



# Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona

Dayane Alves Costa<sup>1</sup>; Guilherme Antonio Lopes de Oliveira<sup>1</sup>; Damião Pergentino de Sousa<sup>2</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>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.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe, CEP 49.100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

## RESUMO

O presente estudo avaliou o potencial antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico. Observou-se que a ciano-carvona (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL), foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), inibindo a quantidade de TBARS formada. Resultado semelhante foi obtido com o Trolox (140 µg/mL), um análogo sintético hidrofílico do  $\alpha$ -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, sugerindo uma possível capacidade de proteção contra danos celulares *in vitro* produzidos por este radical. O Trolox também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Em relação à produção de óxido nítrico, foi detectado uma diminuição significativa na produção deste composto pela ciano-carvona, demonstrando uma propriedade antioxidante *in vitro*, um achado que pode ser explorado para a proteção *in vivo* das biomoléculas, como lipídios da membrana celular. A ciano-carvona revelou potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção contra radicais hidroxilas e do óxido nítrico, bem como preveniu a formação de TBARS.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Monoterpenos. Óleos essenciais. Óxido Nítrico. Peroxidação lipídica. Radical Hidroxila.

## INTRODUÇÃO

Radical livre é todo átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados e é constantemente formado em processos biológicos e pode ser removido por defesas antioxidantes (Gutteridge & Halliwell, 2010). 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, estas espécies podem ser definidas 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, podem ser mencionadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), juntamente com catalase e glutatona peroxidase, que promovem a desintoxicação do 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, epilepsia 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.

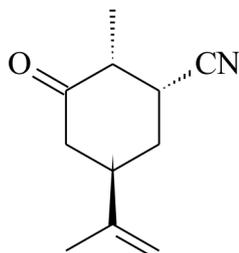
Diversos estudos demonstram as atividades antioxidantes dos monoterpenos  $\alpha$ -terpineol (Bicas et al., 2011),  $\alpha$ -tujona, (Mothana et al., 2011), 1,8-cineol (García et al., 2009),  $\alpha$ -pineno (Wannes et al., 2010) e  $\gamma$ -terpineno (Ruberto & Baratta, 2000). Neste sentido, vários compostos

*Autor correspondente:* Rivelilson Mendes de Freitas - 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 - Teresina - PI - Brasil - telefone: 86-81182379 e-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

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 carvona pode ser utilizada como material de partida para a síntese de vários derivados naturais e sintéticos, a exemplo da ciano-carvona, obtida através da reação de adição 1,4 do ânion cianeto a carvona (Sousa et al., 2010). Não existem relatos na literatura a respeito do potencial antioxidante deste derivado de monoterpeno, sendo este o primeiro trabalho a avaliar este potencial *in vitro*.

Diante disto, este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial antioxidante da ciano-carvona (Figura 1) em metodologias *in vitro* e propor seu mecanismo de ação por meio das reações químicas envolvidas nas reações do composto ciano-carvona com os radicais L<sup>•</sup> (radical lipídico) em nível de peroxidação lipídica, bem como com o nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) formado por meio da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio após formação do óxido nítrico. E por fim, com o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) produzido pela degradação oxidativa da 2-desoxirribose.



**Figura 1:** Estrutura química da ciano-carvona.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção da ciano-carvona

A ciano-carvona foi preparada conforme descrito na literatura (Cocker et al., 1995; Sousa et al., 2010). A substância foi identificada por IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e seus dados foram comparados com os da literatura.

### Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Esterbauer & Cheeseman, 1990) foi realizada para quantificar o nível de

peroxidação lipídica, sendo a gema de ovo homogeneizada usada como substrato rico em lipídios (Guimarães et al., 2010). A gema de ovo foi homogeneizada (1%, w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi sonicado e homogeneizado com 0,1 mL de ciano-carvona (CC) em diferentes concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; 0,12 M). O controle foi realizado apenas com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) usado para emulsionar a substância avaliada.

As reações foram realizadas durante 30 min a 37°C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95°C durante 30 min.

Após o resfriamento, as absorvâncias dos tubos contendo diferentes concentrações da amostra foram medidas a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle induzido).

### Avaliação do potencial antioxidante da ciano-carvona *in vitro* contra a produção de óxido nítrico (NO)

O 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 (Basu & Hazra, 2006). A mistura reacional (1 mL) contendo nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 10 mM e o composto avaliado em diferentes concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) foram incubados a 37°C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess.

O Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) na ausência de uma fonte geradora de NO (sem NPS) e o grupo NPS que reflete a produção de nitrito por meio da decomposição espontânea do NPS foi considerado como 100% da produção de NO. O efeito de diferentes concentrações de ciano-carvona contra NPS foi determinado pelo método de Griess.

A absorvância do cromóforo foi medida a 540 nm. A porcentagem de remoção do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorvância 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 apenas por NPS.

### Avaliação do potencial antioxidante da ciano-carvona *in vitro* contra a produção do radical hidroxila (OH<sup>•</sup>)

A produção do OH<sup>•</sup> foi quantificada por meio da reação de Fenton. Durante esta reação foi determinado o efeito *in vitro* da ciano-carvona contra a produção OH<sup>•</sup> 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 malonaldeído, por meio da sua condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciadas pela adição de  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de  $\text{FeSO}_4$  com concentração final 6 mM para soluções contendo 2-desoxirribose 5 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM e tampão fosfato 20 mM (pH 7,2).

Para determinar o potencial antioxidante *in vitro* da CC contra a formação do radical hidroxila, diferentes concentrações deste derivado de monoterpene (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas ao sistema antes da adição de  $\text{Fe}^{2+}$ . As reações foram realizadas durante 15 min em temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v), seguido da adição de TBA 1% (v/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas em banho maria durante 15 min a 95°C, e depois resfriadas à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formada por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Além disso, também foi determinada a concentração efetiva 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) que expressa a concentração da ciano-carvona em  $\mu\text{g/mL}$ , que removeu 50% do composto formado nos três métodos propostos para a avaliação do potencial antioxidante *in vitro*.

### Análise Estatística

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  $p < 0,05$ . Os valores da concentração efetiva 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) e os seus intervalos de confiança de 95%, foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad 5.01 (San Diego, CA).

## RESULTADOS

A peroxidação lipídica foi analisada pelo método de quantificação do TBARS, que é um ensaio utilizado extensivamente para estimar a peroxidação dos lipídios nas membranas e sistemas biológicos. Os resultados obtidos mostraram que, em todas as concentrações testadas, (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g/mL}$ ) a ciano-carvona causou uma redução significativa de 56; 62; 66; 69,6 e 72,1% na produção de TBARS em relação ao grupo AAPH, respectivamente. O Trolox (droga padrão; 140  $\mu\text{g/mL}$ ) também reduziu o parâmetro observado, apresentando 47,7% de remoção (Figura 2).

A ciano-carvona diminuiu os níveis de peroxidação lipídica *in vitro* e promoveu a redução de 50% da produção das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com um valor de  $\text{CE}_{50}$  de aproximadamente de 0,66  $\mu\text{g/mL}$  variando de 0,35 a 1,24  $\mu\text{g/mL}$  com intervalo de confiança de 95%. O valor da  $\text{CE}_{50}$  da (-)-carvona para o mesmo parâmetro é de aproximadamente 0,72  $\mu\text{g/mL}$  (Costa, 2012). Dessa forma, quando comparados aos

valores obtidos com o derivado sintético nas mesmas concentrações, foi verificada uma redução no valor da  $\text{CE}_{50}$  de 8,3% para a ciano-carvona.

A quantificação de TBARS mostrou que a CC exerceu um efeito antioxidante significativo contra os radicais peroxilas gerados pelo AAPH, protegendo os lipídios da oxidação em todas as concentrações (Figura 2). Trolox (140  $\mu\text{g/mL}$ ), 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, foi elaborada 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 Figura 3.

A avaliação da ciano-carvona como substância sequestradora de NO também foi testada pela sua capacidade de remoção do nitrito pelo método de Griess. Os resultados apresentados na figura 4 demonstram que a CC, nas concentrações testadas de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g/mL}$ , foi capaz de sequestrar o NO e consequentemente diminuiu o conteúdo de nitrito formado de maneira significativa em 19,6; 22,6; 26,9; 32,3 e 32,1% quando comparado ao grupo NPS, respectivamente. O trolox (140  $\mu\text{g/mL}$ ) produziu uma remoção significativa de 47,96% no conteúdo de nitrito (Figura 4).

Para a remoção de 50% do conteúdo de nitrito por meio do sequestro do NO, foi encontrado um valor de aproximadamente de 0,13  $\mu\text{g/mL}$  para a  $\text{CE}_{50}$  variando de 0,07 a 0,24  $\mu\text{g/mL}$  com intervalo de confiança de 95%. Já o valor da  $\text{CE}_{50}$  da (-)-carvona para o mesmo parâmetro analisado é de aproximadamente 0,18  $\mu\text{g/mL}$  (Costa, 2012). Dessa forma, quando comparados aos valores obtidos com o derivado sintético nas mesmas concentrações, foi verificada uma redução no valor da  $\text{CE}_{50}$  de 27,8%.

A Figura 5 demonstra o potencial antioxidante da ciano-carvona por meio da remoção dos radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ). Nas concentrações testadas, a ciano-carvona foi capaz de remover o radical  $\text{OH}\cdot$  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  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Da mesma forma, o Trolox usado como controle positivo na concentração de 140  $\mu\text{g/mL}$  removeu o radical hidroxila em 67,1% ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao meio reacional (Figura 5).

A concentração efetiva de 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) da ciano-carvona para remoção do radical hidroxila foi determinada como aproximadamente 0,20  $\mu\text{g/mL}$  variando de 0,11 a 0,36  $\mu\text{g/mL}$  com intervalo de confiança de 95%. Por sua vez, o valor da  $\text{CE}_{50}$  da (-)-carvona para o radical hidroxila é de aproximadamente 0,67  $\mu\text{g/mL}$  (Costa, 2012). Dessa forma, quando comparados aos valores obtidos com a ciano-carvona nas mesmas concentrações foi verificada uma redução no valor da  $\text{CE}_{50}$  de 70,14% para o monoterpene em estudo.

Baseado nesses resultados, foi elaborada a proposta de três possíveis mecanismos da ação antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila conforme descritos nas etapas A, B e C da Figura 6.

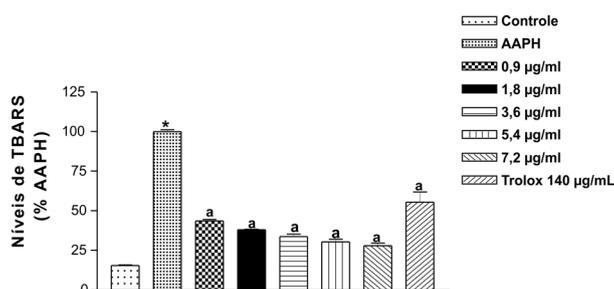


Figura 2: Inibição da formação de TBARS *in vitro* pela ciano-carvona, controle e padrão Trolox. Valores representam média  $\pm$  E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5).  $^{a}p < 0,001$  versus NPS;  $^{*}p < 0,001$  versus controle (ANOVA seguido do teste t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

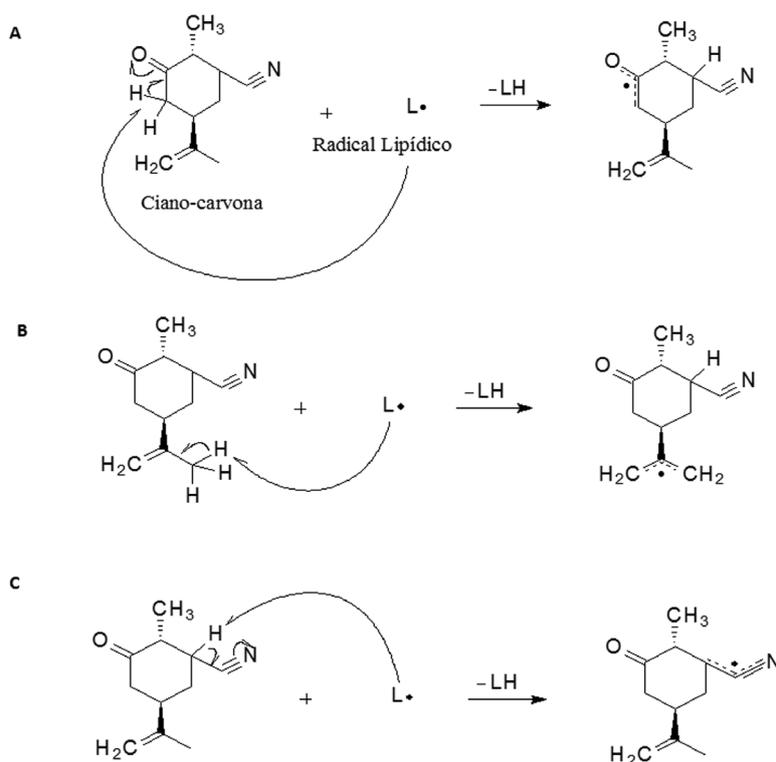


Figura 3: Possíveis mecanismos da ação antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica.

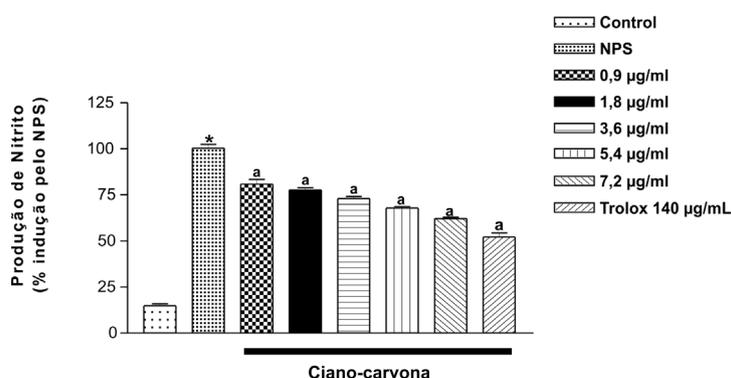
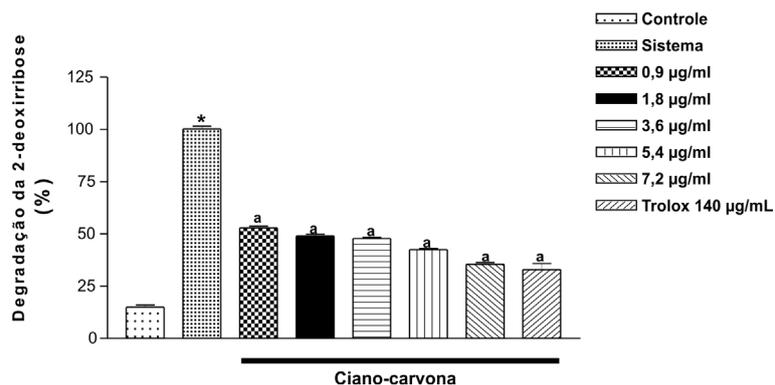
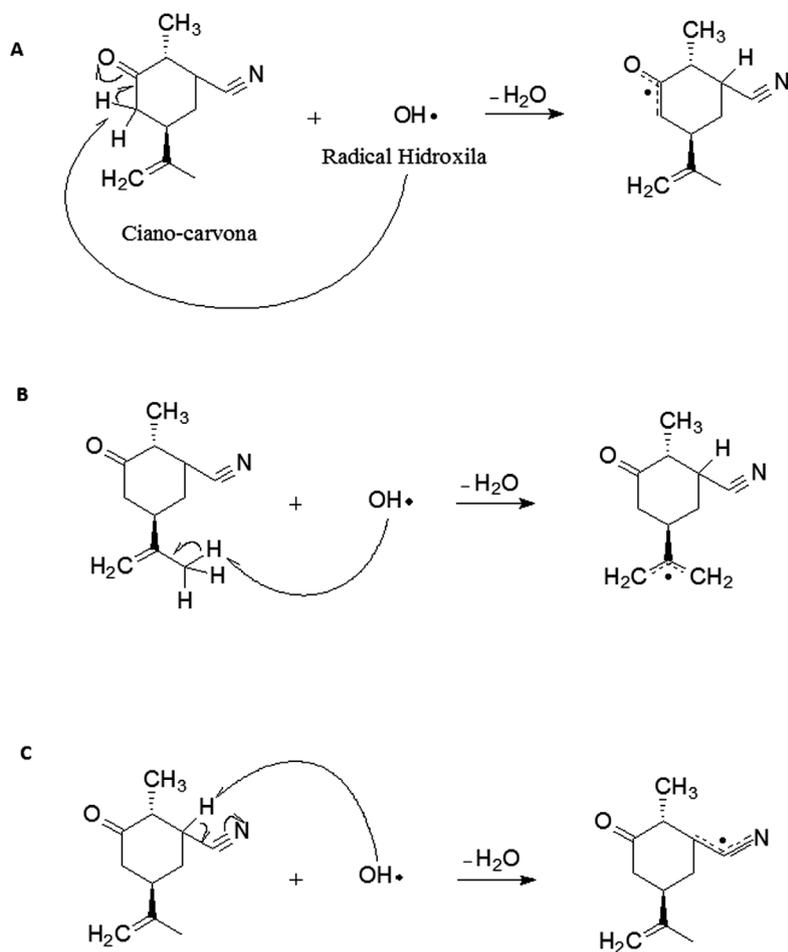


Figura 4: Potencial antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do óxido nítrico. Valores representam média  $\pm$  E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5).  $^{a}p < 0,001$  versus NPS;  $^{*}p < 0,001$  versus controle (ANOVA seguido do teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).



**Figura 5:** Potencial antioxidante da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila. Valores representam média  $\pm$  E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5). \*p<0,001 versus NPS; \*p<0,001 versus controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).



**Figura 6:** Possíveis mecanismos de ação do potencial antioxidante *in vitro* da ciano-carvona contra a formação do radical hidroxila.

## 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

participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nesses processos (Freitas et al., 2005; Ardestani & Yazdanparast, 2007). O aumento na produção de radicais livres pode ocorrer devido à hiperóxia e a 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 os sistemas oxidantes e antioxidantes, no qual ocorre predominância da formação de radicais livres (El-Habit et al., 2000; Freitas et al., 2009).

A concentração da amostra que proporcionou uma remoção de 50% dos radicais livres do meio reacional foi calculada a partir do gráfico de percentagem de remoção em relação à concentração da amostra. Em relação aos valores de  $CE_{50}$ , todas as concentrações e os controles devem esgotar as concentrações dos radicais livres em 50% dentro de 1 h. Quanto menor o valor  $CE_{50}$ , maior o potencial antioxidante da amostra (Ahmadi et al., 2010). Os resultados deste trabalho 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  $CE_{50}$  para os radicais hidroxila, conteúdo de nitrito e nível de TBARS deste derivado de monoterpeno, bem como após a comparação realizada com os valores obtidos para a (-)-carvona, foi verificada uma redução nos valores de  $CE_{50}$  para os três testes empregados neste estudo, sugerindo que ciano-carvona pode apresentar uma melhor viabilidade econômica e aplicabilidade na indústria farmacêutica e em cosméticos.

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* (Manian et al., 2008; Jeong et al., 2011).

Durante o processo oxidativo, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio a partir de uma cadeia de ácidos graxos insaturados de fosfolípidios 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 fragmentos de aldeídos combinados como malonaldeído (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 fosfolípidios, triacilgliceróis e ácidos graxos poliinsaturados, os quais são lipídeos essenciais para a função da membrana celular e sinalização parácrina.

Os resultados obtidos indicam que a ciano-carvona pode exercer potencial antioxidante contra a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio, que precisa ser explorado para justificar o seu possível uso no tratamento de doenças.

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 pelos antioxidantes disponíveis derivados de substâncias naturais ou sintéticas exógenas, bem como por meio 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  $\alpha$ -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante. Este resultado sugere que a CC pode apresentar um potencial antioxidante contra a peroxidação lipídica, uma vez que demonstrou resultados semelhantes e melhores aos observados com o carvacrol e com a (-)-carvona durante a peroxidação lipídica induzida por AAPH, respectivamente (Guimarães et al., 2010; Costa, 2012).

Na avaliação de produção de nitrito, houve uma diminuição significativa na produção deste íon pela ciano-carvona, demonstrando um potencial antioxidante capaz de proteger as biomoléculas, como lipídios da membrana celular contra danos causados pelos radicais livres derivados do nitrogênio. Comparativamente a outros estudos, quanto à capacidade de remover *in vitro* o nitrito, os resultados deste trabalho foram melhores que os estudos com o linalol (Peana et al., 2006), (-)-carvona (Costa, 2012) e a *Morinda citrifolia* Linn (Serafini et al., 2011), sugerindo que o composto avaliado apresenta um efeito promissor 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). Esta molécula também 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 durante 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 e/ou sintéticos com baixa toxicidade e eficácia. Os resultados demonstraram que ciano-carvona produz um melhor efeito sobre a produção do óxido nítrico que a (-)-carvona.

Além disso, na análise do potencial antioxidante contra TBARS e nitrito, também foi observado que a ciano-carvona apresenta um potencial significativo para remover o radical hidroxila presente no meio reacional de forma mais proeminente que o composto usado durante a sua síntese. Desta forma, os resultados sugerem uma possível capacidade de proteção celular contra danos em biomoléculas protéicas que precisam ainda ser mais investigadas. O Trolox (droga padrão) também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Os 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).

O 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 do radical hidroxila de um extrato de uma determinada planta medicinal pode estar diretamente relacionada ao seu potencial 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 de forma mais eficaz que a (-)-carvona (Costa, 2012). Este derivado de monoterpene foi altamente eficaz na inibição dos danos oxidativos produzidos pelo radical hidroxila. Todas as concentrações testadas exibiram um potencial antioxidante significativo, que foi semelhante ao Trolox, um análogo sintético do  $\alpha$ -tocoferol utilizado como um antioxidante padrão.

Estudos anteriores com a R-(-)-carvona (Gonçalves et al., 2010; Bicas et al., 2011) demonstram que este derivado de monoterpene precursor da ciano-carvona induz a expressão da enzima desintoxicante glutatona 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 foram verificados os efeitos da ciano-carvona nesta enzima, bem como ainda é necessário avaliar se a expressão aumentada desta enzima é causa ou consequência do potencial antioxidante observado.

A importância da avaliação do potencial antioxidante pode ser correlacionada às disfunções celulares que são amplamente considerados como responsáveis pela degeneração cerebral ou por 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.

Diante destes resultados, sugere-se um potencial 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 a ação antioxidante da ciano-carvona, principalmente *in vivo* para justificar seu possível uso no tratamento clínico de doenças humanas.

Este trabalho fornece subsídios para a exploração do efeito farmacológico da ciano-carvona. Este composto contém grupamentos químicos com alta reatividade no grupo carbonila, com o H  $\alpha$  na posição alílica e o H  $\alpha$  com o grupamento C $\equiv$ N capazes de produzir a remoção *in vitro* de radicais hidroxila e do íon nitrito, bem como para agir contra a peroxidação lipídica.

O potencial antioxidante da ciano-carvona pode ser devido à presença de sítios susceptíveis, podendo ocorrer

variações quanto à intensidade do potencial antioxidante em função da capacidade dessas estruturas. 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 íons nitrito e dos radicais lipídicos e hidroxila *in vitro*. 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.

## 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

*Assessment of in vitro antioxidant potential of the terpene compound cyano-carvone*

**The *in vitro* antioxidant potential of the monoterpene cyano-carvone was tested against the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and production of hydroxyl radical and nitric oxide. It was observed that cyano-carvone (0.9, 1.8, 3.6, 5.4 and 7.2  $\mu$ g/mL) was capable of reducing lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis-2-amidinopropane (AAPH), thus inhibiting TBARS generation. Similar results were obtained with Trolox (140  $\mu$ g/mL), a synthetic analogue of the hydrophilic  $\alpha$ -tocopherol, which is widely used as an antioxidant standard. This result suggests that cyano-carvone may exert an antioxidant effect against lipid peroxidation *in vivo*. Cyano-carvone also led to removal of the hydroxyl radical, indicating a potential ability to protect against *in vitro* cell damage produced by this radical. Trolox also reduced significantly the amount of this radical. Regarding nitric oxide production, this was significantly lowered by cyano-carvone, demonstrating an antioxidant property *in vitro*, which could be exploited *in vivo* to protect biomolecules such as lipids of the cell membrane. In sum, cyano-carvone showed an *in vitro* antioxidant potential, by its capacity to remove hydroxyl radicals and nitric oxide, and prevented TBARS formation.**

**Keywords:** Antioxidant. Monoterpene. Essential oil. Lipid peroxidation. Hydroxyl radical.

## REFERÊNCIAS

- Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem. 2007;104(1):21-9.
- 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.* 2010;48(5):1137-44.
- Anderson D, Phillips BJ. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(9-10):1015-25.
- Basu S, Hazra B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytother Res.* 2006;20(10):896-900.
- Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(7):1610-5.
- Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):222-30.
- Cocker W, Grayson DH, Shannon PVR. Hydrocyanation of some  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones, and the synthesis of some unusual isoxazoles. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1995;1:1153-62. DOI: 10.1039/P19950001153
- Costa DA. Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamento [Dissertação]. Teresina: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí; 2012.
- El-Habit OHM. The modifying of  $\beta$ -carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in males. *Mutation Res.* 2000;466:179-85.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol.* 1990;186:407-21.
- Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *FEBS J.* 2005;272:1307-12.
- Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 2009;455:140-4.
- García C, Rodríguez P, Días E, Heinzen H, Menéndez P. Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. *J Mol Catal B.* 2009;59(1-3):173-76.
- Gonçalves JCR, Alves AMH, Araújo AEV, Cruz JS, Araújo DAM. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. *Eur J Pharmacol.* 2010;645(1-3):108-12.
- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JPA, Rocha RF, Moreira JCF, Araújo AA, Gelain DP, Quintans-Júnior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(6):949-57.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Comm.* 2010;393(4):561-64.
- Hochstein P, Atallah AS. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat Res Lett.* 1998;202(2):363-75.
- Kawano T, Zoga V, Kimura M, Liang M, Wu H, Gemes G, McCallum JB, Kwok W, Hogan QH, Sarantopoulos CD. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain.* 2009;5:12-31.
- Jeong CH, Kwak JH, Kimb JH, Choi GN, Kima D, Heo HJ. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chem.* 2011;125(2):417-22.
- 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.
- 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 Chem.* 2008;107(3):1000-7.
- Mothana RAA, Hasson SS, 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 Chem.* 2011;126(3):1149-54.
- Okoko T. Chromatographic characterisation, in vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. *Afr J Biotechnol.* 2009;8(24):7133-7.
- Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* 2006;78(7):719-23.
- Rahman S, Dobson PRM, Bunning RAD, Russell RGG, Brown BL. The regulation of connective tissue metabolism by vasoactive intestinal polypeptide. *Regul Pept.* 1992;37(2):111-21.
- Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1302-19.
- Ricciardolo FLM, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):240-252.
- Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69(2):167-174.

- Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 2010;31(10):1949-56.
- 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* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(9):2338-43.
- Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*. 2001;897(1-2):9-19.
- Sousa DP, Raphael E, Brocksom TJ. Synthesis of (R)-(-)- Carvone Derivates. *Z Nat Forsch Sec B, J Chem Sci*. 2010;65b(11): 1381-3.
- Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum Nutr*. 2009;64(4):303-11.
- Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):787-795.
- Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(5):1362-70.
- Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol*. 2001;128:379-91.
- 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.
- Zin ZM, Abdul-hamid A, Osman A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem*. 2002;78:227-31.

Recebido em 27 de fevereiro de 2012

Aceito para publicação em 12 de junho de 2012

