



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JAMILKA LEOPOLDINA DA SILVA

**Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo
Experimental da Doença de Parkinson**

Recife

2014

JAMILKA LEOPOLDINA DA SILVA

**Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em
Modelo Experimental da Doença de Parkinson**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica.**

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Simone Sette Lopes

Recife

2014

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Silva, Jamilka Leopoldina da
Avaliação da atividade neuroprotetora do Eugenol em modelo
experimental da Doença de Parkinson/ Jamilka Leopoldina da Silva–
Recife: O Autor, 2014.

67 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Simone Sette Lopes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação
Terapêutica, 2014.

Inclui referências

1. Parkinson, doença de 2. Testes de toxicidade 3. Rotenona I.
Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Lopes, Simone
Sette (coorientadora) III. Título

616.833

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-077



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 29 de Outubro de 2014.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de Outubro de 2014, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Departamento Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo (Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser meu guia, minha luz e meu amigo durante toda minha vida; À minha mãe Madalena por ser meu alicerce; Ao meu marido Kleison pela força diária ao longo dessa construção; E, ao meu filho Davi por renovar as energias da minha alma todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

À minha mãe, Maria Madalena, por todo amor, pelo carinho, compreensão, exemplo de caráter e perseverança na luta pelas minhas conquistas, por sempre me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos, enfim, pela nobre condição que é atribuída a uma verdadeira mãe.

Ao meu amado marido, Kleison Merlo, por ter sido meu companheiro, meu melhor amigo, minha fortaleza nos momentos de dor. Por seu amor em todos os detalhes.

À minha orientadora Teresinha Gonçalves, pela sua confiança e por seu carinho em sua orientação, pela sua paciência e dedicação na realização deste trabalho. Obrigada por acreditar que eu seria capaz, mesmo com tantas pedras no meio do caminho!

À minha querida amiga Rafaella Nóbrega, por todo o carinho e ajuda com os experimentos, por seus domingos e feriados dedicados a mim, pelo cuidado com o meu filho Davi quando ele ainda estava na minha barriga. Pelos momentos felizes e de crescimento em conjunto. “Rafa, seu apoio foi minha fonte de energia em muitos momentos”.

À Prof^ª. Simone Sette, pelos seus ensinamentos e orientação.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica pelas conversas e momentos de alegria.

Obrigada a todos!

TEMPO DE VIVER

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já tem a forma dos nossos corpos e esquecer os nossos caminhos, que sempre levam aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

SILVA, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson, 2014. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife - PE, Brasil.

O crescimento da expectativa de vida média da população mundial é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea e tem íntima relação com o aumento na prevalência de doenças neurodegenerativas. A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico progressivo, ligado à degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriais, de causas multifatoriais. Os sintomas são relacionados principalmente às funções de coordenação motora e cognição. Evidências demonstram que alterações mitocondriais e elevados níveis de estresse oxidativo estão fortemente associados ao desenvolvimento da DP. No presente estudo, foi avaliado o efeito neuroprotetor do eugenol (EUG) sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração sistêmica de rotenona (modelo experimental da doença de Parkinson) em ratos Wistar. Inicialmente, foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* (AAIV) do EUG através do método de captura do radical livre DPPH. O ensaio de toxicidade aguda do EUG foi realizado conforme OECD 420 (2001). A avaliação comportamental, após indução da DP em ratos, foi feita através dos testes: Campo aberto (CA), Rota Rod (RR), Labirinto em cruz elevado (LCE) e Catalepsia (CP). Ao final dos testes comportamentais, foram mensurados os níveis séricos de corticosterona (NSC), através de ensaio imunoenzimático (ELISA). O EUG apresentou considerável AAIV ($IC_{50} = 32,189 \mu\text{g/mL}$) comparado ao padrão BHT ($IC_{50} = 64,63 \mu\text{g/mL}$). A dose letal mínima do EUG em camundongos foi superior a 2 g/kg. A administração subcutânea de rotenona (2,5 mg/kg por 5 dias) causou significativa perda de peso corporal, déficit motor (teste de RR), rigidez muscular e aumento do tempo de acinesia (teste de CP), elevação dos níveis de ansiedade (teste de CA) e comprometimento da memória (teste do LCE) comparado ao grupo controle (C). O pré-tratamento diário com EUG (37,5 mg/kg, v.o.), uma hora anterior à administração da toxina, promoveu menor perda de peso corporal, melhoramento no desempenho motor e cognitivo, bem como redução nos níveis de ansiedade, comparado ao controle negativo (N). Além disso, o grupo pré-tratado com EUG apresentou, de maneira geral, padrões comportamentais semelhantes, porém melhorados, em relação ao controle positivo (L), pré-tratados com levodopa (4 mg/kg, v.o.). A queda nos níveis de ansiedade foi reafirmada através dos resultados obtidos na análise bioquímica. Os NSCs do grupo N foram significativamente maiores comparados ao grupo C. Não houve diferença significativa nos NSCs entre os grupos C e pré-tratados com EUG; e ainda, foi observado menor NSC nos animais pré-tratados com EUG em relação ao grupo L. Os resultados sugerem potencial efeito neuroprotetor do EUG frente à toxicidade induzida pela rotenona. Esse efeito, provavelmente relacionado à presença das atividades antioxidante e ansiolítica do composto, apresenta o EUG como um agente promissor na terapêutica e/ou prevenção da DP.

Palavras-chave: Parkinson, eugenol, rotenona, neuroproteção

ABSTRACT

SILVA, J. L. Evaluation of the eugenol neuroprotective activity in animal model of Parkinson's disease, 2014. Dissertation. Federal of Pernambuco University, Recife - PE, Brazil.

The increase in average life expectancy of the world population is a great challenge of contemporary public health and it presents close relation to the increase in the prevalence of neurodegenerative diseases. Parkinson's disease (PD) is a progressive neurological disorder linked to degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons caused by multiple factors, and the symptoms are mainly related to the functions of coordination and cognition. Evidences have shown that mitochondrial alterations and elevated levels of oxidative stress are strongly associated to the development of PD. In the present study, it was evaluated the neuroprotective effect of eugenol (EUG) on behavioral and biochemical changes induced by systemic administration of rotenone (an experimental model of Parkinson's disease) in rats. Initially, we evaluated the *in vitro* antioxidant activity (IVAA) of EUG by the method of capturing the free radical DPPH. The acute toxicity of EUG was performed according to OECD 420 (2001). A behavioral evaluation after induction of PD in rats was assessed through the following tests: open field (OF), Rota Rod (RR), elevated plus maze (EPM) and catalepsy (CP). At the end of behavioral testing, the corticosterone serum levels (CSLs) were measured by immunoassay (ELISA). EUG showed considerable IVAA ($IC_{50} = 32,189 \mu\text{g/mL}$) compared to the standard BHT ($IC_{50} = 64.63 \mu\text{g/mL}$). The minimum lethal dose of EUG in mice was higher than 2 g/kg. The subcutaneous administration of rotenone (2.5 mg/kg for 5 days) caused significant weight loss, motor impairment (RR test), muscle stiffness and increased length of akinesia (CP test), elevated levels of anxiety (OF test) and memory impairment (EPM test) compared to the control group (C). Daily pretreatment with EUG (37.5 mg/kg, p.o.), one hour before administration of the toxin, promoted less weight loss, improvement in motor and cognitive performances, as well as a reduction in anxiety levels compared to the negative control (N). Moreover, the EUG pretreated group showed, in general, similar behavioral patterns, but improved relative to the positive control (levodopa 4 mg/kg, p.o.). The reduction in anxiety levels was reaffirmed by the results obtained in biochemical analysis. CSLs of the N group were significantly higher compared to the C group. In CSLs, there was no significant difference between EUG pretreated and C groups; and, less CSL was observed in EUG pretreated group compared to the L group. The results suggest potential neuroprotective effect of EUG against the rotenone-induced toxicity. This effect is probably related to the presence of antioxidant and anti-anxiety activities of the compound. Therefore, EUG may be a promissory drug for the treatment and/or prevention of PD.

Keywords: Parkinson, eugenol, rotenone, neuroprotection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na DP	29
Figura 2	Estrutura Tridimensional do Eugenol	32
Figura 3	Cravo-da-Índia	32

ARTIGO: Eugenol promotes neuroprotective beneficial effects against rotenone-induced behavioral and biochemical changes in rats

Figure 1	The DPPH radical scavenging activity of EUG and BHT.	42
Figure 2	Differences in body weight.	43
Figure 3	Effect of eugenol and L-Dopa pretreatments on locomotor activity in rotenone administrated rats as assessed by open field.	44
Figure 4	Fall off time verified on Rota Rod performance (A) and memory retention% analyzed in Elevated Plus maze test (B) in all groups.	44
Figure 5	Akinesia (inability to move - loss or impairment of the power of voluntary movement) analyzed on Catalepsy test.	45
Figure 6	Corticosterone Serum Levels (CSL).	46
Figure 7	Memory retention-like behaviors correlated with the correspondent serum corticosterone levels.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Precedentes literários a 1817, característicos da Doença de Parkinson.	25
----------	--	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
L-Dopa	Levodopa
MAO	Monoamino oxidase
MDA	Malonaldeído
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻	Aniôn Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
SNC	Sistema Nervoso Central
v.o.	Via oral
v.s.	Via subcutânea
6-OHDA	6-hidroxidopamina

ARTIGO: Eugenol promotes neuroprotective beneficial effects against rotenone-induced behavioral and biochemical changes in rats

BHT	Butylated hydroxytoluene
CSL	Corticosterone Serum Levels
DA	Dopamine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH ^{••}	2,2-difenil-1-picrilidrazil

EPM	Elevated plus maze
EUG	Eugenol
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%
L-Dopa	Levodopa
LD ₅₀	Letal dose 50%
MAO	Monoamine oxidase
MAOB	Monoamine oxidase B
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PD	Parkinson's Disease
p.o.	<i>Per os</i>
ROS	Reactive oxygen substances
s.c.	Subcutaneous
6-OHDA	6-hidroxy dopamine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	Geral	22
3.2	Específicos	22
4	REVISÃO DA LITERATURA	23
4.1	Doença de Parkinson	24
4.1.1	Fisiopatologia da Doença	24
4.1.2	Aspectos Históricos	25
4.1.3	Etiologia	27
4.1.4	Estresse Oxidativo	28
4.1.5	Modelos Experimentais	29
4.1.6	Diagnóstico e Tratamento	30
4.2	Eugenol	31
4.2.1	Características Gerais	31
4.2.2	Atividades Farmacológicas	32
4.2.3	Aplicação Clínica	33
5	RESULTADOS	35
	ARTIGO: Eugenol promotes neuroprotective beneficial effects against rotenone-induced behavioral and biochemical changes in rats	36
	ABSTRACT	36
	INTRODUCTION	36
	MATERIAL AND METHODS	37
	RESULTS	42
	DISCUSSION	47
	CONCLUSION	51
	REFERENCES	51
6	PERSPECTIVAS	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. No Brasil, que já foi considerado um país de jovens, o número de idosos passou de três milhões em 1960 para sete milhões em 1975 e 14 milhões em 2002. Estima-se que esse número alcançará 32 milhões em 2020 e o Brasil será o sexto país no mundo com o maior número de pessoas idosas (LIMA-COSTA; VERAS, 2003). Diante destes estudos e estatísticas, fica claro que o sistema de saúde terá que atender a uma crescente procura por procedimentos diagnósticos e terapêuticos para doenças crônicas não transmissíveis, principalmente as neurodegenerativas, e uma procura ainda maior por serviços de reabilitação física e mental.

Pesquisas constataram que elevados níveis de estresse oxidativo, alterações mitocondriais e apoptose estão associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (BEHL, 1998), Parkinson (ZHANG; DAWSON; 2000) e Huntington (ROSENSTOCK et al., 2004).

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico progressivo, causado pela degeneração de neurônios estriatais responsáveis pela produção de dopamina, neurotransmissor relacionado principalmente à função de coordenação dos movimentos (DEUMENS, BLOKLAND, PRICKAERTS, 2002), atividade cognitiva e límbica (LANG e LOZANO, 1998). Além disso, a degradação espontânea da dopamina gera radicais potencialmente tóxicos aos neurônios (HAUSER e HASTING, 2013).

As manifestações clínicas da DP surgem quando pelo menos 70 a 80% das células dopaminérgicas do estriado e 50% da substância negra são acometidas (OLANOW; TATTON, 1999). As características motoras da DP relacionam-se com tremor em repouso; bradicinesia (lentidão na execução de movimentos), rigidez (hipertonía plástica, acometendo a musculatura flexora, determinando alterações típicas de postura) e distúrbio de equilíbrio (decorrente da perda de reflexos de readaptação postural). Além disso, o envolvimento de processo neuroinflamatório com ativação de células da glia e liberação de citocinas e óxido nítrico, também têm

sido frequentemente mencionados em pacientes portadores de DP (WHITTON, 2007). Estes resultados indicam claramente que o processo de neurodegeneração é multifatorial.

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas, entre os quais alguns modelos transgênicos e outros farmacológicos. A rotenona, um potente membro dos rotenoides, pertencentes à família dos isoflavonoides obtidos de plantas leguminosas tropicais, é comumente usada como pesticida em plantações. Por ser altamente lipofílica, cruza com facilidade a barreira hematoencefálica e alcança neurônios do sistema nervoso central (SNC). A administração sistêmica de rotenona em animais produz alterações anatômicas, neuroquímicas e neuropatológicas semelhantes às observadas na DP, através da indução de apoptose, inibição do complexo I mitocondrial e aumento da produção das espécies reativas do oxigênio (EROS) (BETARBERT et al., 2000).

Existem vários fármacos que podem ser usados no tratamento das doenças neurodegenerativas. No caso da DP, são comumente utilizados precursores da dopamina (L-Dopa), anticolinérgicos (biperideno), inibidores da monoamina oxidase tipo B (selegilina) e agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) com o intuito de aumentar a estimulação dopaminérgica e diminuir a colinérgica. No entanto, o tratamento farmacológico é apenas sintomático, uma vez que nenhum dos fármacos citados é capaz de impedir a progressão da degeneração neuronal. Logo, pesquisas desenvolvidas nessa área são de extrema importância para o conhecimento mais detalhado da fisiopatologia e consequente desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em neuroproteção, na busca da cura e/ou prevenção.

O uso de plantas medicinais ou de seus compostos ativos na prevenção ou tratamento de doenças crônicas é baseado fundamentalmente em dados etnofarmacológicos e na medicina tradicional de vários grupos étnicos. Inúmeras substâncias químicas obtidas de plantas e microrganismos têm proporcionado à indústria farmacêutica uma das mais importantes fontes de componentes para a pesquisa de novos medicamentos. Nas últimas décadas, houve um grande incentivo às pesquisas que têm como objetivo identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (SILVA JÚNIOR, 1997).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Fig. 1) é um composto fenólico que ocorre no cravo-da-Índia, no manjeriço, na canela e na noz-moscada. Mostra-se como um líquido de cor amarelo pálido e, é o componente majoritário de óleos essenciais isolados a partir de *Eugenia carophyllata* (Myrtaceae) (YOGALAKSHMI, 2010). É utilizado como agente flavorizante em produtos cosméticos e alimentícios, além de compor a mistura de cimentos odontológicos (OPDYKE, 1975).

Entre as utilidades farmacológicas, o eugenol vem sendo usado na piscicultura como anestésico sendo importante para reduzir a hiper motilidade dos peixes, que é uma fonte considerável de machucaduras durante procedimentos de manejo e /ou transporte (INOUE et al., 2003; VIDAL et al, 2006). Os anestésicos locais são bases fracas, na sua maioria ésteres ou amidas, que agem no axônio, bloqueando de modo reversível a geração e condução do impulso nervoso. Esses fármacos têm ação sob qualquer parte do sistema nervoso (ROCHA et al, 2002).

Na literatura são citadas algumas atividades farmacológicas do eugenol, que podem ser vistas como promissoras na terapêutica da DP, tais como, antioxidante (ITO et al., 2005), inibidor da peroxidação lipídica pela varredura de radicais livres (NAGABABU; LAKSMAIAH, 1994) e protetor contra danos isquêmicos (WON et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

“A população no mundo está ficando cada vez mais velha e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), por volta de 2025, pela primeira vez na história, haverá mais idosos do que crianças no planeta.”

Nos últimos anos, o crescimento da expectativa de vida média da população mundial tem levado a um grande aumento na prevalência de doenças neurodegenerativas. O maior desafio no século XXI será cuidar dessa população crescente de idosos, a maioria com níveis socioeconômico e educacional baixos e uma alta prevalência de doenças crônicas e incapacitantes. Diante disso, tem havido um crescente interesse em estudos de novas estratégias para a prevenção e cura, ou seja, que ultrapassem a ação sintomática e impeça o progresso de patologias como Alzheimer, Parkinson e Huntington.

O uso de plantas medicinais ou seus compostos ativos na prevenção ou tratamento de doenças crônicas é baseado fundamentalmente na medicina tradicional de vários grupos étnicos e em dados etnofarmacológicos. Inúmeras substâncias químicas obtidas de plantas e microrganismos têm proporcionado à indústria farmacêutica uma das mais importantes fontes de componentes para a pesquisa de novos medicamentos, com incentivo a identificação de produtos naturais que apresentem propriedades terapêuticas.

O projeto de pesquisa desenvolvido buscou investigar a atividade neuroprotetora do eugenol, um composto fenólico extraído de plantas, como agente promissor, que possa contribuir para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças neurodegenerativas ou incrementar as terapias já existentes.

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito neuroprotetor do eugenol (4-alil-2-metoxifenol) sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração sistêmica da rotenona (modelo experimental da doença de Parkinson) em ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do eugenol;
- Avaliar a toxicidade aguda do eugenol em camundongos (machos e fêmeas);
- Analisar o efeito do eugenol sobre o comportamento de animais através dos testes: Campo Aberto (avaliação motora e comportamental), Rota Rod (coordenação motora), Labirinto em Cruz Elevado (avaliação da retenção de memória) e Catalepsia (ação motora), em modelo experimental da DP.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com eugenol sobre os níveis séricos de corticosterona após indução da DP.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Doença de Parkinson (DP)

4.1.1 Fisiopatologia

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico progressivo, com prevalência estimada de 2% da população mundial com idade superior a 55 anos (PRZEDBORSKI, 2005). É causada pela degeneração de neurônios estriatais responsáveis pela produção de dopamina (DA), neurotransmissor relacionado principalmente à função de coordenação dos movimentos (DEUMENS, BLOKLAND, PRICKAERTS, 2002).

As características motoras da DP relacionam-se com tremor em repouso; bradicinesia (lentidão na execução de movimentos), rigidez do tônus muscular (hipertonia plástica, acometendo a musculatura flexora, determinando alterações típicas de postura) e distúrbios do equilíbrio (decorrente da perda de reflexos de readaptação postural e de distúrbios da marcha) (LANG; LOZANO, 1998; HOWELLS et al., 2005).

Paralelo aos sintomas motores, pacientes portadores da DP geralmente apresentam manifestações comportamentais, tais como comprometimento da memória (HOWELLS et al., 2005), distúrbios cognitivos e do sistema nervoso autônomo (DÍAZ et al., 2001), alterações do sono (GARCIA-BARREGUERO; LARROSA; BRAVO, 2003) e depressão (DA SILVA et al., 2008).

Bioquimicamente, a principal alteração relacionada a DP é a redução dos níveis encefálicos de DA, causada pela perda dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. Esses neurônios têm seus corpos celulares localizados na substância negra e seus axônios projetados para os núcleos caudado-putâmen ou corpo estriado (BOVÉ et al., 2000). A depleção neuronal dopaminérgica gera despigmentação da substância negra (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003) visualizada como inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy (EMBORG, 2004) e, intensa redução dos níveis de DA no estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), que

correspondem aos sintomas evidenciados na DP. Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que a manifestação dos sintomas ocorre quando a redução das células dopaminérgicas neuronais excede aproximadamente 50% na substância negra, e quando os níveis estriatais de DA são depletados em aproximadamente 80% (DEBEIR et al., 2005).

4.1.2 Aspectos Históricos

A doença de Parkinson foi primeiramente descrita por um clínico geral chamado James Parkinson, num encontro médico em 1817. Porém, desde o século XVI, houvera precedentes literários característicos e sugestivos da DP (Tabela 1).

Tabela 1: Precedentes literários a 1817, característicos da Doença de Parkinson.

Período	Nome	Informações pessoais	Descrição dos sintomas característicos da Doença de Parkinson
Século XVI	William Shakespeare (1564-1616)	Médico e escritor	Descreveu várias condições neurológicas, incluindo epilepsia, sonambulismo e demência. Lançou o conceito de tremor como sendo uma condição normal que acompanha o envelhecimento (Charcot, 1888).
Século XVII	Franciscus de Le Boë (1614–1672)	Conhecido como Sylvius de Le Boë, médico anatomista	Descreveu tremor e distúrbios do movimento involuntário (Finger, 1994).
Século XVIII	François Boissier de Sauvages de La Croix (1706-1767)	Médico	Descreveu características de pacientes com distúrbios locomotores (movendo-se com passos curtos e apressados) e relacionou estes eventos à redução da flexibilidade muscular (Sauvages de La Croix, 1763).
Século XVIII	Wilhelm Von Humboldt (1767-1835)	Reformador acadêmico e escritor	Viveu a era do Parkinson e descreveu suas próprias condições neurológicas com detalhes sobre tremor e bradicinesia (Horowski, 1995).

Fonte da autora.

A primeira publicação oficial intitulada “*Hunterian Reminiscences*” foi escrita por Jon Hunter em 1833, e contém um somatório de observações sobre tremor.

Pouco tempo depois, o neurofisiologista francês Jean-Martin Charcot, em um grande hospital de Salpêtrière, iniciou uma fase de relevantes estudos sobre a DP, na qual retratou hábitos, deformidades articulares e anormalidades posturais (Goetz, document collection), e, evidenciou a bradicinesia e a rigidez como características fundamentais da doença (Goetz, 1987). Charcot (1869) observou também uma correlação entre a DP e curvas miográficas em 1869, indicando presença do tremor no repouso e aumento das oscilações durante o movimento voluntário. Além disso, ele reconheceu como método de diagnóstico a avaliação do comprometimento da escrita manual devido ao tremor.

O tratamento farmacológico para a DP proposto por Charcot em 1877 sugeria o uso de alcaloides belladona, agentes com potenciais propriedades anticolinérgicas. A prescrição era empírica e baseada apenas no conhecimento do equilíbrio dopaminérgico/colinérgico presente na atividade neuroquímica estriatal normal (Philadelphia college, document collection). No entanto, Charcot também propôs terapias alternativas envolvendo cadeiras e capacetes vibratórios. Os materiais foram criados para reduzir o nível de tremor, baseado na observação de pacientes que tiveram tremor reduzido após passeios de carruagem e a cavalo (Goetz, 1995). Porém, essas terapias não foram largamente utilizadas (KAPPUR et al., 2012).

Em 1885, Tourette, em seu trabalho intitulado “Estudos Clínicos e Fisiológicos da Marcha”, mostrou diferenças nos padrões da marcha de pessoas com e sem a DP. Ainda no século XIX, o neuropatologista Eduard Brissaud contribuiu com importantes informações clínicas atentadas para a substância negra como sendo principal local de origem da DP (Brissaud, 1895).

Finalmente, as intervenções cirúrgicas com equipamentos estereotáxicos surgiram em 1909 por Victor Horsley (1857-1916) e resultaram em melhora substancial dos movimentos involuntários, primeiramente em modelos animais e em seguida em humanos. A introdução do tratamento farmacológico com levodopa (L-Dopa) em 1967 mudou significativamente a rota do cuidado clínico aos pacientes com a DP.

As contribuições do século XIX e XX foram de grande valor para o desenvolvimento do conhecimento sobre os aspectos neurodegenerativos envolvidos na DP, no entanto, ainda há muito para ser elucidado.

4.1.3 Etiologia

Embora a etiologia da DP seja ainda desconhecida, achados clínicos e experimentos animais tem possibilitado melhor entendimento da patogênese. A redução celular dopaminérgica está associada aos multimecanismos que incluem excitotoxicidade, homeostase do cálcio, neuroinflamação e apoptose (ESPOSITO et al., 2007). Fatores genéticos como presença do gene parkina ou mutações em proteínas do estriado (HOWELLS et al., 2005) tem sua relevância. No entanto, estudos mostram que apenas 5% dos casos da DP apresentam correlação com esses fatores (EMBORG, 2004).

A investigação pela etiopatogênese tomou força a partir da descoberta de toxinas indutoras da doença em modelos animais (ESPOSITO et al., 2007). Toxinas capazes de inibir reações fosforilativas na cadeia mitocondrial podem promover danos geradores de intensa morte celular (DUNNET; BJÖRKLUND, 1999) e aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). As EROs mais comuns são os radicais superóxidos ($-O_2^{\bullet}$). Esses radicais formam outros (hidroxil [$-OH^{\bullet}$] ou ainda reagem com óxido nítrico (NO) formando peroxinitritos ($-ONOO^{\bullet}$), causadores de danos celulares através da interação com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

No organismo humano, a formação de EROs é decorrente de vários processos metabólicos fisiológicos e, embora possam ser formadas em vários níveis no interior das células, a principal fonte é a cadeia respiratória mitocondrial, que faz parte do processo de fosforilação oxidativa.

As EROs são fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos por participarem de processos de defesa, entretanto, seu excesso pode produzir danos celulares irreversíveis. A redução da capacidade antioxidante celular associada à presença de altas quantidades de lipídeos torna o SNC propenso ao ataque dos radicais livres. Em soma, a investigação sobre processo neuroinflamatório com

ativação de células da glia e liberação de citocinas e NO também tem sido frequentemente mencionado como ponto de partida em pacientes portadores de DP (WHITTON, 2007).

4.1.4 Estresse Oxidativo

Os efeitos nocivos que as EROs causam às macromoléculas, tais como, proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos, são denominados de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006). Quando há um excesso de EROs nas células e, conseqüentemente, um desequilíbrio nos processos pró-oxidantes e antioxidantes do organismo em favor da atividade pró-oxidante, há um aumento no dano celular que, quando não reparado, acaba comprometendo o funcionamento da célula, levando-a à morte. As EROs têm sido consideradas como pré-requisito para o processo apoptótico e o estresse oxidativo teria assim um papel central neste processo (CHANDRA et al., 2000), por estar intimamente associado ao processo de morte celular por apoptose (KAGAN et al., 2002).

No entanto, na DP, o estresse oxidativo continua a ser um obstáculo nos conceitos subjacentes à perda de neurônios dopaminérgicos. Há fatores endógenos relevantes envolvendo genética e idade. Assim como, a degradação espontânea da dopamina, responsável pela geração de radicais potencialmente tóxicos aos neurônios (HAUSER e HASTING, 2013) pode causar danos ao DNA mitocondrial (ZHANG et al., 1999).

Alguns autores afirmam ainda, a partir de ensaios animais, o envolvimento da produção de radical livre resultante do aumento da oxidação enzimática da dopamina através da ação de toxinas, tais como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquat e rotenona (Figura 1). No entanto, em provas autopsiadas e investigações clínicas, o estresse e o dano oxidativos surgiram independentes (JENNER; OLANOW, 2006). Logo, considerando que haja uma causa direta para o aumento da produção de EROs, é praticamente impossível detectar os potenciais indutores de estresse oxidativo.

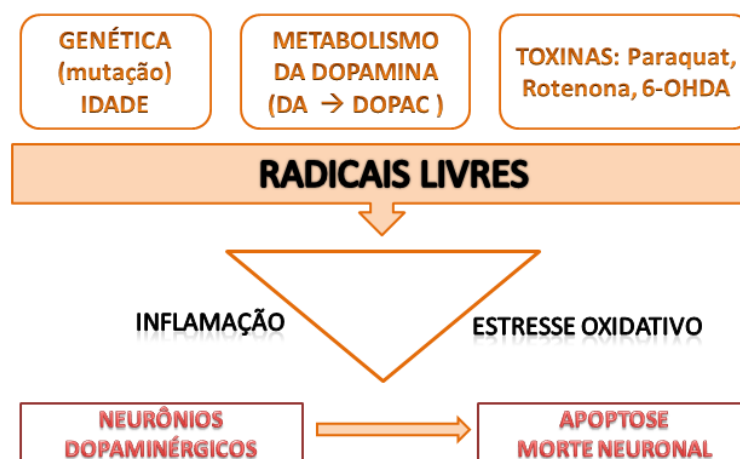


Figura 1: Mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na DP. Fonte da autora.

Dados investigativos sobre o acúmulo de ferro no SNC mostrou haver mudanças na atividade dos canais de cálcio, agregação proteica e mutação nuclear, podendo representar este evento uma forma de como o estresse oxidativo é induzido na DP (SCHAPIRA; JENNER, 2011).

A natureza das causas de morte celular na DP, bem como os caminhos pelos quais ocorre a perda neuronal, ainda é pouco específica, especialmente sobre o papel do estresse oxidativo, visto que estes eventos também ocorrem em outras doenças. Com base nesses resultados, fica claro que o processo de neurodegeneração é multifatorial, ou seja, a depleção neuronal não resulta apenas dos danos mitocondriais, mas da convergência de vários fatores patogênicos.

4.1.5 Modelos Experimentais

Modelos animais têm grande importância no meio científico, pois refletem características da doença simulando alterações patológicas, histológicas e bioquímicas, bem como seus distúrbios funcionais. Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas, entre os quais alguns transgênicos e outros farmacológicos. A manifestação da DP em animais é observada quando há aplicação de agentes neurotóxicos, como por exemplo, a rotenona ou 6-OHDA (DÍAZ et al., 2001).

A rotenona, um potente membro dos rotenoides, pertencente à família dos isoflavonoides obtidos de plantas leguminosas tropicais, é comumente usada como pesticida em plantações (MAPOPE e DAKORA, 2013). Por ser altamente lipofílica, a rotenona cruza com facilidade a barreira hematoencefálica e alcança neurônios do SNC.

A administração sistêmica da rotenona produz alterações anatômicas, neuroquímicas e neuropatológicas semelhantes às observadas na DP, através da inibição do complexo I mitocondrial e consequente aumento das EROS (BETARBET et al., 2000). O acúmulo de radicais produz inflamação, reação microglial e induz apoptose (LEE et al., 2014). Sherer e colaboradores (2003) mostraram, em seus estudos, que a exposição subcutânea à rotenona nas doses de 2 a 3 mg/kg é responsável por lesões seletivas em neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, sem contudo promover danos em outras regiões. Sendo assim, pode-se estabelecer o uso desse modelo animal como método eficaz para indução da DP.

4.1.6 Diagnóstico e Tratamento

No tratamento da DP, inicialmente foram utilizados fármacos anticolinérgicos (biperideno) (BARBOSA, 2003), porém as alterações cognitivas como efeito colateral não foram interessantes (Shapira et al., 2006).

Com intuito de reverter a depleção da DA, a introdução do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) na década de 60 se deu de maneira promissora e se manteve até a atualidade como fármaco de primeira escolha no tratamento dos sintomas da DP (SAMADI et al., 2006). Porém, embora seja considerado o fármaco mais efetivo, L-Dopa é responsável pelo aparecimento de complicações motoras (discinesias) (JULIEN et al., 2006) e movimentos involuntários (mioclonias, distonia e estereotípias) (BENDIR et al., 2006) após 5 anos de tratamento (CARDOSO, 2003). Inibidores da monoamina oxidase (MAO) tipo B (selegilina) e agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) também foram utilizados com a proposta de aumentar a estimulação dopaminérgica. No entanto, o tratamento farmacológico é apenas sintomático, uma vez que nenhum dos fármacos citados é capaz de impedir a progressão da degeneração neuronal.

Estudos evidenciaram que os flavonoides, um grande grupo de compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais, têm ação protetora contra os efeitos do estresse oxidativo, atuando em ambos os compartimentos celulares, lipofílicos e hidrofílicos, e, portanto, capazes de inibir a peroxidação lipídica (BASTIANETTO, ZHENG, QUIRION, 2000).

O uso combinado de agentes antioxidantes, como por exemplo, vitaminas E e C, tem se mostrado mais efetivo do que o uso isolado das mesmas, indicando que as características isoladas de cada agente podem complementar-se, induzindo uma ação neuroprotetora sinérgica (MANDEL; YODIM, 2004).

Embora o efeito benéfico neuroprotetor de compostos naturais antioxidantes tenha sido amplamente comprovado *in vitro*, estudos clínicos têm apresentado resultados controversos. Por um lado, esses resultados podem estar relacionados ao caráter multifatorial das doenças neurodegenerativas, o que demanda diversos níveis de proteção. Por outro lado, estariam relacionados à capacidade dos compostos antioxidantes de cruzar ou não a barreira hematoencefálica em quantidades suficientes para proteger o SNC (DAJAS et al., 2003).

Logo, pesquisas desenvolvidas nessa área são de extrema importância para o conhecimento mais detalhado da fisiopatologia e consequente desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em neuroproteção, enfocando a ingestão combinada de antioxidantes de diversas naturezas, que possam atuar sinergicamente para combater o estresse oxidativo induzido no SNC.

4.2 Eugenol

4.2.1 Características Gerais

O eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol) (Figura 2) é um composto fenólico que está presente no cravo-da-índia, no manjeriço, na canela e na noz-moscada (YOGALAKSHMI et al., 2010). No cravo-da-índia (Figura 3), esse composto representa entre 89,5% e 98% da composição do óleo essencial e do extrato aquoso, respectivamente (RODRIGUES et al., 2009). Apresenta-se, à temperatura ambiente, como um líquido oleoso, incolor ou amarelo claro, mas quando em contato

prolongado com o ar, torna-se mais espesso e de cor vermelho escuro. Possui odor característico, semelhante ao cheiro do cravo-da-índia, além de sabor ardente e picante (ALMEIDA, 2004).

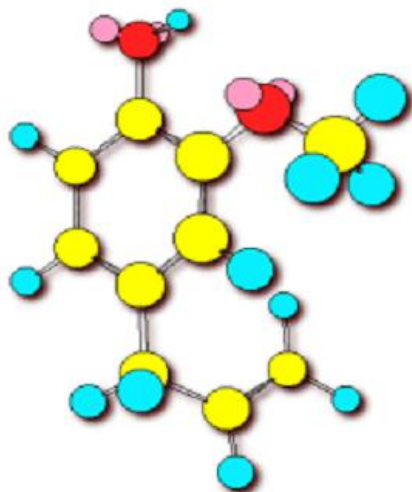


Figura 2: Estrutura tridimensional do Eugenol



Figura 3: Cravo-da-Índia

Fonte: <http://www.jardimdomundo.com>

O eugenol apresenta ampla utilização na indústria de cosméticos e de alimentos, como aromatizantes para culinária, bebidas e doces (YOGALAKSHMI et al., 2010). Ele está presente em vários óleos essenciais e sua alta lipossolubilidade possibilita uma fácil absorção do fármaco através das membranas celulares e rápido acesso ao local de ação, podendo atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias (USTA et al., 2002), ou ainda, penetrar com rapidez a bainha de mielina de uma fibra ou de um feixe nervoso (GURNEY, 1965).

4.2.2 Atividades Farmacológicas

Apesar de existirem estudos com o eugenol que datam do século XIX, foi na segunda metade do século XX que se verificou um interesse maior na pesquisa com este componente, sendo muitos dos trabalhos publicados ligados à odontologia (BONASTRE, 1967). Atualmente, o eugenol vem sendo extensivamente estudado, já tendo sido caracterizados diversos efeitos biológicos.

Segundo Hume (1988), seus efeitos farmacológicos dependerão da concentração e do tempo de exposição e/ou de contato entre ele e as células. Dentre as propriedades biológicas podemos verificar atividades: anti-inflamatória (REDDY E LOKESH, 1994), analgésica (SNEDDON; GLEW, 1973), anestésica (GUENETTE et al., 2006), antimicrobiana (MARKOWITZ et al., 1992; VÁZQUEZ et al., 2001; ESCOBAR, 2002; DEVI et al., 2010), antifúngica (PINTO et al., 2009), anti-helmíntica em ruminantes (PESSOA et al., 2002), antipirética (quando administrado periférica ou centralmente reduzindo a febre por ação central, igualmente ao acetoaminofeno) (FENG; LIPTON, 1987), antioxidante (OGATA et al., 2000; JIROVETZ et al., 2006; GÜLÇİN, 2011), neuroprotetora (KABUTO et al., 2007; WIE et al., 1997).

4.2.3 Aplicação Clínica

O eugenol é utilizado em práticas odontológicas como: antisséptico tópico, analgésico e anestésico local, além de conferir propriedade farmacológica bactericida aos cimentos utilizados em canais (em concentrações relativamente altas de 10^{-3} a 10^{-2} mol/L), sendo, portanto, eficaz no tratamento de enfermidades infecciosas na cavidade oral (MARKOWITZ et al., 1992; ESCOBAR, 2002). Também é utilizado como cimento provisório em cavidades dentárias, associado ao óxido de zinco (NAGABABU; LAKSHMAIH, 1994). A união do eugenol com o óxido de zinco ocorre devido a uma reação de quelação para formar o eugenolato de zinco. O eugenolato de zinco, quando analisado estruturalmente, apresenta conformação de grãos de óxido de zinco embebidos numa matriz de eugenolato de zinco. Ao ser exposto a meio aquoso (como a saliva e o fluido dental), ocorre uma hidrólise do eugenolato liberando hidróxido de zinco e eugenol, que se difundem da dentina para a polpa, onde produz efeitos anti-inflamatórios e anestésicos (MARKOWITZ et al., 1992).

O eugenol também é capaz de inibir a peroxidação lipídica pela varredura de radicais livres como as EROs. A estrutura metoxifenólica da molécula é a principal responsável por essa atividade antioxidante (TAIRA et al., 1992; NAGABABU; LAKSMAIAH, 1994; ITO et al., 2005). Possui também efeito modulador nas

concentrações intracelulares de substâncias antioxidantes como a glutathione e a enzima glutathione-N-transferase (ROMPELBERG et al., 1996; YOKOTA, 1988; KABUTO et al., 2007). O eugenol pode ainda promover neuroproteção contra dano isquêmico através de sua ação hipotérmica e por modulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e do radical superóxido (WON et al., 1998; WIE et al., 1997).

Foi verificado ainda, importância do eugenol na reversão da disfunção hepática, na coagulação intravascular disseminada (CIVD), na hipoglicemia severa e na morte por falência múltipla de órgãos (ESCOBAR, 2002). Porém, esses efeitos tóxicos graves estão relacionados a altas doses (ALMEIDA, 2004).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho constam no artigo seguinte, a ser submetido à publicação na revista Behavioral Brain Research.

Eugenol promotes neuroprotective beneficial effects against rotenone-induced behavioral and biochemical changes in rats

Da Silva, J. L. (a); Nóbrega, R. F. (b); Fernandes, M. P. (c); Almeida, C. L. F. (a); Lafayette, S. S. L. (d); Da Silva, T. G. (a)*

(a) Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife – PE, Brazil

(b) Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

(c) Center for Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco - Center Academic of Vitória, Vitoria de Santo Antão – PE, Brazil

(d) Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

*Corresponding author at: Department of Antibiotics, CCS, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil
E-mail address: teresinha100@gmail.com

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive nervous system dysfunction and the typical symptoms includes motor and behavioral changes. In this study, it were examined the neuroprotective effects of eugenol (EUG) against rotenone-induced behavioral and biochemical changes (experimental model of PD) in rats. The behavioral evaluation was done through the tests: open field, Rota Rod, elevated plus maze and catalepsy. At the end of behavioral tests, the corticosterone serum levels (CSL) were measured by radioimmunoassay Elisa. Daily pretreatment with EUG 37.5 mg/kg, one hour before the rotenone administration, promoted less weight loss, improvement in motor and cognitive performance as well as reduction of anxiety levels. EUG pretreatment also prevented the increase of CSL. Thus EUG could be a therapeutic adjuvant for the treatment or prevention of PD.

Keywords: Eugenol; Parkinson's disease; rotenone; behavioral parameters

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive nervous system dysfunction and neuroinflammation (Morelli et al., 2012) as well as motor symptoms, including akinesia, rigidity, tremor and, instability of gait and posture. Motor and behavioral changes were related to striatal dopamine (DA) depletion as a result of the degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons. The pharmacologic treatment of PD with the dopamine precursor, 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-Dopa), has been used to alleviate the motor symptoms (Fahn et al., 2004). However, DA depletion and prolonged use of L-Dopa create an imbalance in striatal

neurotransmitter systems (Huot et al., 2013) and induces motor response complications, such as abnormal involuntary movements (AIMS) or dyskinesias that occur within a few years of treatment (Ahlskog and Muentner, 2001).

Eugenol (EUG) (4-allyl-2-methoxyphenol) is a phenolic compound naturally occurring in clove, basil, cinnamon and nutmeg (YOGALAKSHMI et al., 2010). This compound is also used in dental practices as a cement material and as a sedative agent (Markowitz et al., 1992). Pharmacological properties of EUG were demonstrated and includes anti-inflammatory (Reddy and Lokesh, 1994), analgesic (Sneddon and Glew, 1973), anesthetic (Guenette et al., 2006), antipyretic (Feng and Lipton, 1987), anti-bacterial, and a monoamine oxidase (MAO) inhibitor (Tao, G. et al., 2005). EUG and isoeugenol (an isomer of EUG) are well known as good antioxidant agents (Cullere et al., 2004), that might express beneficial effects in PD.

Many animal models were used to simulate neurodegenerative diseases. Rotenone-induced model of Parkinsonism is regarded as the one nearest to the human disease for its progressive dopaminergic neuronal lesion accompanied by oxidative stress (Saravanan et. al., 2005).

In this study, we examined the neuroprotective effects of EUG against rotenone-induced behavioral and biochemical changes (experimental model of Parkinson's disease) in rats.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Rotenone (98% stated purity) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and was prepared using dimethylsulfoxide (DMSO) as a solvent and emulsified in corn oil at a 1:9 ratio (adapted of Yang, L. et al., 2012). EUG was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) dissolved in Tween 80 2% and diluted in distilled water. Butylated hydroxytoluene (BHT) and, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), were also acquired from Sigma.

Evaluation *in vitro* antioxidant activity of eugenol

The antioxidant activity of EUG was determined by the capture of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil) radical assay according to the method described by Brand-

Williams and colleagues (1995). Aliquots of 0,5 mL of a solution containing different concentrations of EUG (2.5 – 250 µg/mL) were added to 1.5 mL of ethanolic solution of DPPH·(1mM). The solutions were homogenized and incubated (in the dark) for 30 min at room temperature and the absorbance of the resulting solution was read in a spectrophotometer at 515 nm against a blank. The radical scavenging activity was measured as an absorbance decrease of DPPH and was calculated using the following equation:

$$\% \text{ protection} = \frac{(\text{Abs of control} - \text{Abs of sample})}{\text{Abs of control}} \times 100$$

BHT was used in experiments as a positive control. It was calculated the value of IC₅₀ (concentration of sample required to inhibit 50% of radical) of BHT and EUG.

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) weighing between 300 - 350g were used for neuroprotective experiments. The animals were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology from the Federal University of Pernambuco (UFPE). Male and female mice (35 - 40 g) (*Mus Musculus*, var. *Swiss*) used for oral toxicity of EUG were obtained from the Department of Antibiotics from the Federal University of Pernambuco (UFPE). The animals were kept under standard conditions of light and dark cycle (12 h dark/light cycle) and temperature (22 ± 2 °C) with water and commercial feed (Labina®, Purina, Brazil) *ad libitum*. All the experimental methods were submitted to and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the UFPE, under license nº.23076.024562/2014-74 in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Oral acute toxicity

Acute toxicity studies were performed on Swiss mice of both sexes as described by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 420 (2001), with slight modifications. The animals were randomly divided into two groups (n=5/group/sex) and deprived of feed for 12 h with access to water *ad libitum*. The treated group received EUG (dissolved in Tween80 2% and diluted in distilled water)

in a single *per os* (p.o.) dose of 2.0 g/kg, and the control group received vehicle (Tween80 2% diluted in distilled water) dose of 10 mL/kg. The observations were performed at 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after the oral treatments and daily for 14 days. Behavioral changes, weight, consumption of food and water, clinical signs of toxicity and mortality were recorded daily (Malone, 1977).

Experimental groups

The animals were randomly divided into seven groups (n=8/group) and they were pretreated for five days. They received vehicle (water 10 mL/kg, p.o.), or L-Dopa (4 mg/kg, p.o.), or EUG as pretreatment. One hour after, they received administration of the mitochondrial neurotoxin rotenone (2.5 mg/kg, s.c.) to induce PD or vehicle DMSO/corn oil (10%:90%) 1 mL/kg subcutaneously (s.c.).

Group 1 (control - "C"): received vehicle p.o. and DMSO/corn oil s.c.

Group 2 (negative control - "N"): received vehicle p.o. and rotenone s.c.

Group 3 (positive control - "L"): received L-Dopa p.o. (standard drug for PD) and rotenone s.c. The animals were kept without food for one hour before and one hour after administration of L-Dopa to avoid problems in drug absorption.

Groups 4, 5, 6 and 7 (EUG pretreated groups): received oral doses of EUG according to the group (12.5 mg/kg; 25 mg/kg; 37.5 mg/kg; or 50 mg/kg, p.o.); and rotenone s.c.

EUG at the dose 6.25 mg/kg was tested in this study and it was not effective. Behavioral tests were performed during the pretreatment period (Catalepsy) and twenty four hours at the end thereof Open field, Elevated plus maze (EPM), Rotary axis (Rota rod) and, Catalepsy. At the end of the behavioral tests, the animals were anaesthetized intraperitoneally (i.p.) with Ketamine/Xylazine hydrochloride 50:5 (mg/kg) (CEVA, Sespo Industry, Brazil), decapitated and the trunk blood was collected for biochemical assay.

Body weight measurement

Each rat was weighed prior to the daily administration of EUG, L-Dopa, or water.

BEHAVIORAL TESTS

Locomotor activity

The rats were placed individually one single trial for 300s in the center of an open-field circular arena (diameter 100 cm, high 40 cm, a floor divided into 20 quadrants). The start time for movement (latency), the locomotion frequency (quadrants traversed), the rearing frequency, and immobility time were recorded and used as parameters to assess exploratory behavior. This procedure was similar to that described by Bernardi and Palermo-Neto (1979); and, Palermo-Neto (1982).

Rota rod test

The Rota rod test method is used to assess balance and motor coordination through the animal permanency time on a rotating rod of 7 cm diameter, 20 cm length, 20 cm height which rotate 25 rpm. The animals were selected 24 hours before the experiments (the pretreatment). They were chosen only those animals that remained on the rotating rod for at least two consecutive periods of 60 seconds each. These animals were pretreated with EUG, L-Dopa or vehicle. At the end thereof, animals were analyzed at the rota-rod for a period of 180 seconds and the animal permanency time was recorded (adapted of Kumar and Kumar, 2009).

Elevated Plus Maze (EPM) test

The elevated plus maze (EPM), a test used as a measure of anxiety, memory retention and exploratory behavior, consists of two opposite open arms (50x10 cm) and two closed arms of the same dimension, with 40 cm walls and a central area (10x10 cm) connecting the arms. In this study, the EPM test was used to evaluate the memory retention. The rats were placed individually at one end of an open arm facing away from the central area; the time taken by the animal to move from the open arm until the closed arms (latency time A) was recorded in the last day of pretreatment and 24 hours after (latency time B) (Kumar et al., 2006). The percentage of memory retention was calculated by the formula:

$$\frac{(\text{Latency time A} - \text{Latency time B}) \times 100}{\text{Latency time A}}$$

Catalepsy

Catalepsy is a physiological change defined as the inability to respond to a non-natural position imposed on the animal (SANBERG et al., 1988). This behavior can be understood as the inability to initiate voluntary movement (akinesia called aspect), characteristic of PD (DUTY; JENNER, 2011). Catalepsy testing was done 1 hour after the s.c. injection of rotenone or DMSO/corn oil daily during pretreatment, only 4 groups: C, N, L and T (dose-response better showed in the Open field, Rota Rod and EPM tests). Both forepaws were placed on a horizontal bar (diameter 1.5cm, height 20cm, and length 10cm) and the latency was measured by the permanency time of the animal in the position described with a cut-off time of 180 seconds (adapted from DEKUNDY et al., 2006).

Corticosterone serum levels (CSL)

Immediately after decapitation, an aliquot of trunk blood was collected and centrifuged 2500xg for 15min at 4°C. The serum was frozen at -80° C until analysis.

Corticosterone serum levels (ng/mL) were measured by radioimmunoassay method thought of Corticosterone Elisa kit for rat/mouse (DRG International, Inc, USA). The sensitivity of this assay was 4.1 ng/mL at the 2SD confidence limit. This biochemical analysis was done to groups C, N, L and T (dose better showed in all the behavioral tests).

Statistical Analysis

Results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. The difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$) using Graph Pad Prism® 5.0. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Pearson's correlation coefficient (r) was calculated to establish relationships between memory retention-like behaviors obtained in the EPM test and respective CSL. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Mann-Whitney test was used to evaluate the catalepsy partner between groups C, N, L and, T.

RESULTS

Reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical

DPPH radical scavenging activity was evident in all concentrations tested of EUG. The preparation was able to reduce the stable free radical DPPH to the yellow-colored 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl with an IC_{50} 32,189 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.8817$). Under similar conditions the positive control BHT, showed IC_{50} 64.63 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.93$) (Figure 1).

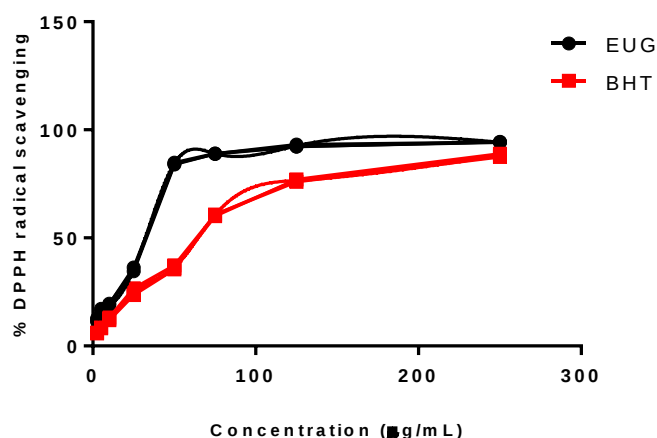


Fig.1. The DPPH radical scavenging activity of EUG and BHT. The curve represents a relationship between DPPH radical scavenging percentage and concentration of EUG or BHT.

Acute toxicity

Eugenol (2.0 g/kg, p.o.) induced depression of the central nervous system (sedation) in mice of both sexes during the first 30 min. However, it did not produce signs of acute toxicity or death in the treated animals. No significant changes in food and water intake or body weight were observed during the 14 days of observation (data not shown). The LD_{50} could not therefore be estimated and it is possibly higher than 2.0 g/kg.

Body weight difference (BWD)

Rotenone-administrated rats showed significant decrease in body weight compared to control (C) group; (BWD= differences between final and initial weights). There were no significant differences between EUG 37.5 mg/kg-pretreated and L-Dopa pretreated animals (L), and both suffered less weight loss when compared to negative control (N) group [$F_{(6,55)} = 29.07$] (Figure 2).

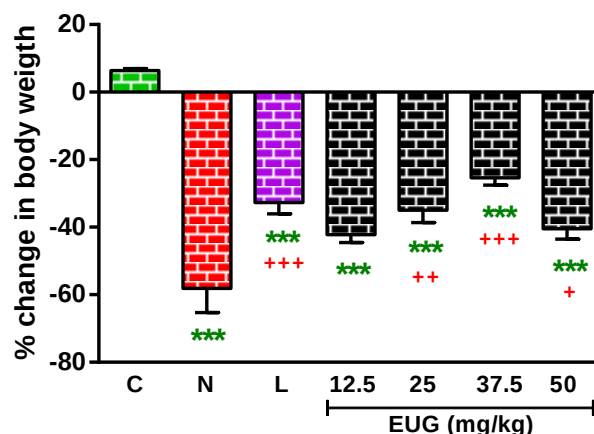


Fig.2. Differences in body weight (BWD = $BW_{Final} - BW_{Initial}$). Groups: C-control; N-negative control; L-positive control; EUG-pretreated groups. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. *** $p < 0.001$ as compared to control group (C); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to negative control (N). One-way ANOVA: $F_{(6,56)} = 29.07$ ($n=8$), followed by Tukey's test.

Locomotor activity

Rotenone administration (2.5 mg/kg, s.c.) for 5 days reduced significantly the locomotor activity of rats, showed as increase of the latency time, reduction on the ambulatory activity, increase in the resting time and, reduction on the rearing events when compared to C group ($p < 0.001$) (Figure 3). These results were related to higher anxiety levels. However, these events were reversed by the pretreatment with EUG or L-Dopa observed on the open-field through the total quadrants travelled and latency time events. Daily pretreatment with EUG at the dose of 37.5 mg/kg induced the best response ($p < 0.001$) compared to the other doses of EUG; and, was even better for recovery of mobility time compared to N ($p < 0.001$) and L ($p < 0.05$) groups. When compared C group to N group there was a robust reduction in the rearing frequency, but there was no difference between EUG (37.5 mg/kg) and L groups ($p < 0.001$).

Motor skills (Rota rod)

N group presented significative decreased muscle grip strength and fall off time as compared to control animals ($p < 0.001$). Moreover, N group showed to drag hind limbs while ambulating which observed during the pretreatment. Daily pretreatment with EUG at all doses, as well as L-Dopa significantly increased time spent on a rotating rod when compared to N group ($p < 0.001$) (Figure 4-A).

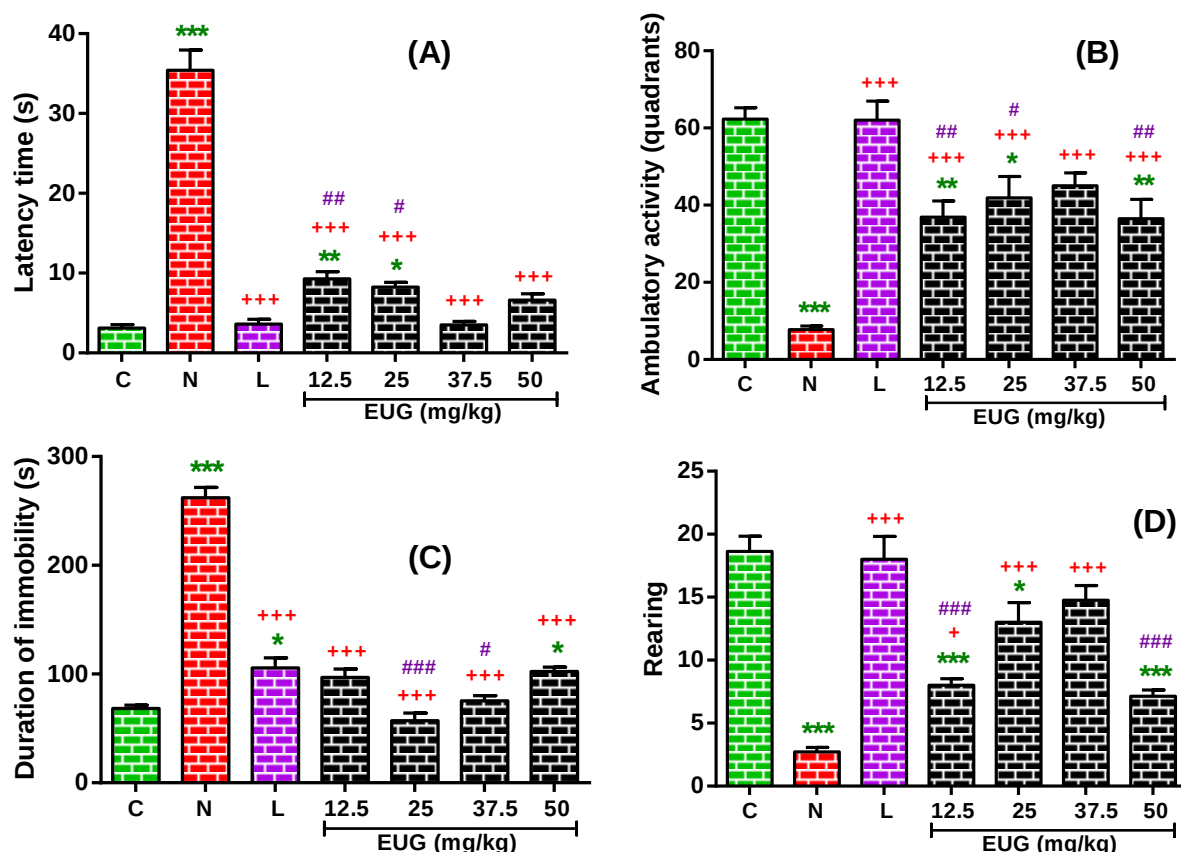


Fig. 3. Effect of EUG and L-Dopa pretreatments on locomotor activity in rotenone administrated rats as assessed by Open field – Anxiety measurement. Groups: C-control; N-negative control; L-positive control; EUG-pretreated groups. (A) Latency – time spent in center square to initial movement, (B) Ambulatory activity – quadrants traveled during the test, (C) Time of resting – immobility time, and, (D) Rearing. Each value represents the mean ± S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to control group (C); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as compared to negative control (N); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared to L-Dopa pretreated group (L). One-way ANOVA [$F_{A(6,53)} = 112.50$], [$F_{B(6,53)} = 19.86$], [$F_{C(6,53)} = 102.70$], [$F_{D(6,54)} = 28.01$], ($n=7-8$), followed by Tukey's test.

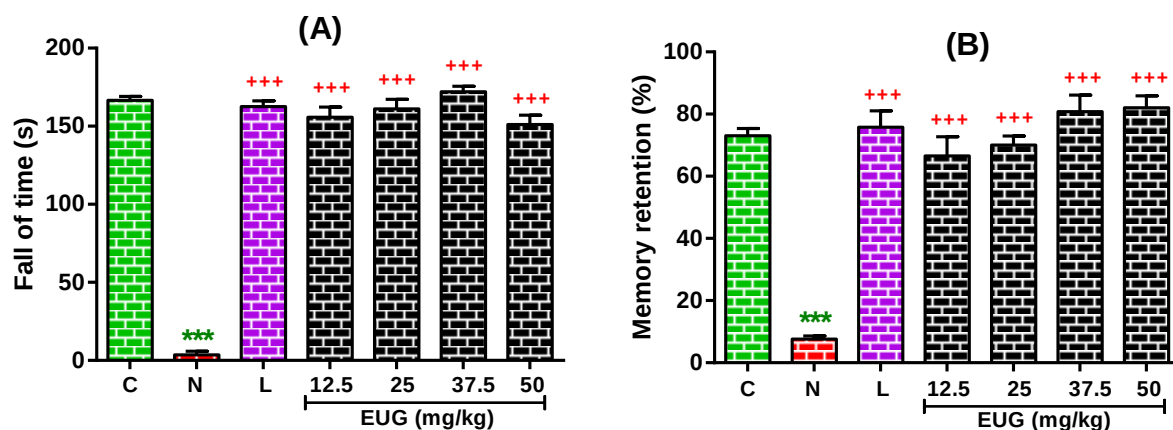


Fig. 4. Fall off time verified on Rota Rod performance (A) and memory retention (%) analyzed in EPM test (B) in all groups. Groups: C-control; N-negative control; L-positive control; EUG-pretreated groups. Each value represents the mean ± S.E.M. *** $p < 0.001$ as compared to control group (C); *** $p < 0.001$ as compared to negative control (N). One-way ANOVA [$F_{E(6,54)} = 145.8$], [$F_{F(6,53)} = 32.87$] ($n=7-8$), followed by Tukey's test.

Elevated plus maze (EPM)

Animals water pretreated (N) were had a marked memory loss and learning abilities impaired compared to C group. The pretreatment with EUG significantly increased the percentage of memory retention in rats as compared to N group ($p<0.001$). There was not significant difference between EUG (all doses) and L groups (Figure 4-B).

Catalepsy test

Daily rotenone administration induced notable signs of catalepsy as shown through akinesia variable over time of the pretreatment. The akinesia of N group was significantly increased along the same time compared to C group ($p<0.01$). EUG at the dose 37.5 mg/kg (EUG 37.5 mg/kg) and L-Dopa pretreated animals showed a different pattern of development of catalepsy. The akinesia expression was increased initially until half of the time administration with rotenone and, this cataleptic behavior was reversed. However, the reversion of cataleptic behavior on EUG 37.5 mg/kg group was significantly different compared with L group (Figure 5).

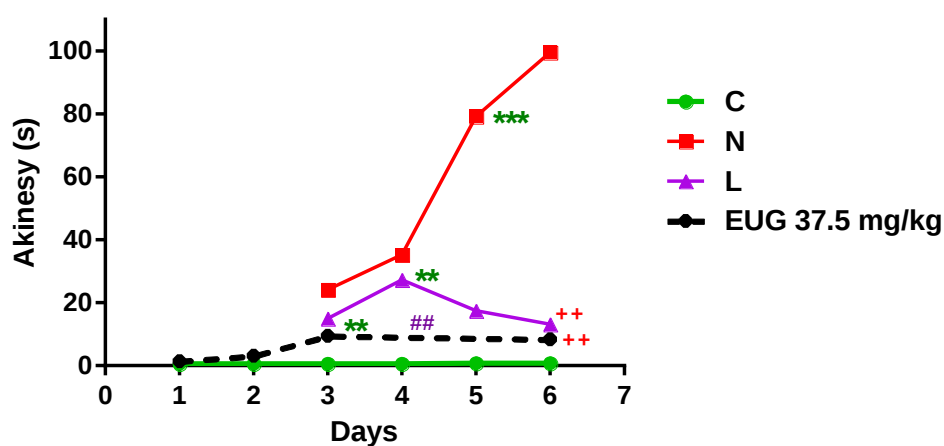


Fig. 5. Akinesia (inability to move - loss or impairment of the power of voluntary movement) analyzed on Catalepsy test. Groups: C-control; N-negative control; L-positive control; EUG 37.5 mg/kg-pretreated. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ as compared to control group (C); ++ $p<0.01$ as compared to negative control (N); ## $p<0.01$ as compared to L-Dopa pretreated group (L); Mann-Whitney test.

Corticosterone serum levels (CSL)

The corticosterone serum levels (CSL) were increased in the N ($p < 0.001$) and L groups ($p < 0.01$) compared to the C group. The EUG 37.5 mg/kg and C groups were showed similar CSL. However, the EUG 37.5 mg/kg group was showed reduction in CSL when compared to L group ($p < 0.01$) [$F_{(3,23)} = 169.0$] ($n=6$) (Figure 6).

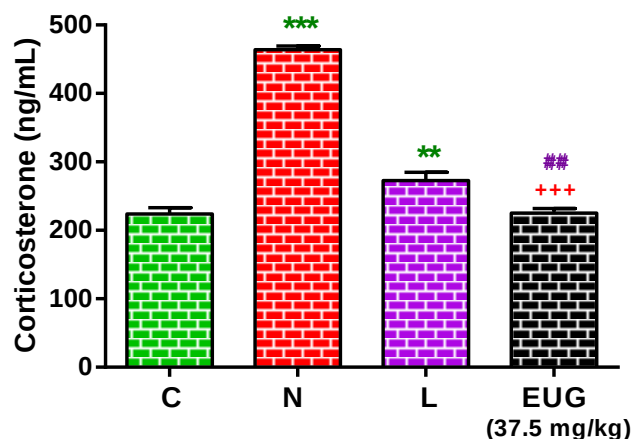


Fig. 6. Corticosterone serum levels (CSL). Groups: C-control; N-negative control; L-positive control; EUG 37.5 mg/kg-pretreated. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ as compared to control group (C); +++ $p < 0.001$ as compared to negative control (N); ### $p < 0.01$ as compared to L-Dopa pretreated group (L). One-way ANOVA [$F_{(3,23)} = 169.0$] ($n=6$), followed by Tukey's test.

In addition, a negative correlation was demonstrated between CSL and the memory retention percentage (EPM test) through of Pearson's correlation coefficient ($r = -0.98$; $p = 0.02$) (Figure 7).

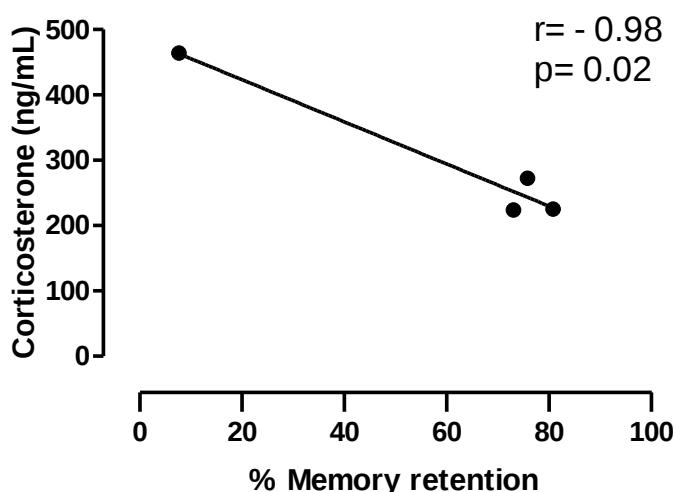


Fig. 7. Memory retention-like behaviors correlated with the correspondent corticosterone serum levels. Pearson's correlation coefficient was calculated considering the following Corticosterone serum levels (CSL) and memory retention percentage. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M.

DISCUSSION

This study investigated the neuroprotective effect of EUG against rotenone-induced neurotoxicity. EUG is an essential oil constituent extracted from cloves and used as a food flavoring agent, and was reported to have antioxidant activity (Ito, 2005).

The *in vitro* antioxidant activity of EUG demonstrated by DPPH radical assay showed DPPH free radical scavenging activity. DPPH is commonly used as a reagent to evaluate free radical-scavenging activity of antioxidants through the reduction of the stable radical DPPH to the yellow diphenyl-picrylhydrazine in alcoholic solution (Oyaizu, 1986). When DPPH radicals encounter a proton-donor substrate such as an antioxidant, the radicals would be scavenged and the absorbance is reduced (Gülçin, 2004; Elmastas, 2006). Leopold and colleagues (2006) observed that the clove essential oil (*Eugenia caryophyllus*) which main constituent is EUG showed a significant inhibitory effect against hydroxyl radicals and acted as an iron chelator. These results show that EUG used in this study is within the standards.

The acute toxicity results indicated that the oral administration of a single dose of EUG (2.0 g/kg) caused a reversible sedative effect, but did not produced any sign of toxicity or death in the treated animals, suggesting an LD₅₀ above 2.0 g/kg. Drugs that present LD₅₀ above 2.0 g/kg by oral route are considered to be non-toxic (Kennedy et al., 1986). Previous acute toxicity test with the extract of clove (*Syzygium aromaticum* Linné) in rodents showed the LD₅₀ 2.65 g/kg (Valente et. al., 2009).

Neuroprotection with EUG, a naturally occurring phenol extracted from cloves, known to be a potential antioxidant (Ito et al., 2005) and anti-inflammatory (Reddy and Lokesh, 1994), and a monoamine oxidase (MAO) inhibitor (Tao et al., 2005), has been demonstrated in models of neurodegenerative diseases (Kabuto et al., 2007).

In the present study, EUG pretreatment protected against rotenone-induced neurotoxicity, in an animal model of Parkinson's disease. The rotenone animal model was chosen because it's systemic action is able to reproduce the progression of PD-like pathology while the Parkinson's symptoms could be reversed by L-Dopa (Alam; Schmidt, 2004). Furthermore, it is easily exercisable and highly reproducible and it

could be also used to examine protective effects in peripheral nervous system (Xiong et al., 2009). The rotenone toxin induces respiration inhibition at complex I of the electron transporter chain (ETC) (Martinez and Greenamyre, 2012), causing mitochondrial dysfunction and elevated oxidative stress, both linked to the PD pathogenesis (Alvarez-Erviti et al., 2010).

The exposure to toxins and stressors is implicated in several diseases and can result in decreased intake of food (McEwen, B. S., 2007). Mitochondrial dynamics and bioenergetics are interconnected, and changes in this balance can influence in several aspects, including body weight. Therefore, in this study, the weight loss associated with the use of rotenone was expected.

The rotenone administration for 5 days produced significant motor and behavioral abnormalities including muscle rigidity and akinesia (catalepsy test), abnormal gait and weakness (Rota Rod test), as well as memory impairment (EPM test) and anxiety higher levels (open field test). However, EUG pretreated groups exhibited a marked reversion of these abnormalities showing potential protective effects.

Oxidative stress is a cytotoxic condition that occurs when there is an increased intracellular overproduction and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in association to reduced antioxidant capacity within the cell (Varcin et al., 2012). However, the production of ROS can also be increased in the PD brain due to the synthesis and storage of dopamine. Dopamine (DA) is stable in synaptic vesicles inside the cell, but, on a damaged neuron the DA is outside the vesicle and, is easily metabolized by MAO (Dexter; Jenner, 2013) resulting in brain DA depletion. Thus, an MAO inhibitor may be useful in reversing the behavioral symptoms of PD as well as in preventing these.

The EUG-antioxidant activity has been demonstrated in previous *in vitro* and *in vivo* studies (Nagababu et al., 2010) and also on preventing oxidative tissue damage in different experimental models (Morsy and Fouad, 2008). Furthermore, it was observed potential link between the antidepressant and monoamine oxidase B (MAOB) inhibitory activities in mice (Tao, G., 2005). Kabuto (2007) showed that the treatment with EUG was able to inhibit 6-OHDA-induced neurotoxicity, including the reductions of striatal tissue DA and its metabolites, and protect dopaminergic

neurons by inhibition of lipid peroxidation. The set of results confirm the existence of antidepressant and anxiolytic effects, and oxidative stress inhibition from the daily EUG administration.

Lower-dose, nonlethal rotenone *in vivo* administration model caused motor deficit, demonstrated by decrease muscles grip strength and rigidity on Rota rod and Catalepsy tests, respectively. The pretreatment with EUG improved of motor activity and, also induced the reversion in the akinesia-like behavior rotenone-induced. Rotenone, through the higher ROS generation, can alter microtubules (Choi et al., 2011), and this could potentially affect not only transport, but also fission/fusion, since mitochondrial fission proteins interact with tubulin (Estela et al., 2011), intervening in the muscle contraction and promoting the motors symptoms reported. The intervention with an antioxidant agent, such as EUG in the DP therapy can not only reduce the production of ROS, as well as promote the reduction of pathologic symptoms.

The EUG (37.5 mg/kg, p.o.) pretreated group presented similar behavioral patterns when compared with the L group. As it was expected, the motor function defects could be alleviated by L-Dopa (a dopamine precursor that is commonly used in PD therapy) treatment (Yan et al., 2013). However, the chronic use of this drug is responsible for muscle impairment and bradykinesia. Previous studies have shown two highlights for L-Dopa: the ability of L-dopa to induce DA neuron cell death through the generation of ROS in culture, a neurotoxic label; and, based on a range of *in vivo* studies in animals, post mortem studies in humans, and clinical experience, a non-neurotoxic label (Agid, 1998; Olanow et al., 2004; Parkkinen et al., 2011).

The results in the EPM test showed memory retention as parameter analyzed between all groups. In this cognitive test, the N group demonstrated drastic memory impairment, contrasting with C, L and T groups (that showed a similar pattern of learning and memory). These results suggest an important ability of EUG to promote improvement of cognitive aspect.

In humans, cognitive impairment is also a major symptom of anxiety disorder. According to a recent theory, the intentional control theory, when anxious persons have an attention deficit, they are not able to organize and store information in a

proper way for it to be remembered correctly and efficiently. This hampers cognitive performance (Eysenck et. al., 2007). Nutritional interventions, as increase dietary intake of fruits and vegetables, can retard and even reverse age-related declines in brain function and cognitive performance. The dietary supplementation with antioxidants may be useful to prevent free radical-related diseases due to the ability to counteract toxic production of both reactive oxygen and nitrogen species (Calabrese et al., 2010).

The EUG pretreatment prevented the increase in rotenone-induced CSL in rats. Adrenal hormones produced by stress could impact the hippocampus because this important cerebral structure for memory formation has a high concentration of receptors for glucocorticoids (Conrad, 2010). The release of stress-related hormones like glucocorticoids modify neuronal plasticity in brain stress centers such as the amygdala, hypothalamus and hippocampal memory area (McReynolds et. al., 2010) and can produce neurobiological alterations on learning and memory in both humans and rodents (Schwabe et. al., 2009). The EUG ability to reduce the CSL may be related to both: the anxiolytic effects reported or the ability to reverse the stress-induced changes in serotonin (5-HT) levels in all brain regions in rats (Garabadu, 2011).

In the present study, memory storage deficit (investigated in EPM test) is linked to higher anxiety in the open field and, confirmed by CSL results founded. The negative correlation observed between CSL and the memory processes (EPM parameter) support the hypothesis that the EUG promotes neuroprotective modulator effect on physiological and behavioral responses against alterations rotenone-induced. The relation observed in these results could be also a reflection of anxiolytic effect promoted by EUG pretreatment. Nevertheless, the relationship between anxiety and cognition was not clearly demonstrated.

The CSL was measured at a single time point chosen according to the significance of methods. Therefore, the CSL changes are temporally limited and, only suggest that corticosterone secretion is an important physiological point related to behavioral alterations.

CONCLUSION

Taken together, these results confirm that the EUG is a compound with *in vitro* antioxidant activity and it has a lower toxicity. Moreover, the pretreatment with EUG promoted a protective effect against rotenone-induced neurotoxicity, probably due to its antioxidant and anxiolytic activities. More experiments are needed to further clarify the mechanisms involved in this effect.

REFERENCES

- Agid Y. Levodopa: is toxicity amyth? *Neurology* 1998; 50: 858–863, 1998.
- Ahlskog JE, Muentner MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 2001; 16: 448–458.
- Alam M, Schmidt WJ. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res* 2004; 153: 439–446.
- Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AH. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* 2010; 67: 1464–1472.
- Bernardi MM, Palermo-Neto J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. *Psychopharmacology* 1979; 65: 247-250.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; 28: 25-30.
- Calabrese V, Comelius C, Trovato A, Cavallaro M. The hermetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases, *Curr Pharm Des* 2010; 16: 877–883.
- Choi WS, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J. Cell Biol* 2011; 192: 873–882.
- Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 742–755.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

Cullere L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J Agr Food Chem 2004; 24: 1653–1660.

Dekundy A, Pietraszek M, Schaefer D, Cenci MA, Danysz W. Effects of group I metabotropic glutamate receptors blockade in experimental models of Parkinson's disease. Brain Res Bull 2006; 69: 318-326.

Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. Free Radical Biology and Medicine 2013; 62: 132-144.

Elmastas M, Turkekul I, Oztürk L, Gülçin I, Isildak O, Aboul-Enein HY. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). Com Chem Hight Scr 2006; 9: 443–448.

Estela A, Pla-Martin D, Sanchez-Piris M, Sesaki H, Palau F. Charcot–Marie–Tooth -related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. J Biol Chem 2011; 286: 36777–36786.

Eysenck MW, Derakshan N, Santos R, Calvo MG. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory. Emotion 2007; 7 (2): 336-353.

Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek, K. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. N Engl J Med 2004; 351: 2498–2508.

Feng J, Lipton JM. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. Neuropharmacology 1987; 26 (12):1775-1778.

Garabadu D, Shah A, Ahmad A, Joshi VB, Saxena B, Palit G, Krishnamurthy S. Eugenol as an anti-stress agent: Modulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis and brain monoaminergic systems in a rat model of stress. The International Journal on the biology of stress 2011; 14 (2): 145-155.

Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. J Vet Pharmacol Ther 2006; 29: 265–270.

Gülçin I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. J Med Chem Food 2011;14 (9): 975–985.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükköroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 205–215.

Huot P, Johnston TH, Koprach JB, Fox SH, Brotchie JM. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol Rev* 2013; 65: 171–222.

Ito M, Murakami K, Yoshino M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 461-466.

Kabuto H, Tada M, Kohno M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 423–427.

Kumar P, Kumar A, Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain. *Prog Neuro-Psychoph* 2009; 33: 100-108.

Kumar P, Padi SS, Naidu P, Kumar A. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behav Pharmacol* 2006; 17: 485-492.

Malone RA. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Warner, H., Wolf, P. (Eds.), *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Springer- Verlag, Berlin 1977: 24–53.

Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim SKB, Markowitz M, Moynihan SK. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. Oral Radiology and Endodontics* 1992; 73: 729–737.

Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16: 920 –934.

McReynolds JR, Donowho K, Abdi A, McGaugh JL, Roozendaal B, McIntyre CK. Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala nore-pinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93: 312-321.

Morsy MA, Fouad AA. Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. *Phytother Res* 2008; 22: 1361-1366.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

Nagababu E, Rifkind JM, Boindala S, Nakka L. Assessment of antioxidante activity of eugenol *in vitro* and in vivo. *Method Mol Biol* 2010; 610: 165–180.

Nagababu E, Lakshmaiah N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxigense activities by eugenol. *Free Radical Research* 2010; 20: 235–266.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De YJ, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, Witt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov. Disord* 2004; 19: 997–1005.

Opdyke DLJ. Monographs on fragrance raw materials. *Food and cosmetic toxicology* 1981; 19:113-116.

Organisation For Economic Cooperation and Development (OECD). (2001).Guideline for Testing of Chemicals. Guideance no. 420. Fixed dose procedure, Adopted December 17. Disponíble in <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD GL420.pdf>. In 04 of September of 2014

Ou HC, Chou FP, Lin TM, Yang C H, Sheu WHH. Protective effects of eugenol against oxidized LDL induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1485-1495.

Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *J Nutr Dietet* 1986; 44: 307–315.

Palermo-neto J. Supersensitivity, drug withdrawal, and open-field behavior. *Psychopharmacology* 1982; 18: 11-12, 1982.

Parkkinen L, O'Sullivan SS, Kuoppamaki M, Collins C, Kallis C, Holton JL, Williams DR, Revesz T, Lees AJ. Does levodopa accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology* 2011; 77:1420–1426.

Reddy AC, Lokesh BR. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan induced inflammation in rats. *Annals of nutrition & metabolism* 1994; 38: 349–358.

Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB. The catalepsy test: It's ups and downs. *Behav Neurosci* 1988; 102 (5): 748-759.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain Research* 2005; 1049:147–155.

Schwabe L, Oitzl MS, Richter S, Schächinger H. Modulation of spatial and stimulus-response learning strategies by exogenous cortisol in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 358-366.

Sneddon IB, Glew RC. Contact dermatitis due to propanidid in an anaesthetist. *Practitioner* 1973; 263: 321-323.

Tao G, Irie Y, Li DJ., Keung WM. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase a and exhibit antidepressant – like activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 4777-4788.

Valente ROH, Sampaio FC, Souza IA, Higino JS. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. *Rev Bras Farmacogn*, 2009; 19 (2B): 557-560.

Varcin M, Bentea E, Michotte Y, Sarre S. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 624925.

Wie M, Won M, Lee K, Shin J, Lee J, Suh H, Song D, Kim Y. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett* 1997; 225: 93–96.

Won MH, Lee JC, Kim YH, Song DK, Suh HW, Oh YS, Kim JH, Shin TK, Lee YJ, Wie MB. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 1998; 254: 101–104.

Xiong N, Huang J, Zhang Z, Xiong J, Liu X. Stereotaxical infusion of Rotenone: A Reliable Rodent Model for Parkinson's Disease. *PLoS One* 2009; 4: 7878.

Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 62: 90–101.

Yang L, Yuzhi H, Yubo G, Haojun M, Jianfeng L, Chen J. Targeted imaging of activated caspase-3 in the central nervous system by a dual functional nano-device. *Journal of Controlled Release* 2012;163: 203–21.

6. PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o EUG pode facilitar a liberação de dopamina na via nigroestriatal ao promover a reversão dos déficits motor e cognitivo induzidos por rotenona. Além disso, dão abertura e embasamento para um próspero estudo dos efeitos neuroprotetores *in vivo* do EUG mais aprofundados, no modelo animal utilizado, através da mensuração da peroxidação lipídica e avaliação de atividades enzimáticas nos tecidos cerebrais.

Através deste estudo, almejamos a contribuição no desenvolvimento de novos fármacos atuantes na terapêutica da DP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. A. Efeitos do eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaio. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2004.

BARBOSA, E. R. Tratamento da fase inicial da Doença de Parkinson. In: MENESSES, M. S.; TEIVE, H. A. G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.172-175, 2003.

BASTIANETTO, S.; ZHENG, W. H.; QUIRION, R. The *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: Involvement of its flavonoids constituents and protein kinase C. *Journal of Neurochemistry*, v. 74, p. 2268-2277, 2000.

BENDIR, G.; ÖZEKMEKÇİ S.; APYDIN, H.; DELIL, S.; ERGINÖZ, E. A hospital-based study: Risk factors in development of motor complications in 555 Parkinson's patients on levodopa therapy. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 108, n.8, p. 726-732, 2006.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A. V.; GREENAMYRE, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, v. 3, p. 1301-1306, 2000.

BONASTRE, J. F. Dela combinaison des huiles volatiles de girofle.avec les alcalis et autres basis salifiables. *Jornal De Pharmacie*, v.13, p. 464-513, 1967.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, v. 3, p. 1301-1306, 2000.

BRISAUD, E. Nature et pathogénie de la maladie de Parkinson (leçon 23, 488-501). Leçons sur les maladies nerveuses: La Salpêtrière, 1893-1894. Paris: Masson, 1895.

CARDOSO, F. Complicações motoras e não motoras da levodopa terapia em Doença de Parkinson. In: MENESES, M. S.; TEIVE, H. A. G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 208-218, 2003.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. 3/4, p. 323-333, 2000.

CHARCOT, J-M. De la paralysie agitante (leçon 5). Oeuvres Complètes 1: 161-188. Paris: Bureaux Du Progrès Médical, 1869: In English. On paralysis agitans (Lecture 5). Lectures on the Diseases of the Nervous System; 105-107. Translated by G. Sigurson, Philadelphia: HC Lea and Company, 1879.

CHARCOT, J-M. Leçons Du Mardi: Policlinique: 1887-1888. Paris: Bureaux Du Progrès Médical, 1888.

DA SILVA TM, MUNHOZ RP, ALVAREZ C, NALIWAIKO K, KISS A, ANDREATINI R, et al. Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. *Journal of Affective Disorders*, v. 111, p. 351-359, 2008.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRET, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 1613-1620, 2003.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, v. 39, p. 889-909, 2003.

DEBEIR, T.; GINESTET, L.; FRANÇOIS, C.; LAURENS, S.; MARTEL, J.C.; CHOPIN, P. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology*, v. 193, p. 444-454, 2005.

DEVI, K. P.; ARIF NISHA, S.; SAKTHIVEL, R.; PADIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 107–115, 2010.

DÍAZ, M.R.; ABDALA, P.; BARROSO-CHINEA, P.; OBESO, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. Motor behavioural changes after intracerebro ventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 122, p. 79-92, 2001.

DUNNET, S.B.; BJÖRKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's Disease. *Nature*, v. 399, p. 32-39, 1999.

DUTY, S., JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and a clues to the cause of disease. *British Journal Pharmacology*, v. 8, p. 1-35, 2011.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 139, p. 121-143, 2004.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, v. 39, 2002.

ESPOSITO, E.; DI MATTEO, V.; BENIGNO, A.; PIERUCCI, M.; CRESCIMANNO, G.; Di GIOVANNI, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 205, p. 295-312, 2007.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

FENG, J.; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology*, v. 26 (12), p.1775-1778, 1987.

FINGER, S. Origins of Neuroscience. New York: Oxford University Press., 1994.

GARCIA-BORREGUERO, D.; LARROSA, O.; BRAVO, M. Parkinson's disease and sleep. *Sleep Medicine Reviews*, v. 7, n. 2, p. 115-129, 2003.

GOETZ, C. G. Charcot, the Clinician: The Thursday Lessons. New York: Raven Press, 1987.

GOETZ, C. G.; Bonduelle, M.; Gelfand, T. Charcot: Constructing Neurology. New York: Oxford University Press., 1995.

GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER, J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 29, p. 265–270, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*, v. 14 (9), p. 975–985, 2011.

GURNEY, B. F. Eugenol: utility versus toxicity. *Oral Hygiene*, v. 55, n. 2, p. 74–82, 1965.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1634–1658, 2006.

Historical art and document collection, CHRISTOPHER G. GOETZ.

HOROWSKI, R.; HOROWSKI, L.; VOGEL, S.; POEWE, W.; KIELHORN, F. An essay on Wilhelm von Humboldt and the shaking palsy. *Neurology*, v. 45, p. 565-568, 1995.

HOWELLS, F.M.; RUSSELL, V.A.; MABANDLA, M.V.; KELLAWAY, L.A. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 165, p. 210-220, 2005.

HUME, W. R. *In vitro* studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc-oxide eugenol. *International Endodontic Journal*, v. 21(1), p. 130-134, 1988.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 461-466, 2005.

JENNER, P., OLANOW, C. W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology*, v. 66, p.24–36, 2006.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of cloves leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 54, p. 6303–6307, 2006.

JULIEN, C.; BERTHIAUE, L.; HADJ-TAHAR, A.; RAJPUT, A.H.; BÉDARD, P.; DI PAOLO, T.; JULIEN, P.; CALON, F. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patient and parkinsonian monkeys. *Neurochemistry International*, v. 48, n. 5, p. 404-414, 2006.

KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 423–427, 2007.

KAGAN, V. E.; GLEISS, B.; TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; ELENSTRÖM-MAGNUSSON, C.; LIU, S-X.; SERINKAN, F. B.; ARROYO, A.; CHANDRA, J. .; ORRENIUS, S.; FADEEL, B. A Role for Oxidative Stress in Apoptosis: Oxidation and

Externalization of Phosphatidylserine Is Required for Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas-Mediated Apoptosis. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 487-499, 2002.

KAPPUR, S. S.; STEBBINS, G. T.; GOETZ, C. G. Vibration therapy for Parkinson's disease: Charcot's studies revisited. *Journal Parkinson's Disease*, v. 2, p. 23-27, 2012.

LANG A. E.; LOZANO, A. M. Medical Progress: Parkinson's Disease. *N Engl J Med*, v. 339, p. 1044–1053, 1998.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, n. 3, p. 304 – 317, 2004.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v. 73(6), p. 729-37, 1992.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. *Química Nova*, v. 29 (5), p. 907-910, 2006.

NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radical Research*, v. 20, p. 235–266, 1994.

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, p. 1467–1469. 2000.

Da Silva, J. L. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Parkinson.

OLANOW, C. W.; TATTON, W. G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* v. 22, p. 123-144, 1999.

Organisation For Economic Cooperation and Development (OECD). (2001). Guideline for Testing of Chemicals. Guidance no.420. Fixed dose procedure, Adopted December 17. Disponible in <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD GL420.pdf>.

PARKINSON, J. *Hunterian Reminiscences*. London: Sherwood, Gilbert and Piper, 1833.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 59-63, 2002.

Philadelphia College of Physicians; Original manuscript and document collection, Philadelphia, PA.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzgium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, p. 1454–1462, 2009.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 11, p. 3-7, 2005.

REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan induced inflammation in rats. *Annals of nutrition & metabolism*, v. 38, p. 349–358, 1994.

RODRIGUES, T. G.; FERNANDES JUNIOR, A.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. *In vitro* and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. *Natural product research*, v. 23, p. 319-326, 2009.

ROMPELBERG, C. J.; PLOEMEN, J. H.; JESPERSE, S.; VAN DER GREEF, J.; VERHAGEN, H.; VAN BLADEREN, P. J. Inhibition of rat, mouse and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. *Chemico-biological interactions*, v. 5, 99(1-3), p. 85-97, 1996.

SAMADI, P.; GRÉGOIRE, L.; ROUILLARD, C.; BÉDARD, P.; Di PAOLO, T.; SANBERG, P. R.; BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M.; NORMAN, A. B. The catalepsy test: It's ups and downs. *Behavioral Neuroscience*, v. 102 (5), p. 748-759, 1988.

SAUVAGES DE LA CROIX, F. B. *Nosologia methodica*. Amstelodami: Sumptibus Fratrum de Tournes, 1763.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord*, v. 26, p. 1049–1055, 2011.

SHAPIRA, A.H.V.; BEZARD, E.; BROTHIE, J.; CALON, F.; COLLINGRIDGE, G.L.; FERGER, B.; HENGERER, B.; HIRSCH, E.; JENNER, P.; Le NOVÈRE, N.; OBESO, J.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; SPAMPINATO, U.; DAVIDAI, G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nature Reviews*, v. 5, p. 845-854, 2006.

SNEDDON, I. B.; GLEW, R. C. Contact dermatitis due to propanidid in an anaesthetist. *The Practitioner*, v. 263, p. 321-323, 1973.

TAIRA, J.; IKEMOTO, T.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A.; MAKINO, K. Essential oil phenyl propanoids. Useful as OH scavengers? *Free Radical Research Communications*, v. 16, p. 197-204, 1992.

USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; BAJAKIAN, K.; NAKKASH-CHMAISSE, H. *In vitro* effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food and chemical toxicology*, v. 40, p. 935-940, 2002.

VÁZQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VÁZQUEZ, M. J.; CEPEDA, A. Inibitory effects of eugenol and thymol on penicillium citrinum strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, p. 175-163, 2001.

WHITTON, P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 150, p. 963-976, 2007.

WIE, M.; WON, M.; LEE, K.; SHIN, J.; LEE, J.; SUH, H.; SONG, D.; KIM, Y. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, v. 225, p. 93–96, 1997.

WON, H. M.; LEE, C. J.; KIM, H. Y.; SONG, K. D.; SUH, W. H.; OH, S. Y.; KIM, H. J.; SHIN, K. T.; LEE, J. Y.; WIE, B. M. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampol neurons from global ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, v. 245, p. 101-104, 1998.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, v. 268, p. 204-212, 2010.

YOKOTA, H.; HASHIMOTO, H.; MOTOYA, M.; YUASA, A. Enhancement of UDP-glucuronyltransferase, UDP-glucose dehydrogenase, and glutathione S-transferase activities in rat liver by dietary administration of eugenol. *Biochemical pharmacology*, v. 37, p. 799–802, 1988.