Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2013;34(1):125-130
ISSN 1808-4532

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol

José Damasceno Nogueira Neto[1]; Damião Pergentino de Sousa[2]; Rivelilson Mendes de Freitas[1,*]

[1]Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPI. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.
[2]Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

RESUMO

O presente estudo avaliou o potencial antioxidante do nerolidol contra a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico. Nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL foi observado que o nerolidol preveniu a peroxidação lipídica induzida por 2,2'-azobis-2-amidinopropano(AAPH), inibindo a quantidade de TBARS formado, de maneira semelhante ao composto Trolox, um análogo sintético hidrofílico do α-tocoferol, que é muito utilizado como padrão antioxidante. Além disso, o nerolidol também reduziu a produção do radical hidroxila, assim como a produção de óxido nítrico, possivelmente devido a uma propriedade antioxidante *in vitro*, que pode ser explorada para a proteção *in vivo* de alvos moleculares (DNA, lipídios, carboidratos e proteínas). O nerolidol apresentou potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxilas e do óxido nítrico, bem como na prevenção da formação de TBARS. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar melhor o potencial antioxidante *in vitro* deste composto.

Palavras-chave: Antioxidante. Nerolidol. Óxido Nítrico. Peroxidação lipídica. Radical Hidroxila.

INTRODUÇÃO

O cérebro e outros órgãos estão expostos a radicais livres e as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS). Estas espécies participam de reações essenciais e são constantemente formadas podendo se tornar prejudiciais (Sies, 1993). Diversos processos fisiológicos e patológicos podem levar a alteração no equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes. O consequente desequilíbrio entre os sistemas pode favorecer ao aparecimento de lesões devido ao estresse oxidativo (Basha & Rani, 2003).

Tem sido relatado que em algumas situações ocorre um aumento na produção de radicais livres que ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes disponíveis (Gaté et al., 1999; Mandelker, 2008) culminando em um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito (Freitas et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Ferreira et al., 2009). Dessa forma, os órgãos e sistemas endógenos podem gerar o acúmulo dessas espécies reativas agressoras ao organismo.

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (Matsubara et al., 1992; Souza & Ferreira, 2007). Já as EROs e ERNs incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio e/ou nitrogênio, respectivamente. Estas espécies são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (Agarwal et al., 2005).

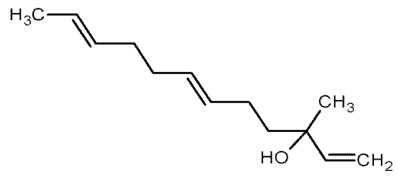
Já é sabido que as espécies reativas derivadas do oxigênio podem estar envolvidas em muitas doenças, como por exemplo, diabetes, hipertensão, arteriosclerose, artrite, Mal de Parkinson (Xi et al., 2007; Reed, 2011), ansiedade, depressão (Leite et al., 2008), espasmos musculares (Bloxton et al., 2002), epilepsia (Halliwell, 1992), inflamação, câncer (Valença & Porto, 2008), dentre outras. Assim como no processo senescente e senil do envelhecimento (Cadenas & Davies, 2000). O desenvolvimento de novos produtos para esta finalidade tem sido um importante objeto de estudo, tendo em vista a terapêutica farmacológica atual para o desenvolvimento e produção de novos compostos, com ação antioxidante, visando o tratamento de várias patologias incluindo as desordens do sistema nervoso central (SNC).

Na medicina popular, assim como na terapêutica, plantas contendo muitos derivados terpênicos têm mostrado ação sobre o SNC, incluindo atividade sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (Sousa et al., 2007; Perazzo et al., 2007; Leite et al., 2008). Neste sentido, vários compostos de origem vegetal encontrados em abundância na natureza têm sido estudados, dentre eles o nerolidol, um sesquiterpeno observado em diversos óleos essenciais de plantas medicinais como nerol (*Citrus*

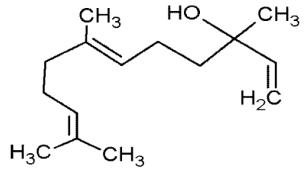
Autor correspondente: Rivelilson Mendes Freitas - Departamento de Bioquímica e Farmacologia - Universidade Federal do Piauí - UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Bairro Ininga - Teresina - Piauí - CEP.64.049-550 - fone: +55-86-3215-5870 - e-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

aurantium var. Sinensis), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), lavanda (*Lavandula angustifólia* Miller) e capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf).

O nerolidol (Figura 1) é usado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e apresenta um grande interesse para a indústria de cosméticos em virtude de ser um fixador natural (Frizzo, 2000).Atualmente tem sido utilizado em testes de penetração dérmica, como um agente potencializador para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica (Koudou et al., 2005).



A - *cis*-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol



B - *trans*-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol

Figura 1: Estrutura química dos isômeros cis (A) e trans(B) do nerolidol.

Na revisão da literatura sobre este sesquiterpeno não foram identificados estudos relacionados ao seu potencial antioxidante *in vitro*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o potencial antioxidante do nerolidol em metodologias *in vitro*, bem como determinar a concentração inibitória 50% (CI_{50}) para o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e conteúdo de nitrito.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas

As drogas utilizadas foram 2-desoxirribose, 2,2'-azobis(2-amidinopropano), reagente de Griess, peróxido de hidrogênio, tampão fosfato, nitroprussiato de sódio, TBA (ácido tiobarbitúrico), ácido tricloroacético, bem como *Trolox* (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxilic) e nerolidol constituído dos isômeros *cis*- e *trans*-nerolidol e com 98% de pureza foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

Experimentos *in vitro*: potencial antioxidante

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste foi utilizado para quantificar a peroxidação lipídica (Esterbauer & Cheeseman, 1990). Este método adaptado foi usado para medir a capacidade antioxidante do nerolidol usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios (Guimarães et al., 2010). Brevemente, a gema de ovo foi homogeneizada (1% w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4), em seguida 1 mL de homogenato foi sonicado e então ao homogeneizado foi adicionado 0,1 mL de nerolidol em diferentes concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL da solução de AAPH0,12 M. Ao grupo controle foi adicionado apenas o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%). As reações foram realizadas durante30 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi misturado com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida por meio de um espectrofotômetro a 532 nm (Biospectro SP 220, Biosystems). Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle).

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de radicaishidroxila

A formação do radical hidroxila (•OH) na reação de Fenton foi quantificada usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose (Lopes et al., 1999). O princípio do ensaio é a quantificação de degradação do produto 2-desoxirribose, a malondialdeído (MDA), por sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações típicas foram iniciadas pela adição de $FeSO_4$em uma concentração final de 6 mM em soluções contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM H_2O_2 e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2). Para medir a atividade antioxidante de remoção do radical hidroxila, diferentes concentrações de nerolidol foram adicionadas ao sistema antes da adição $FeSO_4$. As reações foram realizadas durante 15 min à temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico 4% (v/v) seguido de TBA 1% (w/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas durante 15 min a 95°C, e depois resfriadas à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos em função do coeficiente de absortividade molar do TBARS.

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (Basu & Hazra, 2006). A mistura de reação (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato 10 mM e nerolidol em diferentes concentrações foram

incubadas a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e misturada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida em 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles negativos (nitroprussiato de sódio 10 mM e do veículo). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). Estes resultados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguidos pelo teste de *Dunnett* ou t-*Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05. Os dados foram analisados com o *GraphPad Prism* versão 5,01 *software* (1992-2007, *GraphPadSoftware* Inc.). A porcentagem de inibição por um agente antioxidante foi determinada por meio da seguinte fórmula: % Inibição = 100 x (Controle - experiência) / controle.

RESULTADOS

Foi observado um aumento na produção de nitrito significativo de 571.59% quando comparado o grupo NPS em relação ao controle (Tween80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%; p<0,05). Em relação à produção de nitrito, foram registradas em todas as concentrações testadas de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL do nerolidol, demonstraram efeito significativo em relação ao NPS (meio de produção deste radical livre), com diminuição de 44,59, 52,20, 56,58, 59,56 e 63,28% respectivamente (p<0,05; Figura 2).

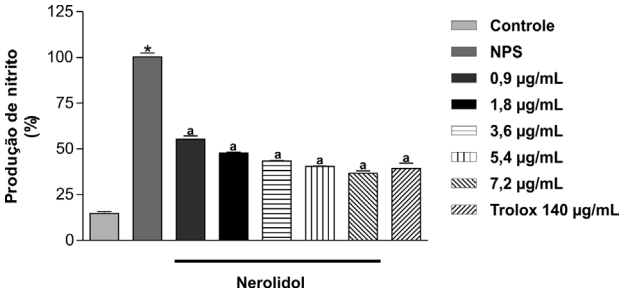


Figura 2: Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol contra a formação de nitrito. Os valores representam a média ± E.P.M. dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (Tween80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste). ap<0,001 versus nitroprussiato de sódio (NPS) (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

Já o Trolox 140 µg/mL (controle positivo) reduziu em 60.66% a produção de nitrito em relação ao NPS. Em nossos estudos, *in vitro,* também foi possível determinar a concentração inibitória 50% (CI_{50}) do nerolidol de 1,104 µg/mL contra a formação do radical nitrito com margem de variação na concentração efetiva de 0,7308 a 1,667 µg/mL, com 95% de intervalo de confiança.

Quando comparadas as diferentes concentrações do nerolidol, foi verificada uma diminuição de 9,83, 20,93 e 29,9% com as concentrações de 3,6, 5,4, 7,2 µg/mL do nerolidol em comparação a concentração de 0,9 µg/mL, respectivamente. Já em relação às concentrações de 5,4 e 7,2 µg/mL, houve uma redução de 14,95 e 24,6% na formação de nitrito quando comparada a concentração de 1,8 µg/mL, respectivamente. Também foi verificada uma maior redução de 12,36 e 22,25% no conteúdo de nitrito nas concentrações de 5,4 e 7,2 µg/mL, quando comparada à concentração de 3,6 µg/mL, respectivamente. A concentração de 7,2 µg/mL aumentou a redução do conteúdo de nitrito de 11,35%, quando comparada à concentração de 5,4 µg/mL. Já o Trolox 140 µg/mL (controle positivo) reduziu em 70,66% a produção de nitrito em relação ao NPSreacional. Em nossos estudos, *in vitro,* também foi possível determinar a concentração inibitória 50% (CI_{50}) do nerolidol de 1,104 µg/mL contra a formação do radical nitrito, com margem de variação na concentração efetiva de 0,7308 a 1,667 µg/mL com 95% de intervalo de confiança.

Em relação à formação do radical hidroxila, todas as concentrações testadas de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mLdo nerolidol, demonstraram efeito significativo em relação ao meio responsável pela produção deste radical livre, com diminuição de 40,39, 47,44, 48,41, 49,5 e 52,9%, respectivamente (p<0,05; Figura 3). Quando comparadas as diferentes concentrações do nerolidol entre elas, foi verificada uma diminuição de 11,82, 13,45, 15,28, 20,96% relacionada às concentrações de 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL do nerolidol, respectivamente, quando comparadas a concentração de 0,9 µg/mL. A concentração de 7,2 µg/mL demonstrou efeito significativo, com uma diminuição de 10,37, 8,69 e 6,72%, respectivamente, quando comparada às concentrações de 1,8, 3,6 e 5,4 µg/mLdo nerolidol. O Trolox 140 µg/mL produziu a remoção do radical hidroxila em 78,1% em relação ao sistema (p<0,05). Após os testes antioxidantes, *in vitro,* foi possível estabelecer a CI_{50} de 3,89 µg/mL contra a formação do radical hidroxila com uma margem de variação de 2,48 a 6,11 µg/mL com um intervalo de confiança de 95%.

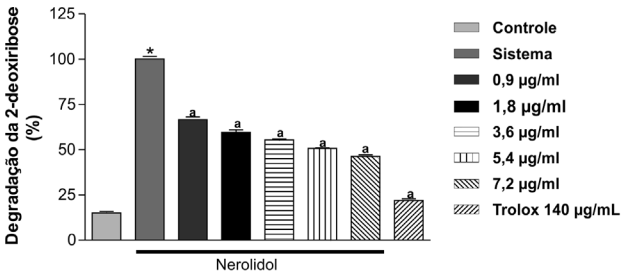


Figura 3: Avaliação dos efeitos antioxidantes in vitro do nerolidol na remoção do radical hidroxila. Os valores representam a média ± E.P.M dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (Tween80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste). ap<0,001 versus sistema (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

As concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL do nerolidol produziram uma diminuição de 63,41, 66, 67,14, 68,72 e 73,22% na produção de TBARS em relação ao AAPH, respectivamente. Já o trolox 140 µg/

mL, controle antioxidante, causou uma diminuição de 55,59% na produção de TBARS em relação ao AAPH. A concentração de 7,2 µg/mL do nerolidol produziu uma diminuição de 26,81% na produção de TBARS em relação à concentração de 0,9 µg/mL (figura 4; p<0,05).

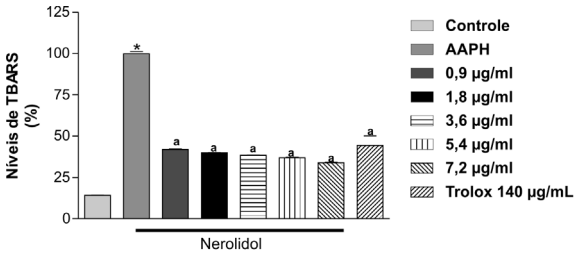


Figura 4: Avaliação dos efeitos antioxidantes in vitro do nerolidol na remoção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os valores representam a média ± E.P.M dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste). ap<0,001 versus sistema (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

O Trolox reduziu a produção de TBARS em relação às concentrações do nerolidol na proporção de 21,37, 30,62, 35,12, 41,95 e 65,83% em relação, respectivamente, às doses de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL de nerolidol. Em nossos estudos *in vitro* verificamos que concentração inibitória 50% (CI_{50}) do nerolidol é de aproximadamente 0,4508 µg/mL contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com margem de variação na concentração efetiva de 0,2538 a 0,8007 µg/mLcom 95% de intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

Tem sido relatado que em situações estressantes pode ocorrer uma diminuição nos processos enzimáticos e não enzimáticos relacionados com a remoção de radicais livres pelo cérebro (Mandelker, 2008; Gaté et al., 1999). Dessa forma, pode ser observado em algumas patologias relacionadas ao SNC um aumento dos níveis de peroxidação lipídica (Freitas et al., 2004) e do conteúdo de nitrito (Ferreira et al., 2009; Oliveira et al., 2007). Embora esses achados não sejam relatados em todos os modelos farmacológicos, estas condições patológicas, podem ser decorrentes de uma maior atividade celular pró-oxidante com consequente redução na atividade das enzimas antioxidantes, condições essas que precisam ser melhor investigadas. O estudo avaliou a potencial atividade antioxidante do nerolidol por meio dos testes de formação do nitrito, radical hidroxila e TBARS.

A atividade antioxidante de uma substância também pode ser avaliada por meio de uma grande variedade de testes *in vitro*. Em nosso estudo, como mencionado anteriormente, foram utilizadas três metodologias para avaliação de uma potencial atividade antioxidante pelo nerolidol: o teste para avaliar a formação de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico, teste de produção de radical hidroxila e teste de formação de nitrito. O método TBARS é um método usado para quantificar a peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular causado pelos radicais livres que são formados sob estresse oxidativo. O nerolidol, em todas as concentrações testadas, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por 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 o nerolidol pode exercer um efeito antioxidante que protege as biomoléculas lipídicas essenciais para o funcionamento da membrana celular (Serafini et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos em outro experimento com derivados do nerolidol, uma vez que demonstraram uma diminuição significativa semelhante na concentração de TBARS formado (Pacífico et al., 2008).

Outra metodologia bastante empregada para avaliar a atividade antioxidante de uma substância, baseia-se na capacidade de remoção de radicais livres que consiste na interação direta de uma substância com moléculas reativas, convertendo as EROs e ERNs em espécies menos reativas e, consequentemente, mais estáveis (Hoelzl et al., 2005). A capacidade de uma substância de remover o radical hidroxila é diretamente relacionada à sua atividade antioxidante.

O •OH é uma espécie extremamente reativa, capaz de causar danos ao DNA, proteínas e lipídios (Halliwell, 1995; Huang et al., 2005; Shukla et al., 2009; Serafini et al., 2011). Com base nos resultados, pode ser sugerido que o nerolidol, pode formar um complexo com um radical livre, provavelmente por um efeito quelante convertendo estes radicais em espécies menos reativas (Lima & Cardoso, 2007; Guimarães et al., 2010). No entanto, também é importante discutir que não foram observadas alterações significativas entre as diferentes concentrações utilizadas do nerolidol, sugerindo que os metabólitos do oxigênio e/ou nitrogênio podem saturar a possível atividade antioxidante quelante deste sesquiterpeno. Logo, a exposição das elevadas concentrações de nerolidol pode não ser suficientemente capaz de aumentar seu potencial antioxidante, que precisa ser melhor investigado em futuros estudo.

Neste estudo foi demonstrado que o nerolidol produziu uma significativa remoção do radical hidroxila, exibindo um considerável potencial antioxidante que pode ser capaz de inibir os danos celulares causados por este radical. O Trolox, droga usada como padrão, também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Resultado semelhante foi obtido por Pacífico et al. (2008), que avaliaram a atividade antioxidante de derivados do nerolidol isolados do extrato metanólico da *Amaranthus retroflexus* L. no método DPPH e H_2O_2 demonstrando resultados significativos na inibição da reação com TBARS, sendo também observada uma diminuição, em todos os testes para a formação de radicais livres, bem como um potencial antioxidante, corroborando com os nossos resultados.

Outra metodologia empregada foi à remoção do NO. Substâncias com ação sequestradora de NO, competem com o oxigênio, produzindo uma ação oxidante que pode ser caracterizada pela supressão do NO devido à neutralização do mesmo por uma reação química ou inibição de sua formação (Ahmadi et al., 2011; Serafini et

al., 2011). Esse composto pode estar envolvido em reações oxidativas e foi capaz de reduzir os níveis de formação de nitrito, sugerindo uma capacidade antioxidante para este composto. Resultado semelhante foi obtido no estudo realizado com óleo essencial da *Canarium schweinfurthii* Engl. (Burseraceae) (Bloxton et al., 2002; Koudou et al., 2005).

Neste estudo, o nerolidol diminuiu significativamente a produção de nitrito, a formação do radical hidroxila, a produção de TBARS, demonstrando potencial atividade antioxidante, protegendo as biomoléculas, como lipídios da membrana celular, contra danos causados pelos radicais livres. Mostrando seu potencial e sua possível ação nos sistemas de defesa contra danos oxidativos, bem como possível atividade central e/ou periférica que pode ser justificada pela sua atividade antioxidante.

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que o nerolidol apresenta potencial antioxidante pelos métodos *in vitro* utilizados. Mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação que medeiam à atividade antioxidante do nerolidol *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).

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant potential in-vitro of nerolidol

The antioxidant potential of nerolidol against the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroxyl radical and nitric oxide production was assessed in this study. At concentrations of 0.9, 1.8, 3.6, 5.4 and 7.2 mg/mL, it was observed that nerolidol prevented lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis-2-amidinopropane (AAPH), inhibiting the formation of TBARS in a manner similar to that of Trolox, a synthetic hydrophilic α-tocopherol analog that is widely used as an antioxidant standard. Nerolidol also reduced the production of the hydroxyl radical and nitric oxide, possibly indicating an *in-vitro* antioxidant property. This property could be exploited to protect *in-vivo* molecular targets (DNA, lipids, carbohydrates and proteins). Although nerolidol exhibited *in-vitro* antioxidant activity, by its capacity to remove hydroxyl radicals and nitric oxide and to prevent the formation of TBARS, more research is needed to characterize better the antioxidant potential of this compound.

Keywords: Antioxidant. Nerolidol. Nitric oxide. Lipid peroxidation. Hydroxyl radical.

REFERÊNCIAS

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:1-21. DOI: 10.1186/1477-7827-3-28.

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 Chem Toxicol. 2011; 48(5):1137-44.

Basha PS, Rani AU. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in fresh water teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicol Environ Saf. 2003;56(2):218-21.

Basu S, Hazra B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. Phytotherapy Res. 2006; 20(10):896-900.

Bloxton JD, Marderosien AD, Gibbs R. Bioactive constituents of Alaska devil's root (*Opopanax horridus, Araliacea*). Econ Bot. 2002;56(3):285-87.

Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med. 2000;29(3-4):222-30.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Meth Enzymol. 1990;186:407-21.

Ferreira PMP, Militão GCG, Freitas RM. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. Neurosci Lett. 2009;464(2):131-34.

Freitas RM, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. 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 Beh. 2004;78:327-32.

Frizzo CD, Dellacassa E, Serafini LA, Cassel E. Extração Supercrítica do Óleo Essencial de Planta Nativa do Gênero Baccharis. In: Anais do XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering, XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, I Brazilian Congress of Phase Equilibrium and Fluid Properties for Chemical Process Design; 2000; Águas de São Pedro.

Gaté L, Paul J, Nguyen BA, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. Biomed Pharmacother. 1999;53(4):169-80.

Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antoniolli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JPA, Rocha RF, Moreira JCF, Araújo AA, Gelainn DP, Quintans-Júnior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;107(6):949-57.

Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochem Pharmacol. 1995;49(10):1341-48.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 1992;59(5):1609-23.

Hoelzl C, Bichler J, Ferk F, Simic T, Nersesyan A, Elbling L, Ehrlich V, Chakraborty A, Knasmuller S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis

on human intervention studies. J Physiol Pharmacol. 2005;56(Suppl. 2):49-64.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J Agric Food Chem. 2005; 53(6):1841-56. DOI: 10.1021/jf030723

Koudou J, Abena AA, Ngaissona P, Bessiére JM. Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii*. Fitoterapia. 2005;76(7-8):700-3.

Leite MP, Fassin JRJ, Baziloni EMF, Almeida RN, Mattei R, Leite JR. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(Suppl.):661-66.

Lima RK, Cardoso MG: Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. Ver. Fitos. 2007;3(3):14-24.

Lopes GKB, Schulman HM, Lima MH. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1999; 1472(1-2):142-52.

Mandelker L. Cellular effects of comom atioxidants. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2008; 38(1):199-211.

Matsubara LS, Ferreira ALA, Tornero MT, Machado PEA. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. Braz J Med Biol Res. 1992;25(4):331-35.

Oliveira AA, Almeida JPC, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LMV, Júnior HVN, Fonseca FN, Viana GSB, Sousa FCF, Fonteles MMF. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. Cell Mol Neurobiol. 2007;27(3):395-406.

Pacifico S, Abrosca B, Golino A, Mastellone C, Piccolella S, Fiorentino A, Monaco P. Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retrofexus*) leaves. Food Sci Technol. 2008;41(9):1665-71.

Perazzo FF, Carvalho JCT, Rodrigues M, Morais EKL, Maciel MAM. Comparative anti-infammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. Rev Bras Farmacogn. 2007;17(4):521-28.

Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Radic Biol Med. 2011;51(7):1302-19.

Serafini MR, Santos RC, Guimarães AG, Santos JPA, Santos ADC, Alves IA, Gelain DP, Nogueira PCL, Quintans-Júnior LJ, Bonjardim LR, Araújo AAS. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. J Med Food. 2011;14(10):1159-66.

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 Chem Toxicol. 2009: 47(9): 2338-43.

Sies H. Strategies of antioxidante defense. Eur J Biochem. 199315;215(2):213-9.

Souza JDS, Ferreira WM. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. Rev Eletr Nutr. 2007;4(3):456-61.

Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, Almeida RN, Leite JR, Mattei R. Pharmacological effects of the monoterpene α, β-epoxy-carvone in mice. Rev Bras Farmacogn. 2007;17(2):170-75.

Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. J Bras Pneumol. 2008;34(10):787-95.

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. 2007;191(2):281-9.

Recebido em 03 de abril de 2012

Aceito para publicação em 07 de agosto de 2012