 mostra que a ciano-carvona promoveu proteção significativa contra a mortalidade induzida pelo processo

convulsivo em doses de 25 (33,3%; $p < 0,05$), 50 (83,3%; $p < 0,01$) e 75 mg kg^{-1} (91,7%, $p < 0,001$). A droga de referência atropina (25 mg kg^{-1}) também produziu uma proteção significativa (100%, $p < 0,001$). Nenhum dos animais do grupo controle (veículo, atropina ou ciano-carvona) apresentaram mudanças comportamentais (Tabela 1).

Nível de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina.

Efeitos de ciano-carvona em níveis de peroxidação lipídica durante as convulsões induzidas por pilocarpina são apresentados na Ilustração 1. A peroxidação lipídica foi significativamente aumentada no grupo P400 em comparação com o grupo veículo. Durante a fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina um aumento significativo (55%) na reação de substâncias com ácido tiobarbitúrico foi observada ($p < 0,0001$). Camundongos pré-tratados com ciano-carvona mostraram uma diminuição no nível de peroxidação lipídica (89,5, 88,1 e 85,7%) nos grupos CC 25, CC 50 e CC 75 mg kg^{-1} , quando comparado com o grupo P400, respectivamente ($p < 0,0001$, Ilustração 1).

Ilustração 1. Efeitos da ciano-carvona (CC) sobre o nível de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina.



Camundongos machos (25-30 g, 2 meses de idade) foram intraperitonealmente tratados com uma única dose de pilocarpina (400 mg kg^{-1} , $n=12$, grupo P400), grupo ciano-carvona (CC) 25, 50 ou 75 mg kg^{-1} (grupos CC 25, CC 50 e CC 75, $n=12$) e os animais do grupo controle com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em 0,9% de solução salina, $n=12$ grupo controle). O CC + P400 grupos foram pré-tratados com ciano-carvona (25, 50 ou 75 mg kg^{-1}) durante 30 min antes da injeção de pilocarpina (400 mg kg^{-1} , $n=12$, CC 25 associado P400; CC 50 associado P400 e CC 75 além do grupo P400). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e o número de animais (n) está indicado no interior entre parênteses. Diferenças nos

grupos experimentais foram determinados por Análise de variância (ANOVA). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ** $p < 0,05$ comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). CC= ciano-carvona; P400= Pilocarpina.

Da mesma forma, camundongos pré-tratados com ciano-carvona mostraram uma diminuição no nível de peroxidação lipídica (83,8, 81,6 e 77,9%) nos grupos CC 25, 50 e 75, quando comparado com o grupo controle, respectivamente ($p < 0,0001$, Ilustração 1). Além disso, o pré-tratamento com ciano-carvona 30 min antes da administração de pilocarpina também reduziu o nível de peroxidação lipídica (93,8, 94,3 e 92,9%) nos grupos CC 25 associado a P400, CC 50 associado a P400 e CC 75 associado a P400, quando comparado ao grupo P400, respectivamente ($p < 0,001$, Ilustração 1). Da mesma forma, o pré-tratamento com ciano-carvona 30 min antes da administração de pilocarpina também reduziu o nível de peroxidação lipídica (90,4, 91,1 e 88,9%) nos grupos CC 25 associado a P400, CC 50 associado a P400 e CC 75 associado a P400, quando comparado ao grupo veículo, respectivamente ($p < 0,001$, Ilustração 1)

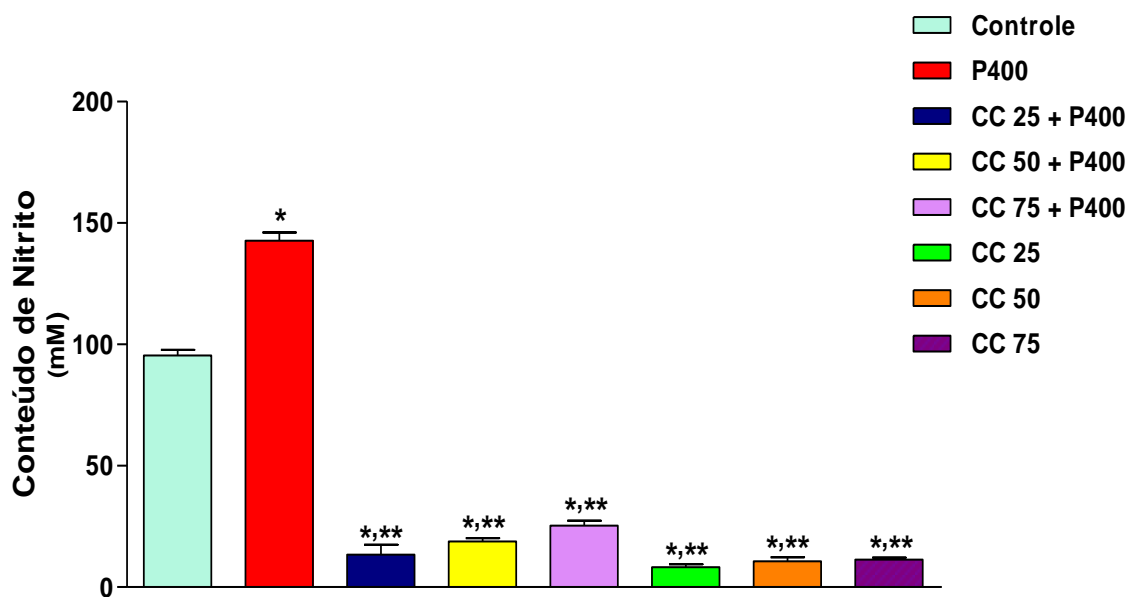
Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzida por pilocarpina.

Efeitos de ciano-carvona na concentração de nitrito durante as convulsões induzidas por pilocarpina são apresentados na Ilustração 3. Conteúdo de nitrito foi significativamente aumentada no grupo P400 em comparação ao grupo controle. Durante a fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina um aumento significativo (47%) no conteúdo de nitrito hipocampal foi observada (49%, $p < 0,0001$, Ilustração 3). Camundongos pré-tratados com ciano-carvona nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ apresentaram diminuição no teor de nitrito (94,2, 92,5 e 92%) quando comparado com o grupo P400, respectivamente, $p < 0,0001$ (Ilustração 3).

Da mesma forma, os animais pré-tratados com ciano-carvona em doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ apresentaram diminuição no teor de nitrito (91,4, 88,8 e 88,1%) quando comparado com o grupo do veículo, respectivamente). ($p < 0,0001$, Ilustração 3). Além disso, o pré-tratamento com ciano-carvona (25, 50 e 75 mg kg⁻¹) 30 min antes da administração de pilocarpina também reduziu o conteúdo de nitrito (86, 80,3 e 73,5%) quando comparado ao grupo veículo, respectivamente ($p < 0,001$, Ilustração 3). Da mesma forma, o pré-tratamento

com ciano-carvona (25, 50 e 75 mg kg⁻¹) 30 min antes da administração de pilocarpina também reduziu o conteúdo de nitrito (90,6, 86,8 e 82,2%) quando comparado ao grupo P400 (p<0,001, Ilustração 3). Por outro lado, os animais dos grupos controles (veículo ou ciano-carvona) não apresentaram alterações no conteúdo de nitrito (Ilustração 3).

Ilustração 2. Efeitos da ciano-carvona (CC) sobre o teor de nitrito no hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina.

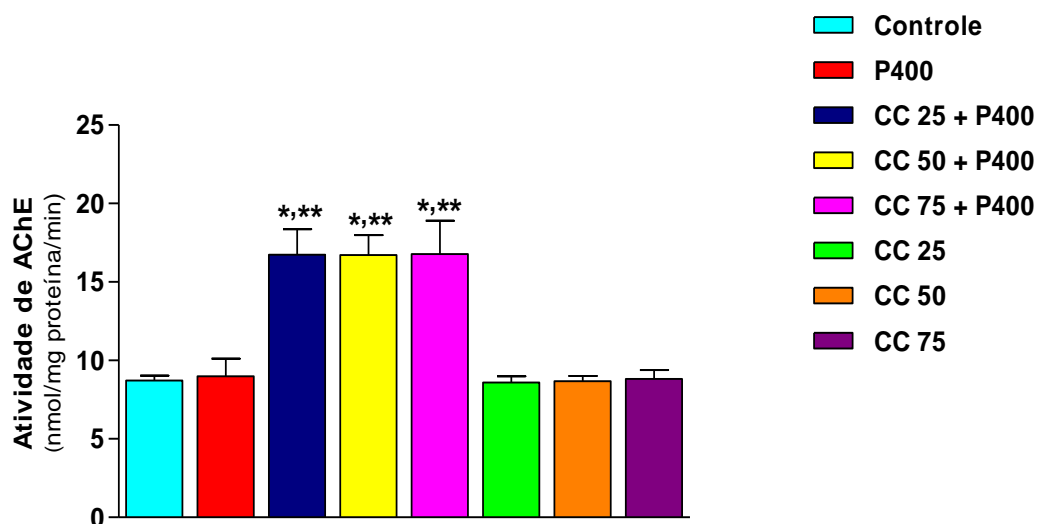


Camundongos machos (25-30 g, 2 meses de idade) foram intraperitonealmente tratada com uma única dose de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, n=12, Grupo P400), com ciano-carvona (25, 50 ou 75 mg kg⁻¹, n=12, grupos CC 25, CC 50 e CC 75, respectivamente) e os animais do grupo controle com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em 0,9% de solução salina, n=12 grupo controle). Os grupos CC associado a P400 foram pré-tratados com ciano-carvona (25, 50 ou 75 mg kg⁻¹) durante 30 min antes da injeção de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, n=12, CC 25 associado a P400; CC 50 associado a P400 e CC 75 associado a P400), respectivamente. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. *p<0,05 comparado ao grupo controle (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls); ** p<0,05 comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls). CC= ciano-carvona; P400= Pilocarpina

Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos pré-tratados com ciano-carvona após convulsões induzidas por pilocarpina.

A atividade da AChE no hipocampo dos camundongos durante a fase aguda das convulsões não foi significativamente alterado no grupo pilocarpina em comparação com o grupo controle ($p < 0.05$). Do mesmo modo, houve um aumento significativo de 92, 92 e 93% nas atividades AChE de camundongos pré-tratados com ciano-carvona nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ (ip) e que recebeu 30 min antes de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, i.p.) (CC 25 com P400, CC 50 associado P400 e CC 75 associado P400) em comparação com o grupo controle, respectivamente ($p < 0,0001$) (Ilustração 4). Além disso, camundongos pré-tratados com ciano-carvona mostraram aumento de atividades AChE (86, 86 e 87%) nos grupos CC 25 associado a P400, CC 50 associado a P400 e CC 75 associado a P400, quando comparado com o grupo P400, respectivamente ($p < 0,0001$, Ilustração 4). Por outro lado, não ocorreram alterações enzimáticas nos grupos ciano-carvona (CC 25, CC 50 e CC 75), em comparação com o veículo e ao grupo P400 ($p > 0,05$) (Ilustração 4).

Ilustração 3. Efeitos de ciano-carvona (CC) em acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina.



Camundongos machos (25-30 g, 2 meses de idade) foram intraperitonealmente tratados com uma única dose de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, n=12, grupo P400), com o grupo ciano-carvona (CC) (25, 50 ou 75 mg kg⁻¹, n=12, Grupos CC 25, CC 50 e CC 75) e com o grupo controle com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em 0,9% de solução salina, n=12 grupo controle). Os grupos CC associado a P400 foram pré-tratados com ciano-carvona (25, 50 ou 75 mg kg⁻¹)

durante 30 min antes da injeção de pilocarpina (400 mg kg⁻¹, n = 12, CC 25 associado a P400; CC 50 associado a P400 e CC 75 associado a P400). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. **p*<0,05 comparado ao grupo controle (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls); ***p*<0,05 comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls). CC= ciano-carvona; P400= Pilocarpina

DISCUSSÃO

O presente estudo, demonstrou que a administração sistêmica de ciano-carvona pode abolir completamente convulsões induzidas por pilocarpina. Isto ficou evidente a partir de mudanças comportamentais simultâneas consistentes com o estado convulsivo. Estas mudanças também induziram estresse oxidativo e a mudança na atividade da acetilcolinesterase após convulsões induzidas por pilocarpina. Considerando que a ciano-carvona foi eficaz para prevenir convulsões tônico-clônicas induzido por pilocarpina, este composto pode ser útil na epilepsia do tipo grande mal.

Durante a administração de pilocarpina, a resposta inicial foi um aumento significativo da peroxidação lipídica e a formação de nitrito. Sendo consistente com estudos anteriores, em que a pilocarpina induziu efeitos semelhantes sobre os níveis de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito em preparações do hipocampo de camundongos (DAL-PIZZOL et al., 2000; FREITAS et al., 2005). Este aumento nos níveis de peroxidação lipídica tem sido descrita devido à formação de radicais livres mediada pelas convulsões induzidas por pilocarpina (SHULZ et al., 1995).

Além disto, este aumento foi inicialmente transitório e seguido por uma elevação prolongada marcada de conteúdo de nitrito no hipocampo. Este aumento da peroxidação lipídica e nas concentrações de nitrito correspondeu ao aparecimento de convulsões induzidas por pilocarpina, manifestada por alterações comportamentais. Estas descobertas, incluindo o aumento inicial dos níveis de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, são semelhantes às observações anteriores (FREITAS et al., 2004; JÚNIOR et al., 2009). Elevações nos níveis de peroxidação lipídica e nas concentrações de nitrito também foram relatados com convulsões induzidas por ácido caínico (UEDA et al., 1997) e pentilenotetrazole (ILHAN et al., 2005) e em pacientes epiléticos (KAWASHIMA et al., 2004).

A peroxidação lipídica e a formação de nitrito no hipocampo de camundongos durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina pode progredir durante várias horas após a recuperação espontânea do estado de mal epilético (pelo menos 12 h) no modelo de pilocarpina. Estes resultados indicam que a janela terapêutica pode ser suficientemente longa

para utilizar antioxidantes no tratamento de estado de mal epiléptico. A administração sistêmica de ciano-carvona resultou em uma queda rápida e acentuada da peroxidação lipídica hipocampal e da formação de nitrito. Sendo consistente com a constatação de que ciano-carvona diminuiu marcadamente o aumento de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS) na região hipocampal. A inibição de TBARS e produção de nitrito induzida por ciano-carvona também tem sido relatada em outros estudos *in vitro* (dados não apresentados), mas a relação entre a inibição da produção e ação anticonvulsivante ainda não foi esclarecida. Levando em consideração que a ciano-carvona induziu uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica e na formação de nitrito no modelo de convulsão e a correlação sincrônica desta diminuição com modificação comportamental, sugere que a modulação do estresse oxidativo pode na verdade estar relacionada com a ação anticonvulsivante de ciano-carvona.

O envolvimento de mecanismos colinérgicos da epilepsia induzida por pilocarpina está bem estabelecido (TURSKI et al., 1989). Acetilcolinesterase (AChE) tem um papel crucial na neurotransmissão colinérgica e na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina para encerrar a transmissão dos impulsos nervosos. A ausência de resultados na atividade da AChE provavelmente em níveis anormalmente elevados de acetilcolina nas sinapses colinérgicas pode induzir convulsões. A atividade da AChE resulta provavelmente em níveis anormalmente elevados de acetilcolina nas sinapses colinérgicas. O acúmulo de acetilcolina resulta na estimulação excessiva de receptores muscarínicos e nicotínicos. Os sinais de intoxicação são vistos como aumento da salivação, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, coma e morte. Aumento da atividade colinérgica no cérebro é provavelmente relacionado com a fase inicial das convulsões (MCDONOUGH; SHIH, 1997; LALLEMENT et al., 1992). Considerando que as convulsões sustentadas são provavelmente associados com a atividade glutamatérgica aumentada levando a danos neuronais predominantemente no hipocampo, amígdala, córtex piriforme e córtex entorrinal (MCDONOUGH; SHIH, 1997; CARPENTIER et al., 1991).

A diminuição da atividade colinérgica produzida pela ciano-carvona é supostamente apoiada pela redução do percentual de convulsões e da taxa de mortalidade. Em correspondência com este ponto de vista, a ciano-carvona aumenta a latência para as primeiras convulsões e a latência para instalação do estado de mal epiléptico. Também foi mostrado que ciano-carvona pode compensar as mudanças de comportamento induzidas por pilocarpina.

O presente estudo *in vivo* foi conduzido por um derivado da R-(+)-carvona: (1) pela sua capacidade de inibir a AChE no hipocampo de camundongos, (2) para determinar se o derivado ciano-carvona de R-(+)-carvona pode ter adicionado benefício como anticonvulsivante e (3) para avaliar sua eficácia antioxidante, examinando sua capacidade de modular o estresse oxidativo. Além disso, os testes *in vivo* podem subsidiar estudos de doses que poderiam ser úteis no tratamento da epilepsia humana. Testes iniciais *in vivo* podem ser fáceis e confiáveis em modelos animais e são especialmente valiosos quando se estudam os efeitos de compostos naturais, principalmente dos mecanismos neuroprotetores com a modulação do estresse oxidativo.

A ciano-carvona por sua capacidade de proteção *in vivo* contra convulsões induzidas por pilocarpina no hipocampo de camundongos. A capacidade de proteção da ciano-carvona foi mais eficaz quando na administração das maiores doses. Dados mostram que os testes com a R-(+)-carvona foi eficaz, embora em menor dose de ciano-carvona, e que eles não tinham efeitos prejudiciais na região do hipocampo, eles podem servir como uma plataforma para o desenvolvimento de compostos de última geração que protegem contra o estresse oxidativo causado por convulsões e estado epiléptico induzida pela pilocarpina.

Embora a associação direta entre a inibição da AChE e produção de radicais livres não podem ser feitas com o modelo de pilocarpina utilizado neste estudo, o derivado R-(+)-carvona testado produziu proteção contra ataques e mortalidade produzida pelo processo convulsivo. Sua capacidade de remover TBARS e nitrito, como relatado com outros compostos antioxidantes (NEWMAN et al., 2007; EHRICH et al., 2011) tem sido um efeito relevante, uma vez que induzir tanto a ativação da AChE como a inibição da produção de substâncias associadas ao estresse oxidativo. A eficácia possível da ciano-carvona na proteção da neurotoxicidade nas convulsões induzidas por pilocarpina pela estimulação da atividade de AChE é de grande interesse. Sugere-se que ciano-carvona utilizado nesta dissertação pode ser administrado, protegendo contra danos ao sistema nervoso, sem evidência de efeitos prejudiciais. Como a epóxi-carvona (ALMEIDA et al., 2008), o efeito protetor sobre o sistema nervoso central ocorre após convulsões induzidas quimicamente por eletrochoque máximo, picrotoxina e pentilenotetrazol que receberam as maiores concentrações de monoterpeno monocíclico após a administração sistêmica (ALMEIDA et al., 2003).

Em conclusão, nossos resultados mostraram que ciano-carvona possui atividade anticonvulsivante, provavelmente devido à modulação do sistema colinérgico e redução do estresse oxidativo neuronal principalmente por meio da diminuição da produção de radicais livres. Ciano-carvona pode ser útil para produzir proteção neuronal e pode ser considerado

como um potencial anticonvulsivante natural. No entanto, estudos adicionais são necessários para o uso clínico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado em parte por concessões do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. R.M.F e P.S.S. são bolsistas do CNPq. Gostaríamos de agradecer Stenio Gardel Maia pela sua assistência técnica e Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (UFPI, Picos) por sua ajuda com a edição do manuscrito em inglês.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C., LEITE, J.R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, p. 3-6, 2003.
- ALMEIDA, R.N.; SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ARAÚJO, D.A.M., LEITE, J.R., MATTEI, R. Anticonvulsant effect of a natural compound α,β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neuroscience Letters**, v. 443, p. 51-55, 2008
- BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, p. 416, p. 227-230, 2007.
- CARPENTIER, P.; LAMBRINIDIS, M.; BLANCHET, G. Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurons (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. **Brain Research**, v. 541, p. 293-299, 1991.
- CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

- DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.M.R.; SCHORER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M.S.; MOREIRA, J.C.F.; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 179-182, 2000.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- ELLMAN, G.E.; COURTNEY, D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- EHRICH, M.; TASSELL, R.V.; LI, Y.; ZHOU, Z.; KEPLEY, C.L. Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 301-307, 2011.
- FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus pamsiticus* growth and production of aflatoxin in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 74-76, 1989.
- FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 327-332, 2004.
- FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.
- FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats

after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience Letters**, v. 399, p. 76-78, 2006.

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

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

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

HO, T-L., Enantioselective Synthesis. **Natural Products from Chiral Terpenes**. John Wiley and Sons, New York, pp. 324, 1992.

ILHAN,A.; GUREL, A.; ARMUTCU, F.; KAMISLI, S.; IRAZ, M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylentetrazol-induced kindling in mice. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 456-464, 2005

JÚNIOR, H.V.N., FONTELES, M.M.F.; FREITAS, R.M. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 1-8, 2009.

KAWASHIMA, H.; INAGE, Y.; OGIHARA, M.; KASHIWAGI, Y.; TAKEKUMA, K.; HOSHIKA, A.; MORI, R.; WATANABE, Y. Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion. **Life Sciences**. v. 74, p. 1397-1405, 2004.

LALLEMENT, G.; DENOYER, M.; COLLET, A.; PERNOT-MARIONO, I.; BAUBICHON, D.; MONMAUR, P.; BLANCHET, G. Changes in hippocampal acetylcholine and

glutamate extracellular levels during soman-induced seizures: influence of septal cholinergic cells. **Neuroscience Letters**, v. 139, p. 104-107, 1992.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MCDONOUGH, Jr.J.H.; SHIH, T-M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent induced seizure and neuropathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 559-579, 1997.

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

NEWMAN, J.D.S.; ROBERTS, J.M.; BLANCHARD, G.J. Optical organophosphate sensor based upon gold nanoparticle functionalized fumed silica gel. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3448-454, 2007.

REYNOLDS, T. Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. **Annals of Botany**, v. 60, p. 215-223, 1987.

SANTOS, I.M.S.; FREITAS, R.L.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Pharmacological studies of ubiquinone in pilocarpine-induced epilepsy model. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, p. 34-47, 2010.

SANTOS, P.S.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is

diminished by alpha-tocopherol. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 65-71, 2011a.

SANTOS, P.S.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; TOMÉ, A.R.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Lipoic acid inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, p. 531-537, 2011b.

SAXENA, D.B.; GOSWAMI, B.K.; TOMAR, S.S. Nematitidal activity of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. **Indian Perfum.** v. 31, p. 150-154, 1987.

SHULZ, J.N.; HENSHAW, D.R.; SIWEK, D.; JENKINS, B.G.; FERRANTE, R.J.; CIPOLLONI, P.B.; KOWALL, N.W.; ROSEN, B.R.; BEAL, M.F. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 2239-2247, 1995.

SOUSA, D.P.; RAPHAEL, E.; BROCKSON, T.J. Synthesis of (R)-(-)-Carvone Derivatives. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65, p. 1381-1383, 2010.

TOMÉ, A.R.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 580-587, 2010a.

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

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

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, p. 154-171, 1989.

UEDA, Y.; YOKOYAMA, H.; NIWA, R.; KONAKA, R.; OHYA-NISHIGUCHI, H.; KAMADA, H. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 329-333, 1997.

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

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K. Effects of carvone compounds on glutathion S-transferase activity in A/J mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 751-755, 1992.

CAPÍTULO III: Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências da Saúde)

Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona

**COSTA, DA¹; COSTA, JP¹; OLIVEIRA, GAL¹; SOUZA, GF²; SOUSA, DP³;
FREITAS, RM¹**

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPI. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

² Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal do Ceará

³Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

RESUMO

Objetivo: Este estudo objetivou avaliar a segurança da ciano-carvona por meio de estudos de toxicidade aguda, bem como investigar o seu potencial ansiolítico. Material e Métodos: No presente trabalho, os camundongos receberam ciano-carvona por via oral em doses crescentes de 25 a 2000 mg kg⁻¹ sendo observados durante 14 dias para verificar as alterações comportamentais e registrar a taxa de mortalidade entre os animais. Após esse período foram realizados exames hematológicos, bioquímicos e a análise morfológica macroscópica dos principais órgãos. Além disso, outros grupos de animais foram tratados com as doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ para avaliação da atividade locomotora, do efeito ansiolítico e da coordenação motora. Resultados: No teste hipocrático, a substância analisada não provocou nenhuma morte entre os camundongos, e os sinais clínicos que surgiram foram discretos, reversíveis e observados apenas nas maiores doses. Dessa forma, devido à ausência de mortalidade, a DL₅₀ não foi determinada. Em relação às análises hematológicas e bioquímicas não foram verificadas alterações significativas. Em nossos estudos comportamentais verificamos uma redução da atividade locomotora, e um maior número de entradas e um maior tempo de permanência nos braços abertos, sugerindo um possível efeito ansiolítico. Em relação ao teste do *rota rod* não foi verificada alteração no tempo de permanência na barra giratória, bem como não foi detectado mudanças no número de quedas. Conclusão: Este estudo demonstrou que a ciano-carvona não apresenta toxicidade aguda, e sugere um possível

efeito ansiolítico que precisa ser melhor investigado em novos estudos para a elucidação do seu mecanismo de ação.

PALAVRAS-CHAVES: Ansiedade, Ciano-carvona, Monoterpeno, Toxicidade aguda.

ABSTRACT: Evaluation of acute toxicity and anxiolytic effect of a synthetic derivative of carvone

This study evaluated the safety of the cyano-carvone through acute toxicity studies, as well as investigating its potential anxiolytic. In this study, the mice received cyano-carvone orally in escalating doses from 25 to 2000 mg kg⁻¹ and observed for 14 days to check for behavioral changes and record the mortality rate among animals. After this period were performed hematological, biochemical and morphological analysis of the main macroscopic bodies. In addition, other groups of animals were treated with doses of 25, 50 and 75 mg kg⁻¹ to assess locomotor activity, the anxiolytic and motor coordination. In the Hippocratic test, the compound did not cause any deaths among the mice, and clinical signs that emerged were discrete, reversible and observed only in higher doses. Thus, the absence of mortality, the DL₅₀ was not determined. With regard to hematological and biochemical analysis showed no changes significant. In our behavioral studies found a reduction in locomotor activity, and a greater number of entries in open arms, as well as a greater time spent in open arms, suggesting a possible anxiolytic effect. Regarding the test rod route has not been verified change in residence time in the spinning rod, and was not detected changes in the number of falls. This study demonstrated that the cyano-carvone has no acute toxicity, and suggests a possible anxiolytic effect that needs to be investigated in further studies to elucidate the action mechanism.

KEYWORDS: Acute toxicity, Anxiety, Cyano-carvone, Monoterpenes.

INTRODUÇÃO

A (R)-(-)-carvona (p-mentha-6,8-dien-2-ona) é um monoterpene representante do grupo químico das cetonas. Esse monoterpene é o componente majoritário do óleo essencial da hortelã (*Mentha spicata* L.) que pode ser obtido por hidrodestilação a partir das folhas desta planta. Entre os terpenos as formas (+)-carvona e (-)-carvona, são provavelmente as mais versáteis. Estes têm sido usados na síntese de diversos intermediários e compostos naturais, principalmente terpenóides (HARIRI et al., 2011).

A carvona apresenta propriedades estomáquicas e carminativas, sendo a esta também atribuída ação galactagoga e emenagoga. Na indústria farmacêutica de cosméticos e alimentícia pode ser utilizada como flavorizante. No entanto, sua principal utilidade industrial é como saporificante (EHLERT et al., 2002).

Dentre os monoterpene estudados podemos destacar que a carvona apresenta atividade sobre as funções do Sistema Nervoso Central (SNC), porém ainda não foram avaliados os efeitos dos derivados da carvona, incluindo a ciano-carvona. A ciano-carvona (1S, 2S, 5R)-5-isopropenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila) ou cetonitrila é um derivado sintético monoterpene da (R)-(-)-carvona. Dessa forma o presente estudo avaliou a toxicidade aguda desta substância, a fim de verificar a sua segurança para uma possível aplicação pela indústria farmacêutica na produção de novos fármacos para tratamento de doenças neurodegenerativas. Atualmente houve um aumento dos estudos envolvendo a avaliação de compostos sintéticos e semi-sintéticos, já que aproximadamente 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética (SOUSA et al., 2010), reforçando a necessidade do nosso estudo.

Avaliação da toxicidade é indispensável, e fornecem dados principalmente sobre a segurança de novas moléculas químicas com potencial farmacológico para a saúde humana (TAPP et al., 2009).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda por meio da análise morfológica macroscópica dos principais órgãos, e dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos. Além disso, o presente estudo investigou o possível efeito ansiolítico em modelos experimentais, após tratamento agudo com ciano-carvona, uma vez que esse composto está presente no óleo essencial de diversas plantas medicinais do Nordeste Brasileiro que são usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios do SNC, bem como já foi verificado que os isômeros R-(-) e S-(+) da carvona apresentam efeitos anticonvulsivantes nos modelos de convulsão induzidos por pentilenotetrazol e

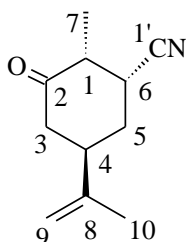
microtoxina, reforçando a necessidade de avaliarmos os efeitos deste monoterpene sintético em modelos animais de ansiedade (SOUSA et al., 2007b).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da ciano-carvona

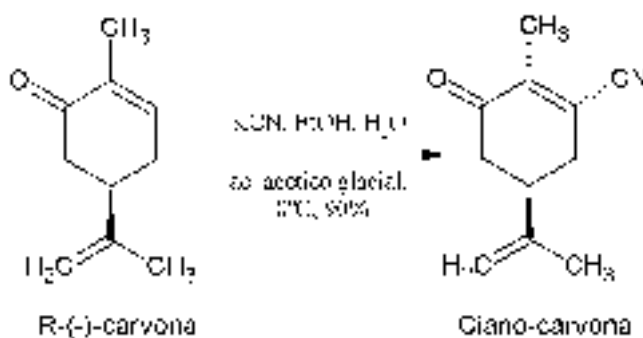
O composto ciano-carvona (CC) um sólido branco cristalino foi obtido e isolado a partir do processo de cianidificação da carvona com 98% de pureza, descrito anteriormente (SOUSA et al., 2010) (Ilustração 1).

Ilustração 1: Estrutura química ciano-carvona (1S,2S,5R)-5-isoprenil-2-metil-3-oxociclohexanocarbonitrila.



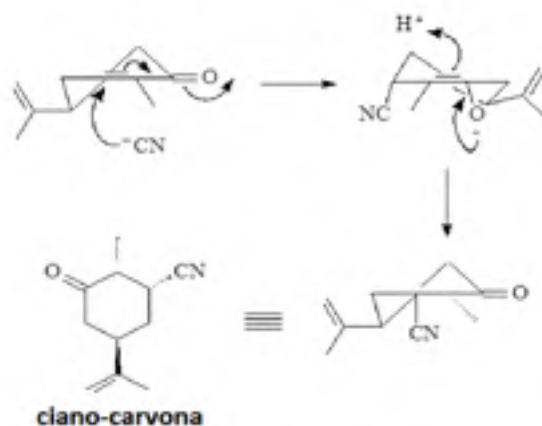
A ciano-carvona foi obtida a partir do seguinte processo de síntese. A um balão contendo 12,5 g (83,50 mmols) de R-(-)-carvona em 37,5 mL de etanol a 0 °C, adicionou-se lentamente uma solução de 7,5 g (115 mmols) de KCN em 17,5 mL de água. Em seguida, foi adicionado a esta mistura 5,5 mL de ácido acético glacial em 1 hora. Agitou-se por mais 16 horas a 0 °C. Depois, filtrou-se a mistura reacional e o precipitado foi lavado com água/etanol (1:1). O produto recristalizado do etanol resultou em 13,28 g (75,02 mmols) de ciano-carvona com 90% de rendimento. A primeira etapa da reação foi realizada adicionando-se cianeto em meio aquoso a R-(-)-carvona a 0 °C, sendo em seguida acrescentado ácido acético à mistura (Ilustração 2).

Ilustração 2: Processo de obtenção do composto ciano-carvona.



A reação ocorreu por meio da adição de 1,4 do ânion cianeto, que é termodinamicamente mais favorável e irreversível, contudo mais lenta que a adição 1,2 (Ilustração 3). Os dados de RMN ^1H da ciano-carvona estão de acordo com os descritos na literatura.

Ilustração 3: Reação de obtenção do composto ciano-carvona.



Caracterização estrutural da substância ciano-carvona

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto ciano-carvona (1S,2S,5R)-5-isopropenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Dados de ressonância magnética nuclear (RMN) obtidas da substância ciano-carvona.

N ^o	RMN ^{13}C -DEPT (50 MHz- CDCl_3)	RMN ^1H (200 MHz- CDCl_3)
	δ	δ
1	44,9	2,65-2,55 (m, 1H)
2	206,7	
3	45,8	2,63 (dd, J = 2,1; 6,6 Hz, 1H); 2,33-2,29 (m, 1H)
4	35,6	2,78 (tt, J = 3,8 Hz; 12,6 Hz, 1H)
5	32,8	2,26-2,22 (m, 1H) 2,04-1,97 (m, 1H)
6	42,2	3,38-3,32 (m, 1H)
7	12,5	1,20-1,30 (m, 3H)
8	145,5	
9	111,1	4,83 (d, J = 12,4 Hz, 2H)
10	20,4	1,77 (s, 3H)
1'	118,6	

De acordo com a reação descrita acima e os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C pode ser considerado a obtenção do composto ciano-carvona.

Animais e tratamento

Camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e peso variando de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí foram utilizados nos experimentos. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (26 ± 1 °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (Número do parecer 012/2011).

Determinação da toxicidade aguda da ciano-carvona

Para os estudos de toxicidade aguda foram usados setenta camundongos *Swiss* machos (2 meses de idade; 25 a 30 g). Os animais foram divididos em sete grupos de 10 animais por grupo ($n=10/\text{grupo}$). O grupo controle foi tratado com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% por via oral (v.o.; veículo). Os outros seis grupos foram tratados com ciano-carvona emulsionado no veículo nas doses de 25, 50, 75, 500, 1000 e 2000 mg kg^{-1} . (v.o).

Durante 14 dias de observação e a cada 2 dias foram observados os animais de todos os grupos. Durante esse período os seguintes parâmetros relacionados ao comportamento dos animais foram observados o estado de consciência e a disposição (aparência geral, frêmito vocal e irritabilidade), a coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de toque, contorção abdominal, marcha e reflexos de endireitamento), o tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar e ataxia), os reflexos (auricular, corneal, midríase e miose), a atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômenos de “straub”, sedação, hipnose e anestesia) e a atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptose palpebral, micção/defecação, piloereção, hipotermia, respiração e sudorese).

Após o tratamento agudo os animais foram observados durante 14 dias consecutivos. Após o décimo quarto dia de observação os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg kg^{-1} , i.p.) e em seguida foi feita à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro dos grupos tratados com as doses de 25, 50 e 75 mg kg^{-1} . O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante EDTA

(Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

O material para análise bioquímica foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total e triglicerídeos. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST[®].

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

Determinação dos efeitos da ciano-carvona na atividade locomotora de camundongos

A atividade locomotora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico com paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm e dividido em 9 quadrantes iguais (ARCHER, 1973). Nesse protocolo experimental foram usados quarenta e cinco camundongos *Swiss* machos (2 meses de idade; 25 a 30 g). Os animais foram divididos em cinco grupos. O grupo controle foi tratado com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% por via oral (veículo; n=12) e o grupo controle positivo foi tratado com diazepam por via oral (2 mg kg⁻¹, n=12). Os outros três grupos foram tratados com ciano-carvona emulsionado no veículo nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ (v.o, n =7 por grupo).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), o teste foi realizado durante 5 minutos.

Determinação dos efeitos ansiolíticos da ciano-carvona em camundongos

Neste experimento foram utilizados cinco grupos. O grupo controle foi tratado com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% por via oral (veículo; n=12) e o grupo controle positivo foi tratado com diazepam por via oral (2 mg kg⁻¹, n=12). Os outros três

grupos foram tratados com ciano-carvona emulsionado no veículo nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ (v.o; n=7, por grupo). Trinta minutos após os tratamentos cada animal foi colocado no centro do labirinto, colocada em direção ao braço fechado e observado por um período de cinco minutos, registrando-se o número de entradas e o tempo total de permanência em ambos os braços, abertos e fechados. Esse teste objetiva verificar o possível efeito ansiolítico da ciano-carvona, uma vez que drogas ansiolíticas levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1986).

Determinação da coordenação motora dos camundongos tratados com ciano-carvona

O teste do *rota rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Neste experimento foram utilizados cinco grupos. O primeiro grupo foi tratado com veículo (controle; n=12), o segundo grupo com diazepam (2 mg kg⁻¹, v.o; controle positivo; n=12) e os demais grupos foram tratados com ciano-carvona nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ (v.o, n=7). Para este teste, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de 3 minutos. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

Análises estatísticas

Os valores foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas através 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 de $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diversas aplicações da carvona e seus derivados que podem ser utilizados como fragrâncias, saporificantes, flavorizantes e agentes antimicrobianos (BAUER et al., 2001; SOUSA et al., 2007b; GONÇALVES et al., 2010), bem como pela sua relevância no campo da medicina (HUERGO, RETAMAR, 1973; KUNANUSORN et al., 2011), justificam o interesse neste monoterpene de origem sintética, uma vez que podemos detectar efeitos que podem ser explorados pela indústria farmacêutica provavelmente com menores custos e menor incidência de reações adversas (CARVALHO; FONSECA, 2006; ALMEIDA et al., 2008).

A ciano-carvona é um monoterpreno membro do grupo químico das cetonas cíclicas insaturadas de cadeia simples. Este monoterpreno ainda não é empregado em processos industriais. Com base em estudos anteriores realizados com a carvona verificou-se a presença de atividade no SNC que depende do estado de conformação da molécula quiral (BUCHBAUER et al., 2005). Baseado nisso, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda do derivado ciano-carvona já que na literatura não há relatos de estudos sobre a toxicidade desta substância. Em seguida os testes comportamentais para avaliar o possível efeito ansiolítico da ciano-carvona. No entanto, posteriormente novos estudos são necessários para elucidar seu mecanismo de ação no SNC.

Neste estudo não foi possível determinar a dose letal 50% (DL₅₀) da ciano-carvona devido ausência de morte dos animais durante os 14 dias após a administração da droga. A ciano-carvona não alterou de forma significativa a massa corpórea dos animais, bem como não produziu mudanças no consumo de água, ração e na produção de excretas. Após a administração oral de ciano-carvona foram observadas discretas alterações nos parâmetros, como estado de consciência e disposição, sistema motor e muscular, que se revelaram diminuídos, bem como os animais apresentaram respiração ofegante, agitação, sudorese, grunido e piloereção. Durante o tratamento essas alterações foram normalizadas, e não foram observados sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada (Tabela 2).

Após o período de observação os animais foram eutanasiados e dissecados para análise morfológica macroscópica dos principais órgãos. Durante essa análise percebemos que não houve alteração morfológica macroscópica no estômago, fígado, rins, pulmões, cérebro e coração dos camundongos tratados com as doses estudadas do composto sintético ciano-carvona durante o período de 14 dias de observação.

Conforme descrito vários monoterprenos, como o α -terpineol, álcool perilíco, carveol, como também a carvona apresentam atividade antioxidante, sugerindo que esses compostos podem ser usados na prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas (BICAS et al., 2011). Dessa forma, a ciano-carvona como análogo da carvona também pode ser um agente promissor no tratamento de doenças neurodegenerativas, sendo necessário, portanto, a avaliação da toxicidade aguda para garantir o seu uso seguro em humanos.

Tabela 2: Efeitos da administração aguda por via oral da ciano-carvona em camundongos durante 14 dias de observação.

Doses (mg kg ⁻¹)	Camundongos			Sinais e sintomas de toxicidade
	n/Dose	Sexo	Mortalidade	
00	05	Macho	0/5	-
	05	Fêmea	0/5	
25	05	Macho	0/5	Respiração ofegante e agitação.
	05	Fêmea	0/5	
50	05	Macho	0/5	Respiração ofegante e agitação.
	05	Fêmea	0/5	
75	05	Macho	0/5	Respiração ofegante e agitação.
	05	Fêmea	0/5	
500	05	Macho	0/5	Respiração ofegante e agitação.
	05	Fêmea	0/5	
1000	05	Macho	0/5	Respiração ofegante, agitação e frênilo vocal.
	05	Fêmea	0/5	
2000	05	Macho	0/5	Respiração ofegante, agitação e frênilo vocal.
	05	Fêmea	0/5	

A avaliação da toxicidade aguda demonstrou que a ciano-carvona não produziu alterações de importância clínica. Em nossos estudos comportamentais nenhum animal morreu e poucos apresentaram alterações comportamentais decorrentes da administração dessa substância. Vários estudos com a carvona demonstram sua ampla aplicabilidade. Este composto pertencente à classe química das cetonas é também reconhecido como um agente eficaz para induzir a expressão da enzima de desintoxicação glutatona S-transferase, que tem uma ação quimiopreventiva, uma vez que a atividade anticarcinogênica é correlacionada com a capacidade de induzir o aumento da atividade dessa enzima responsável pela desintoxicação humana (BAUER et al., 2001). Reforçando, assim, a necessidade de estudos toxicológicos e comportamentais de derivados sintéticos e/ou semi-sintéticos deste composto.

A avaliação hematológica realizada após tratamento agudo com as doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ não apresentou alteração nos glóbulos vermelhos do sangue, bem como não houve alteração na concentração de hemoglobina e hematócrito. Em relação ao hematócrito e aos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) também não houve mudança significativa após o tratamento agudo com as doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ de ciano-carvona por via oral

(Tabela 3). Outros trabalhos corroboram com o nosso estudo, uma vez que outros monoterpenos também demonstram ausência de toxicidade pela avaliação dos parâmetros hematológicos (HOSSEINZADEH; TALEBZADEH, 2005; HARIRI et al., 2011).

Nenhuma alteração no conteúdo das células totais como os leucócitos foi detectada. Os resultados dos exames hematológicos são resumidos na tabela 3. Em relação aos leucócitos não houve nenhuma mudança significativa, assim como nos neutrófilos contados ($p > 0,05$), semelhantes a outros estudos encontrados com extratos e substâncias isoladas que podem ser usados de forma segura e com eficácia no SNC (HUTCHINSON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com ciano-carvona por via oral.

Parâmetros	Veículo (0,1 ml/10g)	Ciano- carvona (25 mg kg ⁻¹)	Ciano- carvona (50 mg kg ⁻¹)	Ciano- carvona (75 mg kg ⁻¹)
Hemácias (mm ³)	8,09 ± 0,24	8,11 ± 0,51	7,95 ± 0,31	8,30 ± 0,47
Hemoglobina (g/dL)	13,37 ± 0,15	13,9 ± 0,87	13,02 ± 0,54	13,1 ± 0,78
Hematócrito (%)	39,15 ± 0,30	39,5 ± 2,71	39,75 ± 1,74	39,0 ± 2,4
VCM (fL)	60,09 ± 0,28	61,01 ± 1,48	59,89 ± 2,45	59,09 ± 1,65
HCM (pg)	20,99 ± 0,34	21,13 ± 0,38	21,15 ± 0,74	20,69 ± 0,57
CHCM (g/dL)	35,09 ± 0,62	34,45 ± 0,51	34,03 ± 0,52	34,75 ± 0,46
Neutrófilos (%)	18,66 ± 0,03	18,52 ± 2,01	18,01 ± 1,82	18,50 ± 4,8
Linfócitos (%)	78,49 ± 0,31	78,50 ± 2,71	79,55 ± 2,13	78,50 ± 5,02

Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos *Swiss* tratados por via oral com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, n = 10) e ciano-carvona nas doses 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ e observados durante 24 horas (n = 10 por grupo). 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 tabela 4 demonstra o efeito do tratamento agudo com ciano-carvona nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ (v.o.) nos parâmetros bioquímicos do soro obtido de camundongos após 14 dias de observação. A ciano-carvona nas doses administradas não alterou de forma significativa os níveis plasmáticos dos parâmetros bioquímicos. Os resultados obtidos para os parâmetros glicose, uréia, creatinina e triglicerídeos em nosso estudo estão de acordo com os valores de referência. Conforme podemos constatar após realização da análise estatística, que

demonstrou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com as diferentes doses do composto ciano-carvona e o grupo controle tratado com veículo.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com ciano-carvona por via oral.

Parâmetros	Veículo (0,1 ml/10g)	Ciano- carvona (25 mg kg ⁻¹)	Ciano- carvona (50 mg kg ⁻¹)	Ciano- carvona (75 mg kg ⁻¹)
Glicose (mg/dL)	91,15 ± 9,69	90,10 ± 10,1	89,89 ± 8,29	89,39 ± 11,7
Uréia (mg/dL)	52,89 ± 1,44	51,80 ± 3,65	51,01 ± 1,33	51,33 ± 3,91
Creatinina (mg/dL)	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,59	0,57 ± 0,53	0,56 ± 0,57
Triglicerídeos (mg/dL)	105,6 ± 3,12	109,4 ± 10,5	104,6 ± 8,5	106,0 ± 7,7
AST (U/mL)	49,67 ± 3,62	48,2 ± 5,81	50,60 ± 2,15	48,90 ± 7,17
ALT (U/mL)	91,67 ± 1,92	91,2 ± 12,62	92,6 ± 10,69	91,01 ± 6,09

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss* tratados por via oral com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, $n = 10$) e ciano-carvona nas doses 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ e observados durante 24 horas ($n = 10$ por grupo). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos.

Posteriormente foi avaliado os efeitos ansiolíticos no teste do campo aberto (Tabela 5) e as doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ da ciano-carvona não alterou o número de *groomings* quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). Por fim, reforçando o emprego da ciano-carvona como possível agente ansiolítico em novas formulações farmacêuticas foi observado que as doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ reduzem o número de *rearing* de 85,3% ($6,80 \pm 0,86$), 83% ($6,00 \pm 0,70$) e 86% ($5,00 \pm 1,88$), quando comparado ao grupo controle ($35,38 \pm 1,86$; $p < 0,05$), respectivamente. Em comparação ao grupo diazepam ($13,29 \pm 2,81$; $p < 0,05$) também foi verificada uma diminuição significativa no número de *rearing*s. Dados semelhantes foram encontrados para outros monoterpenos como o citrol, mirceno e limoneno (VALE et al., 2002). Quando o animal é colocado em uma ambiente estranho há uma diminuição do apoio do animal sobre as patas traseiras (*rearing*) variando de acordo com o estresse sofrido pelo animal (BARBOSA et al., 2008) aumentando as tentativas e ações de levantar-se, assim a droga testada diminuiu o número de *rearing*s, sugerindo que a ciano-carvona possui um possível efeito ansiolítico. Dessa forma, verificamos uma redução no número de cruzamentos de 54,32, 52,06 e 44,49% nas doses de 25 mg kg⁻¹ ($40,60 \pm 9,61$), 50 mg kg⁻¹ ($42,60 \pm 4,55$) e

75 mg kg⁻¹ (49,33 ± 5,01), quando comparado ao controle (88,86 ± 3,09; p< 0,001), respectivamente.

Tabela 5: Efeitos da ciano-carvona no teste de campo aberto em camundongos.

Grupos (n)	Número de cruzamentos	Número de Rearing	Número de Grooming
Controle (12)	88.86 ± 3.09	35.38 ± 2.71	4.25 ± 0.49
Diazepam (12)	29.00 ± 1.79 ^a	13.29 ± 1.06 ^a	2.28 ± 0.52 ^a
Ciano-carvona 25 (7)	40.60 ± 9.61 ^a	6.80 ± 0.86 ^a	4.30 ± 3.35
Ciano-carvona 50 (7)	42.60 ± 4.55 ^{a,b}	6.00 ± 0.70 ^{a,b}	4.29 ± 0.87
Ciano-carvona 75 (7)	49.33 ± 5.01 ^{a,b}	5.00 ± 1.88 ^{a,b}	4.28 ± 1.42

Os valores foram expressos como a média ± E.P.M. para o número de cruzamentos com as quatro patas, número de *grooming* e o número de *rearing* dos animais utilizados nos experimentos. ^ap<0,01 (ANOVA seguido de *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo controle. ^bp<0,001 (seguido de *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam.

Para avaliar um possível efeito sedativo da ciano-carvona, camundongos adultos foram tratados com as mesmas doses que produziram efeito ansiolítico nos modelos empregados e foram submetidos ao teste do *rota rod* (Tabela 6), que consiste em colocar camundongos sobre uma barra giratória a uma velocidade constante e verificar o tempo de permanência (TP) por meio da capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma. Em nenhuma das doses testadas (25 mg kg⁻¹: TP = 174,1 ± 3,19 s; 50 mg kg⁻¹: TP = 174,9 ± 3,68 s; 75 mg kg⁻¹: TP = 174,7 ± 1,66 s) houve alteração no TP em segundos (s) sobre a barra giratória sugerindo que não induz mudanças na atividade locomotora dos animais quando comparado ao grupo controle (TP = 175,3 ± 1,29 s; p>0,05).

Também não foi verificada nenhuma alteração no número de quedas nos grupos tratados com ciano-carvona nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹ por via oral quando comparado ao grupo controle (p>0,05), sugerindo que este monoterpene não produz efeito relaxante muscular e não altera a coordenação motora. Por outro lado, o diazepam usado como droga de referência foi capaz de reduzir o tempo de permanência e de aumentar o número de quedas, demonstrando sua capacidade de provocar relaxamento muscular. Dessa forma, podemos sugerir que o composto avaliado apresenta um possível efeito sedativo, semelhante ao diazepam no teste do campo aberto, mas por outro lado demonstra um melhor potencial farmacológico de importância clínica, uma vez que não altera a coordenação motora.

Tabela 6: Efeitos da ciano-carvona no teste do *rota rod* em camundongos

Grupos (n)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Controle (12)	1.70 ± 0.26	175.3 ± 1.28
Diazepam (12)	2.10 ± 0.27 ^a	171.4 ± 0.84 ^a
Ciano-carvona 25 (7)	1.70 ± 0.44	174.1 ± 3.19
Ciano-carvona 50 (7)	1.72 ± 0.35	174.9 ± 3.68
Ciano-carvona 75 (7)	1.72 ± 0.52	174.7 ± 1.65

Os valores foram expressos como a média ± E.P.M. do número de quedas e tempo de permanência em segundo do número de animais utilizados nos experimentos. ^ap<0,01 (ANOVA seguido de *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo controle.

No presente estudo foi verificado que a ciano-carvona causou uma diminuição da atividade locomotora em camundongos de forma semelhante aos benzodiazepínicos que são utilizados como referência de fármaco ansiolítico, sugerindo que o composto sintético avaliado em diferente modelos experimentais pode apresentar efeitos no SNC por meio do sistema GABAérgico. A avaliação da capacidade de limpeza em um lugar desconhecido permite não apenas a avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação ansiolítica (OLSEN, 2000).

Para determinar o possível efeito ansiolítico da ciano-carvona foi utilizado o teste de labirinto em cruz elevado (Tabela 7). O aparato consiste de dois braços abertos, dois braços fechados e uma plataforma central, dispostas de tal forma que os dois ramos de cada lado ficam opostos um ao outro. O labirinto em cruz elevado foi realizado após trinta minutos à administração da ciano-carvona (25 e 50 e 75 mg kg⁻¹) ou diazepam (1 mg kg⁻¹), a estatística revelou efeitos significativos da ciano-carvona sobre a porcentagem de entradas para os braços abertos na maior dose testada (75 mg kg⁻¹) houve um aumento de 33,05%, quando comparado ao grupo controle. Apesar de que não houve alteração significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos nas menores doses (25 e 50 mg kg⁻¹), quando comparado ao grupo controle (p>0,05; Tabela 7). Os efeitos sobre a exploração de braços abertos após o tratamento com a ciano-carvona na maior dose sugere um possível efeito ansiolítico sobre o SNC.

Nossos resultados demonstram que as doses de 25 e 50 mg kg⁻¹ não altera os parâmetros NEBA, PEBA, TPBA e PTBA, avaliados no teste do labirinto em cruz elevado quando comparados ao grupo controle. Por sua vez a dose de 75 mg kg⁻¹ de ciano-carvona aumentou de forma significativa todos os parâmetros avaliados em comparação ao grupo controle. Além disso, esse aumento foi semelhante ao observado com o grupo tratado com

diazepam (droga de referência), sugerindo que a dose de 75 mg kg⁻¹ apresenta efeitos ansiolíticos, com menor efeito sedativo e relaxante muscular. No entanto, futuros estudos devem ser realizados com o uso de drogas antagonistas de diferentes sistemas para esclarecer o seu mecanismo de ação ansiolítico

Tabela 7: Efeito da ciano-carvona no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.

Grupos (n)	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
Controle (12)	10.67 ± 0.74	40.00 ± 2.25	122.5 ± 6.37	40.75 ± 2.16
Diazepam (12)	15.71 ± 0.28 ^a	75.43 ± 2.08 ^a	208.4 ± 3.57 ^a	69.25 ± 1.26 ^a
Ciano-carvona 25 (7)	10.40 ± 0.65	41.32 ± 10.08	123.3 ± 8.00	41.9 ± 3.71
Ciano-carvona 50 (7)	10.65 ± 0,74	40.25 ± 9.85	120.4 ± 12.05	42.06 ± 3.42
Ciano-carvona 75 (7)	14.57 ± 0.80 ^a	73.05 ± 4.04 ^a	210.4 ± 17.58 ^a	64.65 ± 3.02 ^a

Os valores foram expressos como a média ± E.P.M. do número de entradas nos braços abertos (NEBA); da porcentagem de entradas nos braços abertos PEBA (PEBA); do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA); e da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) do número de animais utilizados nos experimentos. ^ap<0,01 (ANOVA seguido de *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo controle.

Estudos químicos têm relatado a presença de vários monoterpenóides principalmente α e β -tujona e carvona, juntamente com limoneno, sabineno, β -pineno, carvacrol e eucarvona (FESTER et al., 1956; GATTO et al., 1981; CABANILLAS et al., 2003) apresentando efeitos antidepressivos e ansiolíticos. Recentemente os efeitos de monoterpenóides (álcool e cetonas) foram investigados em receptores humanos recombinantes GABA_A (HALL et al., 2004), esse envolvimento do sistema GABAérgico pode mimetizar as drogas benzodizepínicas com menos efeitos colaterais inerentes a essas drogas, o que pode sugerir um possível mecanismo GABAérgico no tratamento clínico da ansiedade.

CONCLUSÃO

O estudo realizado sobre a toxicidade aguda em camundongos demonstrou que a ciano-carvona nas doses avaliadas não produz alterações hematológicas e bioquímicas durante o período de 14 dias de observação, bem como não produz alteração morfológica nos principais órgãos. Com base nos estudos comportamentais podemos sugerir um possível efeito ansiolítico para a ciano-carvona. No entanto, mais estudos sobre a toxicidade subcrônica e crônica da ciano-carvona são necessários, bem como novos estudos em modelos experimentais de ansiedade fazendo uso de antagonistas são necessários para garantir seu uso de forma segura em problemas relacionados à saúde humana, principalmente na ansiedade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio técnico do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível técnico (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N.; SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ARAÚJO, D.A.M.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Anticonvulsant effect of a natural compound α,β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neuroscience Letters**, v. 443, p. 51–55, 2008.
- ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON, C.L.; KAPPEL, V.D.; MARTINS, M.R.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F.H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 282-288, 2008.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. **Wiley-VCH**, v. 4, p. 168-227, 2001.
- BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1610-1615, 2011.
- BUCHBAUER, G.; JAGER, W.; GRUBER, A.; DIETRICH, H. R-(+)- and S(-)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 686-689, 2005.

- CABANILLAS, C.M.; LOPEZ, M.L.; DANIELE, G.; ZYGADLO, J.A. Essential oil composition of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke under rust disease. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 446-448, 2003.
- CARLINI, E.A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.
- CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemical**, v. 95, p. 413-422, 2006.
- EHLERT, P.A.D.; CHAVES, F.C.M.; MING, L.C.U.; SILVA, M.A.S. Effect of substrata on the development of stem cuttings of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. limonene- carvone chemotype. **Horticultura Brasileira**, v. 576, p. 259-262, 2002.
- FESTER, G.A.; MARTINUZZI, E.A.; RETAMAR, J.A.; RICCIARDI, Y. The essential oils of Cordoba and San Luis Argentina. **Boletin de la Academia Nacional de Ciências**, v. 39, p. 375-378, 1956.
- GATTO, Z.H.; RETAMAR, J.A.; CATALAN, C. Essential oil of *Aloysia polystachya* and chemical rearrangement of thujone. **Essenze Derivati Agrumari**, v. 51, p. 109-120, 1981.
- GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A.M.H.; ARAÚJO, A.E.V.; SANTOS-CRUZ, J.; ARAÚJO, D.A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 108-112, 2010.
- HALL, A.C.; TURCOTTE, C.M.; BETTS, B.A.; YOUNG, W.Y.; AGYEMAN, A.S.; BURK, L.A. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, p. 9-16, 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, p. 499-504, 2011.

- HOSSEINZADEH, H.; TALEBZADEH, F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. **Fitoterapia**, v. 76, p. 722-724, 2005.
- HUERGO, H.H.; RETAMAR, J.A. Essential oils of Tucumán Province Essence of *Aloysia polystachya*. **Archivos de Farmacia y Bioquímica de Tucumán**, v. 18, p. 15-18, 1973.
- HUTCHINSON, A.C.; SIMPSON, G.R.; RANDALL, J.F.; ZHANG, X.; CALDERON, S.N.; RICE, K.C.; RILEY, A.L. Assessment of SNC 80 and naltrindole within a conditioned taste aversion design. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, p. 779-787, 2000.
- KUNANUSORN, P.; PANTHONG, A.; PITTAYANURAK, P.; WANAUPPATHAMKUL, S.; NATHASAEN, N.; REUTRAKUL, V. Acute and subchronic oral toxicity studies of *Nelumbo nucifera* stamens extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 789-795, 2011.
- OLIVEIRA, R.B.; NASCIMENTO, M.V.M.; VALADARES, M.C.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; CUNHA, L.C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 485-491, 2008.
- OLSEN, R.W. Absinthe and γ -aminobutyric acid receptors. **PNAS**, v. 97, p. 4417-4418, 2000.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.
- SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007a.

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, p. 170-175, 2007b.

SOUSA, D.P.; RAPHAEL, E.; BROCKSON, T.J. Synthesis of (R)-(-)-Carvone Derivatives. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65, p. 1381-1383, 2010.

TAPP, R.; ELIEL, M.; DOLAN, D.D.; ALTSCHULER, R.A.; GAUVIN, D.V.; BAIRD, T.J. Comparison of pigmented and albino guinea pigs for use in ototoxicity modeling. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 60, p. 210-258, 2009.

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

**CAPÍTULO IV: Formulações farmacêuticas à base da ciano-carvona para
tratamento de doenças neurodegenerativas**

**Pedido de Registro de Patente submetido ao INPI por meio do Núcleo de
Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Piauí.**

RESUMO

“FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DA CIANO-CARVONA PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS”

A presente invenção diz respeito ao desenvolvimento das formulações farmacêuticas à base da ciano-carvona (1S,2S,5R)-5-isoprenil-2-metil-3-oxo-ciclohexanocarbonitrila) um derivado sintético da carvona, para tratamento da ansiedade, depressão e epilepsia. A presente invenção refere-se ao potencial ansiolítico, antidepressivo e anticonvulsivante da ciano-carvona e a sua utilização na formulação de produto(s) farmacêutico(s) para tratamento dessas patologias relacionadas com o sistema nervoso central.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se inferir que a ciano-carvona nas doses avaliadas não produz alterações hematológicas e bioquímicas e não foi possível calcular a dose letal (DL_{50}) já que não houve nenhuma morte. Com base nos estudos comportamentais podemos sugerir um possível efeito ansiolítico, assim como atividade anticonvulsivante por meio do modelo de epilepsia induzida por pilocarpina. Os resultados dos efeitos antioxidantes *in vitro* com a ciano-carvona apresentou um forte potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção contra radicais hidroxilas e do óxido nítrico, bem como preveniu a formação de TBARS.

Foi realizado o depósito de pedido de patente submetido ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (UFPI) – nº 000172.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA**

- **Artigos Publicados**

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; LIMA, T.C; SANTOS, P. S.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2012

- **Artigos Submetidos**

COSTA, D.A.; COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUZA, G.F. ; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. Artigo submetido à **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. "Avaliação da atividade antioxidante in vitro da ciano-carvona: um composto natural. Artigo submetido à **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.

- *Depósito de pedido de patente*

COSTA, D.A; COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; SANTOS, P.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Formulações farmacêuticas à base da ciano-carvona para tratamento de dorças neurodegenerativas - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de protocolo: 000172.

- *Apresentações de Trabalhos Científicos*

COSTA, D.A.; COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. **Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético de um composto natural**. Apresentação Oral na Escola de Verão de Farmacognosia, realizado em Diamantina, MG, no período de 10 a 15 de fevereiro de 2012.

COSTA, D.A ; SABINO, E.B.; MORENO, L.C.G.E.A.I.; SILVA, F.O.; FREITAS, R.M. **Delineamento de um novo composto antioxidante (F011) com propriedades no sistema**

nervoso central (SNC). Apresentação de Pôster no Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

COSTA, D.A ; SABINO, E.B.; MORENO, L.C.G.E.A.I.; SILVA, F.O.; FREITAS, R.M. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e anticonvulsivante in vivo de um novo composto (F011).** Apresentação de Pôster no Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SABINO, E.B.; COSTA, D.A ; SOUSA, G.F.; MORENO, L.C.G.E.A.I.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M.; SOBRINHO, J.L.S.; **Avaliação histopatológica cerebral de novo composto e complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina.** Apresentação de Pôster no Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SABINO, E.B.; SOUSA, G.F.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; FREITAS, R.M.; COSTA, D.A; MORENO, L.C.G.E.A.I.; SOBRINHO, J.L.S.; **Avaliação da toxicidade aguda de novo composto e seu complexo de inclusão com s β CD: Ação central.** Apresentação de Pôster no Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

MORENO, L.C.G.E.A.I.; COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; SABINO, E.B.; MAGALHAES, N. S.S.; FREITAS, R.M.; SANTOS, H.M.L.R. **Evaluation of a liposome dihydropyridines (lcn) derivative on forced swimming test.** Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

COSTA, J.P.; SANTOS, P.S.; CAMPELO, L.M.L.; COSTA, D.A.; SABINO, E.B.; MORENO, L.C.G.I.; SILVA, O.A.; FREITAS, R.M. **Ubiquinone effects on histopathological changes after pilocarpine-induced seizures.** Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

SABINO, E.B.; CAMPELO, L.M.L. ; COSTA, D.A ; COSTA, J.P.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SOBRINHO, J.L.S.; FREITAS, R.M. **Anxiolytic-like effects of 5TIO1 in mice: open**

field and elevated plus maze tests. Apresentação de Pôster na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Rio de Janeiro, RJ, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.

ANEXOS

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

FW: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão

To: rivelilson@pq.cnpq.br
> Subject: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão
> Date: Mon, 27 Feb 2012 21:00:30 -0300
> From: seerfcfar@gmail.com
>
> Rivelilson Mendes Freitas,
>
> Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Avaliação da atividade
> antioxidante in vitro da ciano-carvona: um composto natural" para {\$Revista
> de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada}.
>
> URL do Manuscrito:
> http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/2242
> Login: river
>
> Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:
> rcfba@fcfar.unesp.br.
> Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir
> ao público seu trabalho.
>
>
> {\$Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta}
> {\$Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda}
> {\$Editores}
> Rivelilson Mendes de Freitas
> Prof. Dr. Cleópatra da Silva Planeta
> Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
> http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index
> rcfba@fcfar.unesp.br

ANEXO B: Artigo aceito pela Revista Cellular and Molecular Neurobiology

Cell Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s10571-012-9812-8

ORIGINAL RESEARCH

Anticonvulsant and Antioxidant Effects of Cyano-carvone and Its Action on Acetylcholinesterase Activity in Mice Hippocampus

Dayane Alves Costa · Guilherme Antônio Lopes de Oliveira ·
Tamires Cardoso Lima · Pauline Sousa dos Santos ·
Damião Pergentino de Sousa · Rivellison Mendes de Freitas

Received: 6 December 2011 / Accepted: 4 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The anticonvulsant effect of cyano-carvone, a monoterpene monocyclic, was investigated in epilepsy model induced by pilocarpine. Cyano-carvone at doses of 25, 50 or 75 mg/kg promoted a reduction of 16.7, 33 and 66.7%, respectively, against pilocarpine-induced seizures, and it was efficacious in increasing both the latency to first seizures and the survival percentage, resulting in 33.3, 67 and 91.7% of protection against death induced by seizures, respectively ($P < 0.05$). The reference drug atropine (25 mg/kg) also produced a significant protection (100%). Its monoterpene, at 25, 50 and 75 mg/kg, was also capable to increase the latency for installation of status epilepticus induced by pilocarpine, and presented a significant protection against lipid peroxidation and nitrite formation in mice hippocampus ($P < 0.05$). In addition, it was observed that the cyano-carvone pretreatment increased the acetylcholinesterase activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. The present results clearly indicate the anticonvulsant ability of cyano-carvone, which can be, at least in part, explained by the increased activity of the acetylcholinesterase enzyme. Our data suggest

that the action mechanism can also be due to a direct activation of the antioxidant enzymes that could be associated with a reduction observed in oxidative stress in mice hippocampus, probably involving an inhibition of free radical production.

Keywords Acetylcholinesterase · Cyano-carvone · Oxidative stress · Pilocarpine · Seizures

Introduction

There is evidence that greater formation of free radicals can occur in processes of pilocarpine-induced seizures (Freitas et al. 2005; Barros et al. 2007; Xavier et al. 2007), with consequent changes to monoamines levels (Cavalheiro et al. 1994), acetylcholinesterase activity (Freitas et al. 2006), nitrite content and especially unsaturated lipids present in the cell membrane (Santos et al. 2011a). Moreover, other consequences of this process are the presence of changes in δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase, and Mg^{2+} -ATPase activities (Freitas et al. 2011), alterations on muscarinic and dopaminergic receptors (Marinho et al. 1998), phospholipid peroxidation, changes in nitric oxide metabolism (Tomé et al. 2010a) and neuronal damage (Santos et al. 2011b).

These deleterious effects can be attenuated by interfering or modulating the physiopathological processes that occur during pilocarpine-induced seizures (Militão et al. 2010). In addition, the deleterious effects of free radicals can be inhibited by the presence of antioxidant substances such as ascorbic acid (Tomé et al. 2010b), alpha-tocopherol (Barros et al. 2007), lipoic acid (Freitas 2009) and ubiquinone (Santos et al. 2010), which can inhibit the occurrence of lipid peroxidation and nitrite formation. However, the search for new antioxidant compounds with therapeutic

D. A. Costa · G. A. L. de Oliveira · P. S. dos Santos ·
R. M. de Freitas
Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry
of Post-Graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal
University of Piauí, Teresina, Piauí CEP 64.049-550, Brazil

T. C. Lima · D. P. de Sousa
Department of Physiology, Federal University of Sergipe,
São Cristóvão, Sergipe CEP 49.100-000, Brazil

R. M. de Freitas (✉)
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacéuticas/Núcleo
de Tecnologia Farmacéutica do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal do Piauí, Ininga, Teresina,
Piauí CEP 64.049-550, Brazil
e-mail: rivellison@pq.cnpq.br

Published online: 29 February 2012

 Springer

potential for the treatment of neurodegenerative diseases is a complex and very challenging process. Thus, the current investigation was initially carried out to evaluate the anti-convulsant activity of cyano-carvone.

The use of traditional medicine is widespread and plants still represent a large source of natural antioxidants that might serve as leads for the development of novel drugs. S-(+)-carvone is the major compound of caraway oil. This monoterpene exhibits some interesting biological activities. It shows, for instance, antimicrobial (Farag et al. 1989), nematocidal (Savena et al. 1987), antitumor (Zheng et al. 1992) and plant growth regulatory properties (Reynolds 1987). In some cases, the cheaper R-(-)-carvone shows similar or some biological activities as S-(+)-carvone. So, the physiological activities of two enantiomers are not always completely different. Both enantiomers of carvone have been widely used as starting materials for enantioselective syntheses of natural products (Ho 1992). Therefore, in addition to the objectives of this study, we decided to evaluate the pharmacological potential of a synthetic derivative of carvone, cyano-carvone, on oxidative stress caused by pilocarpine-induced seizures.

Thus, the objective of the present study was to determine the anticonvulsant activity of cyano-carvone, as well as their effects on lipid peroxidation levels, nitrite content and acetylcholinesterase activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures.

Materials and Methods

Animals and Reagents

Adult male Swiss mice (25–30 g; 2 months old) were maintained in a temperature-controlled room ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-h light/dark cycle and food and water ad libitum (Nutrilaor, Campinas, Brazil). All experiments were performed according to the guide for the care and use of laboratory, the US Department of Health and Human Services, Washington, DC (1985).

The compound cyano-carvone was prepared in our laboratory as previously described (De Sousa et al. 2010). It was emulsified with 0.05% Tween 80 (Sigma, USA), dissolved in 0.9% saline (vehicle) and intraperitoneally administered at doses of 25, 50 and 75 mg/kg to anti-convulsant test. The dosages of pilocarpine hydrochloride and atropine (Sigma, USA), and cyano-carvone are expressed as milligrams per kilogram of body weight, and were administered in a volume of 10 ml/kg injected intraperitoneally (i.p.). Controls received vehicle at the same volume (10 ml/kg) and through the same route as the other treated groups. All other drugs were of analytical grade.

Experimental Procedures

A total of 108 mice were intraperitoneally treated at doses 25, 50 or 75 mg/kg cyano-carvone, atropine (25 mg/kg) or vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline). Thirty minutes following the treatments, twelve mice were randomized to pilocarpine hydrochloride administration (400 mg/kg, P400 group). Thus, there are 9 groups of mice in this set of experiments: group 1, cyano-carvone and P400 co-administration (CC 25 plus P400 group, $n = 12$); group 2, cyano-carvone and pilocarpine co-administration (CC 50 plus P400 group, $n = 12$); group 3, cyano-carvone and pilocarpine co-administration (CC 75 plus P400 group, $n = 12$); group 4, pilocarpine plus atropine treatment (positive control group, $n = 12$); group 5, pilocarpine plus vehicle treatment (P400 group, $n = 12$); group 6, cyano-carvone alone administration (CC 25 group, $n = 12$); group 7, cyano-carvone alone administration (CC 50 group, $n = 12$); group 8, cyano-carvone alone administration (CC 75 group, $n = 12$) and group 9, vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline) treatment (negative control, $n = 24$). After the treatments, the animals were recorded in 30 cm \times 30 cm chambers for latency to first seizure (any of the behavioral indices typically observed after pilocarpine administration, such as wild running, clonus, tonic and clonic-tonic seizures) and number of animals that died after pilocarpine administration. Previously, a work showed that convulsions and deaths occurred within 1 and 24 h, respectively, post-pilocarpine injection (Turski et al. 1983), so we decided to record the phenotypes of the animals for 24 h after pilocarpine administration.

At the end of observations, the survivors were killed by decapitation and their brains were dissected out on ice to remove hippocampus for determinations of lipid peroxidation level, nitrite content and acetylcholinesterase activity.

The pilocarpine administration group was constituted by those presented seizures, SE for over 30 min and non-phenotype survivors. Doses of pilocarpine (400 mg/kg) and cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg) were determined by previous studies in our laboratory.

Determinations of Lipid Peroxidation Level in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

For all experimental procedures, 10% (w/v) homogenates of the area of brain investigated were prepared for all groups. Protein concentration was measured (Larvry et al. 1951). Lipid peroxidation levels in the control animal ($n = 12$), P400 group ($n = 7$), CC 25 plus P400 group ($n = 7$), CC 50 plus P400 group ($n = 7$), CC 75 plus P400 group ($n = 7$), CC 25 group ($n = 7$), CC 50 group ($n = 7$) and CC 75 group ($n = 7$) were analyzed by measuring

the thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS) in homogenates (Draper and Hadley 1990), and expressed in nmol of malondialdehyde (MDA)/g wet tissue.

Determinations of Nitrite Content in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

To determine nitrite contents of control group ($n = 12$), P400 group ($n = 7$), CC 25 plus P400 group ($n = 7$), CC 50 plus P400 group ($n = 7$), CC 75 plus P400 group ($n = 7$), CC 25 group ($n = 7$), CC 50 group ($n = 7$) and CC 75 group ($n = 7$), the 10% (w/v) homogenates were centrifuged (800 \times g, 10 min). The supernatants were collected, and nitric oxide production was determined based on the Griess reaction (Green et al., 1981). The above results were expressed as nM.

Determinations of Acetylcholinesterase Activity in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

Acetylcholinesterase activity in the control group ($n = 12$), P400 group ($n = 7$), CC 25 plus P400 group ($n = 7$), CC 50 plus P400 group ($n = 7$), CC 75 plus P400 group ($n = 7$), CC 25 group ($n = 7$), CC 50 group ($n = 7$) and CC 75 group ($n = 7$) was measured by the method of Ellman et al. (1961) using 1 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and an incubation period of 10 min at 37°C. The results were expressed as nmol acetylthiocholine hydrolyzed/mg protein/min (nmol/mg protein/min).

Statistical Analysis

Results of latency to first seizure, neurochemical alterations were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *t* Student-Newman-Keuls as post hoc test ($P < 0.05$) (Graphpad program Inuitive, Software for Science, San Diego, CA, USA). The number of animals that seized and the number that survived were calculated as percentages (seizures percentage, status epilepticus percentage and survival percentage, respectively), and compared with a nonparametric test (χ^2).

Results

Behavioral Alterations After Pretreatment with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

Pilocarpine induced the first seizure at 7.90 ± 1.68 min. All animals treated with pilocarpine showed peripheral

cholinergic signs, tremors, stereotyped movements and generalized tonic-clonic convulsions with status epilepticus. None of these animals survived the convulsive process.

The pretreatment with cyano-carvone in doses 25, 50 or 75 mg/kg was not able to revert peripheral cholinergic signs, tremors and stereotyped movements induced by pilocarpine, but the compound caused a dose-dependent reduction in pilocarpine-induced seizures, at the doses of 25 (16.7%; $P < 0.05$), 50 (33%; $P < 0.01$) and 75 mg/kg (66.7%; $P < 0.001$). A clear protection effect was also observed with atropine (25 mg/kg), which was used as a reference drug (Table 1). As illustrated in Table 1, cyano-carvone was dose-dependently effective in increasing the latency to first seizures induced by pilocarpine at the doses of 25 (15.4%; $P < 0.05$), 50 (56%; $P < 0.01$) and 75 mg/kg (98%; $P < 0.001$).

According to Table 1, cyano-carvone caused an increase of latency for installation of status epilepticus induced by pilocarpine (400 mg/kg) at doses of 25 (17.4%; $P < 0.05$), 50 (24.1%; $P < 0.01$) and 75 mg/kg (49.9%; $P < 0.001$). Table 1 shows that cyano-carvone significantly increased the survival rate after pilocarpine-induced seizures at doses of 25 (33.3%; $P < 0.05$), 50 (83.3%; $P < 0.01$) and 75 mg/kg (91.7%; $P < 0.001$). The reference drug atropine (25 mg/kg) also produced a significant protection (100%; $P < 0.001$). None of the control animals (vehicle, atropine or cyano-carvone) presented behavioral changes (Table 1).

Lipid Peroxidation Level in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

The effects of cyano-carvone in lipid peroxidation levels during seizures induced by pilocarpine are presented in Fig. 1. Lipid peroxidation was markedly increased in P400 group in comparison to the vehicle group. During acute phase of seizures induced by pilocarpine, a significant increase (55%) in TBARS was observed ($P < 0.0001$). Cyano-carvone pretreated mice showed decreases in lipid peroxidation level (89.5, 88.1 and 85.7%) in CC 25, CC 50 and CC 75 groups, when compared with the P400 group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 1). Similarly, cyano-carvone pretreated mice showed decreases in lipid peroxidation level (83.8, 81.6 and 77.9%) in CC 25, CC 50 and CC 75 groups, when compared with the vehicle group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 1). In addition, the pretreatment with cyano-carvone also reduced lipid peroxidation level (93.8, 94.3 and 92.9%) in CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400 groups, when compared to the P400 group, respectively ($P < 0.001$; Fig. 1). Likewise, the pretreatment with cyano-carvone reduced lipid peroxidation level (90.4, 91.1 and 88.9%) in CC 25 plus P400, CC

Table 1 Effect of pretreatment with cyano-carvone (CC) on pilocarpine-induced seizures, status epilepticus and lethality in adult mice

Groups	Latency to first seizure (min)	Latency to SE (min)	Percentage seizures	Percentage SE	Percentage survival	Number of animals/group
P400	7.90 ± 1.68	14.95 ± 1.57	100	100	00	12
Ampire plus P400	00	00	00	00	100	12
CC 25 plus P400	9.12 ± 1.95 ^b	17.56 ± 2.4 ^d	83.3 ^b	83.3 ^b	53.3 ^c	12
CC 50 plus P400	12.33 ± 1.25 ^{b,c}	18.50 ± 1.9 ^{b,c}	67 ^{b,c}	67 ^{b,c}	83.3 ^{b,c}	12
CC 75 plus P400	18.65 ± 2.28 ^{b,c,d}	22.42 ± 2.41 ^{b,c,d}	33.3 ^{b,c,d}	33.3 ^{b,c,d}	91.7 ^{b,c,d}	12

Animals were pretreated acutely, intraperitoneally, with cyano-carvone at dose 25, 50 or 75 mg/kg (i.p.) and 30 min afterwards received pilocarpine 400 mg/kg (P400, i.p.). Results for latency to first seizure and latency to status epilepticus (SE) were expressed as mean ± SEM of the number of experiments shown in the table. Result for percentage seizures, percentage status epilepticus (SE) and percentage survival were expressed as percentages of the number of animals from each experimental group. ^a $P < 0.05$ as compared with P400 group (χ^2 -test).

^b $P < 0.05$ as compared with CC 25 plus P400 group (χ^2 -test).

^c $P < 0.05$ as compared with CC 50 plus P400 group (χ^2 -test).

^d $P < 0.05$ as compared with P400 group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test).

^e $P < 0.05$ as compared with CC 25 plus P400 group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test).

^f $P < 0.05$ as compared with CC 50 plus P400 group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test).



Fig. 1 Effects of cyano-carvone (CC) on status of lipid peroxidation level in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. Male mice (25–30 g, 2 months old) were intraperitoneally treated with a single dose of pilocarpine (400 mg/kg, $n = 12$, P400 group), cyano-carvone group with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg, $n = 12$, CC 25, CC 50 and CC 75 groups) and the control animals with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, $n = 12$, control group). The CC plus P400 groups were pretreated with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg) for 30 min prior to pilocarpine injection (400 mg/kg, $n = 12$, CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400 groups). Results are expressed as mean ± SEM for the number of animals shown inside in parenthesis. Differences in experimental groups were determined by two-tailed analysis of variance (ANOVA). ^a $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test); ^b $P < 0.05$ compared to the pilocarpine group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test).

50 plus P400 and CC 75 plus P400 groups, when compared to the vehicle group, respectively ($P < 0.001$; Fig. 1).

Nitrite Content in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

The effects of cyano-carvone in nitrite concentration during seizures induced by pilocarpine are presented in Fig. 2. Nitrite content was markedly increased in P400 group in



Fig. 2 Effects of cyano-carvone (CC) on nitrite content in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. Male mice (25–30 g, 2 months old) were intraperitoneally treated with a single dose of pilocarpine (400 mg/kg, $n = 12$, P400 group), cyano-carvone group with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg, $n = 12$, CC 25, CC 50 and CC 75 groups) and the control animals with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, $n = 12$, control group). The CC plus P400 groups were pretreated with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg) for 30 min prior to pilocarpine injection (400 mg/kg, $n = 12$, CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400 groups). Results are expressed as mean ± SEM for the number of animals shown inside in parenthesis. Differences in experimental groups were determined by two-tailed analysis of variance (ANOVA). ^a $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test); ^b $P < 0.05$ compared to the pilocarpine group (ANOVA and *t* Student–Newman–Keuls as post hoc test).

comparison to the vehicle group. During acute phase of seizures induced by pilocarpine, a significant increase (47%) in hippocampal nitrite content was observed (49%; $P < 0.0001$; Fig. 2). The pretreatment with cyano-carvone at doses of 25, 50 and 75 mg/kg decreased the nitrite content (94.2, 92.5 and 92%) when compared with the P400 group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 2). Likewise, the animals pretreated with cyano-carvone at doses 25, 50 and 75 mg/kg showed decrease in nitrite content (91.4, 88.8 and 88.1%) when compared with the vehicle group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 2). In addition, the

pretreatment with cyano-carvone (25, 50 and 75 mg/kg) also reduced nitrite content (86, 80.3 and 73.5%) when compared to the vehicle group, respectively ($P < 0.001$; Fig. 2). Similarly, the pretreatment with cyano-carvone (25, 50 and 75 mg/kg) reduced nitrite content (90.6, 86.8 and 82.2%) when compared to the P400 group ($P < 0.001$; Fig. 2). On the other hand, animals from the control groups (vehicle or cyano-carvone) showed no alterations in nitrite content (Fig. 2).

Acetylcholinesterase (AChE) Activities in Mice Hippocampus Pretreated with Cyano-carvone After Pilocarpine-induced Seizures

AChE activity in mice hippocampus during acute phase of seizures was not markedly altered in pilocarpine group in comparison to the control and vehicle group ($P > 0.05$). Correspondingly, there was a significant increase of 92, 92 and 93% in AChE activities of mice pretreated with cyano-carvone at doses 25, 50 and 75 mg/kg (i.p.) and that received 30 min before pilocarpine (400 mg/kg, i.p.) (CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400) in comparison to the vehicle group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 3). In addition, cyano-carvone pretreated mice showed increase in AChE activities (86, 80 and 87%) in CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400, when compared with the P400 group, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 3). On the other hand, no enzymatic alterations occurred in cyano-carvone groups (CC 25, CC 50 and CC

75) in comparison to the vehicle and P400 groups ($P > 0.05$; Fig. 3).

Discussion

In the present study, we have demonstrated that the systemic administration of cyano-carvone can completely abolish pilocarpine-induced seizures. This was evident from concurrent behavioural changes consistent with anti-convulsant state. This was also reflected by elicited alterations in the oxidative stress and acetylcholinesterase activity after pilocarpine-induced seizures. Considering that, cyano-carvone was effective in preventing tonic convulsions induced by pilocarpine this compound could be useful in grand mal epilepsy.

During pilocarpine administration, the initial response was a significant increase of lipid peroxidation and nitrite formation. This is consistent with a previous report, in which pilocarpine induced similar effects on lipid peroxidation levels and nitrite content in hippocampal preparations of rats (Dab-Pizzol et al. 2000; Freitas et al. 2005). This increase in lipid peroxidation levels has been described to be due to free radicals formation mediated by pilocarpine-induced seizures (Shultz et al. 1995).

Although our study observed anticonvulsant and antioxidant effects of the cyano-carvone on pilocarpine model, these results may not be generalizable to other seizure models, since pilocarpine is a cholinergic drug, and so, even the cyano-carvone can be affecting the cholinergic system in pilocarpine model. In addition, different epilepsy models need to be used in future studies in order to fully identify cyano-carvone's effects on the cholinergic system.

In the present study, this initial transient increase was soon followed by a prolonged marked elevation of hippocampal nitrite content. This increment of lipid peroxidation and nitrite concentrations corresponded well with the appearance of seizures induced by pilocarpine, as manifested by changes in behaviour states. These findings are similar to our previous observations (Freitas et al. 2004; Júnior et al. 2009). Elevations of lipid peroxidation and nitrite concentrations were also reported with seizures induced by kainic acid (Ueda et al. 1997) and pentylenetetrazol (Illian et al. 2005) and in epileptic patients (Kawashima et al. 2004).

We have demonstrated that the lipid peroxidation and nitrite formation in mice hippocampus during the acute period of pilocarpine-induced seizures can be extended for several hours after the spontaneous recovery from the status epilepticus (at least 12 h) in pilocarpine model. These findings indicate that the therapeutic window could be sufficiently longer to use free-radical scavenger in the treatment of status epilepticus. Systemic administration of

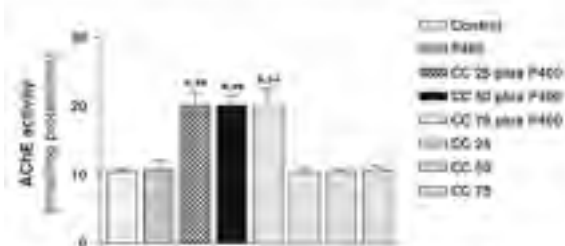


Fig. 3 Effects of cyano-carvone (CC) on acetylcholinesterase (AChE) activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. Mice (25–30 g, 2 months old) were intraperitoneally treated with a single dose of pilocarpine (400 mg/kg, $n = 12$, P400 group), cyano-carvone group with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg, $n = 12$, CC 25, CC 50 and CC 75 groups) and the control animals with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline, $n = 12$, control group). The CC plus P400 groups were pretreated with cyano-carvone (25, 50 or 75 mg/kg) for 30 min prior to pilocarpine injection (400 mg/kg, $n = 12$, CC 25 plus P400, CC 50 plus P400 and CC 75 plus P400 groups). Results are expressed as mean \pm SEM for the number of animals shown inside in parentheses. Differences in experimental groups were determined by two-tailed analysis of variance (ANOVA). * $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA and t Student-Newman-Keuls as post hoc test), ** $P < 0.05$ compared to the pilocarpine group (ANOVA and t Student-Newman-Keuls as post hoc test).

cyano-carvone resulted in a prompt and pronounced fall of hippocampal lipid peroxidation and nitrite formation. This is consistent with the finding that cyano-carvone markedly decreased high TBARS production in hippocampal region. Cyano-carvone induced inhibition of the TBARS and nitrite production has also been reported in other *in vitro* studies (data not shown), but the relation between production inhibition and anticonvulsant action is not clear. Considering that cyano-carvone induced quick decrease in levels of lipid peroxidation and nitrite formation in our seizure model and the synchronous correlation of this decrease with behavioral modification, the modulation of oxidative stress indeed appears to correspond well with the anticonvulsant action of cyano-carvone.

Oxidative stress has been able to trigger the activation of membrane phospholipases, proteases and nucleases, which cause degradation of membrane phospholipids, proteolysis of cytoskeletal proteins and protein phosphorylation (Shamsa et al. 2007). In fact, in accordance with other studies, the present work showed that in mice hippocampus even without the administration of exogenous agents, a baseline oxidative stress due to the production of free radicals including nitrite as seen in our results can be observed, and a lipid peroxidation level in the brain that can be reversed by compensatory cerebral antioxidant endogenous mechanisms to prevent neuronal damage can be detected. Pretreatment of animals with doses of cyano-carvone significantly prevented the elevations in lipid peroxidation level and nitrite formation. Thus, our results suggest that, at least in part, the cyano-carvone's neuroprotective activity is also probably related to its antioxidant effects against lipid peroxidation and nitrite formation, which are normally produced in hippocampus mice.

The involvement of cholinergic mechanisms in pilocarpine-induced epilepsy has been well documented (Turki et al. 1989). AChE has a crucial role in cholinergic neurotransmission, hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine to terminate nerve impulse transmission. The absence of AChE activity most likely results in abnormally high acetylcholine levels in the cholinergic synapses. Accumulation of acetylcholine results in excessive stimulation of muscarinic and nicotinic receptors. The signs of poisoning are seen as increased salivation, respiratory distress, tremor, seizures/convulsions, coma and death. Increased cholinergic activity in the brain is probably related to the initial phase of seizures (McDonough and Shih 1997; Lallemand et al. 1992), whereas sustained seizures are probably associated with increased glutamatergic activity leading to neuronal damage predominantly in the hippocampus, amygdala, piriform cortex and entorhinal cortex (McDonough and Shih 1997; Carpenter et al. 1991).

Decreased cholinergic activity produced by cyano-carvone is supposed to reduce seizures percentage and

mortality rate. Accordingly, cyano-carvone increases the latency to first seizures and latency for installation of status epilepticus. It has also been shown that cyano-carvone can compensate for behavioral changes induced by pilocarpine.

In our study using pilocarpine seizures model, the atropine (25 mg/kg) produced protection against generalized tonic-clonic convulsions and status epilepticus of about 100%. The atropine can totally block the muscarinic receptors and reduce the neuronal excitability during the pilocarpine-induced seizures. The number of animals that experienced convulsions provoked by pilocarpine injections was also diminished by cyano-carvone administration with a clear dose-dependence relationship. The above results suggest that cyano-carvone also acts as a neuroprotective by blocking the muscarinic receptors. However, the effects of cyano-carvone are unable to reduce the neuronal excitability, the same way the atropine does, suggesting that blocking the action potential discharges of pilocarpine by cyano-carvone is performed with less intensity when compared with atropine plus pilocarpine group.

The present *in vivo* study was conducted to screen *in vivo* derivatized of the S-(+)-carvone: (1) for their capability to inhibit AChE in mice hippocampus; (2) to determine if it could have additional benefits as anticonvulsant; and (3) to evaluate its antioxidant efficacy by examining their ability to affect oxidative stress. In addition, *in vivo* studies aid selection of doses that could be useful for treatment of human epilepsy. Initial testing *in vivo* is especially valuable when studying the effects of natural compounds, as their primary neuroprotective mechanism (oxidative stress inhibition) can be easily and reliably examined in animal models.

The present study screened cyano-carvone for their ability to protect mice hippocampus from pilocarpine-induced seizures *in vivo*, being more effective when administered at the highest dose tested. Given that the tested S-(+)-carvone derivative was effective, even at the lowest dose, and it had no detrimental effects on hippocampal region, it may serve as a platform for developing next generation compounds that can protect the brain against oxidative stress caused by pilocarpine-induced seizures and status epilepticus.

Although a direct association between AChE inhibition and free radical production cannot be made with the pilocarpine model used here, the derivatized S-(+)-carvone compound produces protection against seizures and mortality produced by convulsive process. Their ability to scavenge the TBARS and nitrite itself, as reported for another type of antioxidant compounds (Newman et al. 2007; Ehrlich et al. 2011) have been a contributing effect, as this would induce both AChE activation and the inhibition of substances associated with oxidative stress.

The possible effectiveness of cyano-carvone in protecting from neurotoxicity that follows seizures induced by pilocarpine by stimulation of the AChE activity is of great interest. Our report suggests that cyano-carvone used in the present experiment can be administered to humans, protecting them from damage to the nervous system, without evidence of detrimental effects. Like epoxy-carvone (Almeida et al. 2008), the protective effect on the nervous system occurs after convulsions induced chemically by maximal electroshock, picrotoxin and pentylenetetrazole receiving the highest concentrations of monoterpenic bicyclic after systemic administration (Almeida et al. 2003).

As presented, our study determined initially only the acute effects of cyano-carvone as a pretreatment to pilocarpine-induced seizures. However, the cyano-carvone appears to have anticonvulsant properties in this model and its action needs to be investigated in other phases (silent and chronic) of the convulsive process induced by pilocarpine. In the next phase of the study, we intend to verify the antioxidant and anticonvulsant effects of this compound in a chronically epileptic animal, once without the investigation in other seizure's phase, the compound does not hold potential relevance for the human epilepsy.

In conclusion, our results have shown that cyano-carvone possesses antioxidant activity probably due to the modulation of cholinergic system and reduction of neuronal oxidative stress mainly through the free radicals scavenger. Cyano-carvone may be helpful to produce neuronal protection and may be considered as a potential natural anticonvulsant. However, additional studies should be conducted to determine its clinical use.

Acknowledgments This work was supported in part by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq, Brazil). R.M.F. and P.S.S. are fellows from CNPq. We would like to thank Steven Gabriel Maia for and Dr. Paulo Michel Pinheiro-Ferreira (UPP, Picos) for their help with the English editing of the manuscript.

References

- Almeida RN, Motta SC, Leite JR (2003) Óleo essencial com propriedades anticonvulsivantes. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2:3–6
- Almeida RN, De Sousa DP, Nóbrega FFF, Oliveira FS, Araújo DAM, Leite JR, Menezes R (2008) Anticonvulsant effect of a natural compound α , β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. *Neurosci Lett* 443:51–55
- Barras DO, Xavier SM, Barbosa CO, Silva RF, Maia FD, Oliveira AA, Freitas RM (2007) Effects of the vitamin E on catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett* 415:227–230
- Carpentier P, Lambrosetti M, Blanchet G (1990) Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurons (field CA1) of rats subjected to acute sensory stimulation: a light microscopic study. *Brain Res* 541:293–299
- Cavallheiro EA, Fernandes MF, Turski L, Natfali-Matrazzoni MG (1994) Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and neurotransmitter determinations in the hippocampus. *Epilepsia* 35:1–7
- Dal-Pizzol F, Klann F, Vianna MMR, Scherer N, Quevedo J, Benito MS, Moreira JCP, Watz R (2000) Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine of kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett* 291:179–182
- De Sousa DP, Raphael E, Bruckson TJ (2010) Synthesis of (R)- α , β -carvone derivatives. *Z Naturforsch* 65:1381–1383
- Drapes HL, Hadley M (1990) Malonaldehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431
- Ehrlich M, Tassell RV, Li Y, Zhou Z, Kopley CL (2011) Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in rats. *Toxicol Vitro* 25:301–307
- Ellman GL, Courtney D, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A semi-automated colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Fang RS, Daw ZY, Abu-Raya SH (1989) Influence of some essential oils on *Aspergillus fumigatus* growth and production of aflatoxin in a synthetic medium. *J Food Sci* 54:74–76
- Freitas RM (2009) The evaluation of effects of lipids acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 455:140–144
- Freitas RM, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Vianna GSB, Feresoles MMF (2004) Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 78:327–332
- Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Vianna GSB, Feresoles MMF (2005) Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *FEBS J* 272:1307–1312
- Freitas RM, Sousa FCF, Vianna GSB, Feresoles MMF (2006) Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 399:76–78
- Freitas RM, Fang B, Jordan J (2011) Neuropharmacological effects of liponic acid and ubiquinone on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase, and Mg^{2+} -ATPase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Fund Clin Pharmacol* 25:211–216
- Green LC, Tinschbaum SR, Goodson P (1981) Nitrate synthesis in the perfused and conventional rat. *Science* 212:56–58
- Ho T-L (1992) Enantioselective synthesis. Natural products from chiral terpenes. *Joh Wiley and Sons*, New York, pp 123–183
- Iltan A, Gurel A, Armutcu F, Karali S, Iraz M (2005) Antiepileptic and antioxidant effects of *Nigella arvensis* oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Neuropharmacology* 49:456–464
- Iltan HVN, Feresoles MMF, Freitas RM (2009) Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitric levels and sensitive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. *Oxid Med Cell Long* 2:1–8
- Kawabuchi H, Inagi Y, Ujihara M, Kashiwagi Y, Takakuma K, Hoshika A, Akai R, Watanabe Y (2004) Serum and cerebrospinal fluid nitro-nitrate levels in patients with traumatic gastroenteritis induced convulsion. *Life Sci* 74:1397–1405
- Lalonde G, Dreyer M, Collin A, Perrot-Martone L, Baubichon D, Monssau, Blanchet G (1992) Changes in hippocampal acetylcholine and glutamate extracellular levels during seizure-induced seizures: influence of septal cholinergic cells. *Neurosci Lett* 138:104–107
- Larvey H, Ruzicbrugh NJ, Faw AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

- Marinho MMF, Sousa FCF, Bruin VMS, Vale MR, Viana GSB (1998) Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int* 33:299–306
- McDonough Jr JH, Shih T-M (1997) Neuropharmacological mechanisms of nerve agent induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 21:559–579
- Militão GCG, Ferreira PMP, Freitas RM (2010) Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochem Int* 56:16–20
- Newman JDS, Roberts JM, Blanchard GJ (2007) Optical organophosphate sensor based upon gold nanoparticle functionalized fused silica gel. *Anal Chem* 79:3448–3454
- Reynolds T (1987) Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann Bot* 60:215–223
- Santos IMS, Freitas RLM, Saldanha GB, Freitas RM (2010) Pharmacological studies of ubiquinone in pilocarpine-induced epilepsy model. *Rev Elet Farm* 7:34–47
- Santos PS, Costa JP, Tomé AR, Saldanha GB, Souza GF, Feng D, Freitas RM (2011a) Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. *Eur J Pharmacol* 668:65–71
- Santos PS, Feitosa CM, Saldanha GB, Tomé AR, Feng D, Freitas RM (2011b) Lipoic acid inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 97:531–537
- Saxena DB, Gowami BK, Tomar SS (1987) Nematicidal activity of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. *Indian Perfum* 31:150–154
- Sharma AB, Sun J, Howard LL, Williams AG Jr, Mallet RT (2007) Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:198–206
- Shulz JN, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF (1995) Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 64:2239–2247
- Tomé AR, Ferreira PMP, Freitas RM (2010a) The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. *Neurochem Res* 35:580–587
- Tomé AR, Ferreira PMP, Freitas RM (2010b) Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or alpha-tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 68:355–361
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwartz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9:315–335
- Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3:154–171
- Ueda Y, Yokoyama H, Niwa R, Kosaka R, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H (1997) Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Res* 26:329–333
- Xavier SML, Barbosa CD, Barros DO, Silva RF, Oliveira AA, Freitas RM (2007) Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci Lett* 420:76–79
- Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK (1992) Effects of carvone compounds on glutathion S-transferase activity in A/J mice. *J Agric Food Chem* 40:751–755

ANEXO C: Confirmação de submissão à Revista Brasileira de Ciências da Saúde

João Pessoa, 01 de março de 2012.

Ilmo Autor

Rivelilson Mendes de Freitas

Servimo-nos da presente para informar que o artigo "**Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona**", foi submetido à apreciação da Comissão Editorial desta Revista na data de 04/01/2012, recebendo o Registro de Submissão 11873.

Atenciosamente,


Prof. Wilton Wilney Nascimento Padilha
Editor Científico

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde

Revista Brasileira de Ciências da Saúde
ISSN 1415-2177

ANEXO D: Declaração do depósito de pedido de patente submetido ao Núcleo de Inovação tecnológica na Universidade Federal do Piauí.



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

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:14 horas do dia 09/12/2011, sob o número de Protocolo do INPI: 000172, o depósito de pedido de Patente de Invenção intitulada “**Formulações farmacêuticas à base da ciano-carvona para tratamento de doenças neurodegenerativas**”, desenvolvida pelos inventores:

Rivelilson Mendes de Freitas

Dayane Alves Costa

Jéssica Pereira Costa

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira

Pauline Sousa dos Santos

Damião Pergentino de Sousa

Teresina (PI), 09 de Dezembro de 2011.

Prof. Dr. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI