



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

Ensaio pré-clínicos com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos

FRANCISCO RODRIGO DE ASEVEDO MENDES DE OLIVEIRA

Teresina – Piauí

Julho - 2014

FRANCISCO RODRIGO DE ASEVEDO MENDES DE OLIVEIRA

Ensaio pré-clínico com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos

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

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

Julho - 2014

FRANCISCO RODRIGO DE ASEVEDO MENDES DE OLIVEIRA**Ensaio pré-clínicos com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos**

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Examinador Interno)

Departamento de Ciências Biológicas – UFPI/CSHNB

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior (Examinador Externo)

Departamento de Química – IFPI

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (Examinador Externo)

Departamento de Fisiologia – UFS

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (Examinador Externo)

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido – UNIVASF

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista:

*A **DEUS** por ser amigo fiel, provedor de todas as minhas necessidades, por me dar forças para seguir adiante, com saúde e perseverança para atingir os objetivos.*

*À **minha esposa Júlia Gabriela Dantas Araújo Mendes**, pela compreensão e companheirismo desde o início.*

*Aos **meus pais** por me educarem com amor, fé e temência a **DEUS**.*

*Aos **meus amigos e familiares** pelo apoio e carinho.*

*Ao meu orientador **Professor Rivelilson Mendes de Freitas**, exemplo de dignidade, caráter e dedicação à pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial:

À **DEUS**, pai amado e misericordioso, digno de toda honra, glória e louvor. Muito obrigado Senhor.

À minha esposa **Júlia Gabriela Dantas Araújo Mendes**, pelo companheirismo, amor e compreensão durante a jornada.

Aos meus pais **Francisco Kléber Mendes de Oliveira** e **Giseuda Farias de Asevedo Oliveira**, por todo esforço sem limites, credibilidade, dedicação e incentivos despendidos à minha educação e formação.

À toda minha **família**, que compreendeu a minha ausência em muitos momentos e acreditou que eu seria capaz de chegar até aqui.

Ao meu orientador **Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**, pela amizade, compreensão e confiança no meu trabalho. Por compreender minhas limitações e ter paciência em me ensinar a ser um profissional íntegro.

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

Aos meus companheiros do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), pela convivência e grande contribuição na pesquisa, com destaque para **Damasceno, Oskar, Amanda, Rusbene, Johanssy e Ana Paula**, por ter me apresentado à essa família. Ao **George** por ter me auxiliado em todas as etapas e grande companheiro de escrita científica.

Aos meus companheiros de Laboratório de Genética Toxicológica (LAPGENIC), **Junior, Marcus, Keylla, Kátia e Adailson** pela ajuda em todas as etapas experimentais.

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

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

“Por isso mesmo, empenhem-se para acrescentar à sua fé a virtude; à virtude o conhecimento; ao conhecimento o domínio próprio; ao domínio próprio a perseverança; à perseverança a piedade; à piedade a fraternidade; e à fraternidade o amor. Porque, se essas qualidades existirem e estiverem crescendo em suas vidas, elas impedirão que vocês, no pleno conhecimento de nosso Senhor Jesus Cristo, sejam inoperantes e improdutivos”.

2 Pedro 1:5-8

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Plantas Medicinais.....	20
3.2 Óleos Essenciais.....	21
3.3 Monoterpenos.....	22
3.4 Acetato de Carvacrila.....	24
3.5 Óleos Essenciais <i>versus</i> Doenças Negligenciadas.....	26
3.6 Óleos Essenciais <i>versus</i> Esquistossomose.....	28
3.7 Óleos Essenciais <i>versus</i> Toxicidade.....	30
3.8 Óleos Essenciais <i>versus</i> Estresse Oxidativo.....	32
Referências.....	32
4. CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica do acetato de carvacrila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas	40
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Metodologia.....	43
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão.....	46
Referências.....	46
5. CAPÍTULO II: Segurança pré-clínica do acetato de carvacrila: uma avaliação da toxicidade aguda	49
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	57
Discussão.....	67
Conclusão.....	70
Referências.....	70
6. CAPÍTULO III: Perfil toxicogenético e antioxidante de um derivado semissintético do carvacrol, acetato de carvacrila	75
Resumo.....	76
Introdução.....	78

Material e Métodos.....	79
Resultados.....	85
Discussão.....	90
Conclusão.....	93
Referências.....	93
7. CAPÍTULO IV: Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose.....	96
Resumo	97
Reinvidicações.....	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....	101
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AC	Acetato de carvacrila
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CE ₅₀	Concentração efetiva inibitória 50%
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DE ₅₀	Dose efetiva em 50% da população de uma amostra
DL ₅₀	Dose que mata 50% da população de uma amostra
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DNs	Doenças Negligenciadas
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPO	<i>European Patent Office</i>
E.P.M	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas derivadas do oxigênio
ERN	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
FD	Frequência de danos
fL	Fentolitros
g cm ⁻³	Gramas por centímetro cúbico
g dL ⁻¹	Gramas por decilitro
GPP	Difosfato de geranila
HCM	Hemoglobina corpuscular média
ID	Índice de danos
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IPP	Difosfato de isopentenila
KJ mol ⁻¹	Quilojoule por mol
MEP	Metileritritol fosfato
mm ³	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitro

NEM	Nova Entidade Molecular
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
pg	Picograma
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
U mL ⁻¹	Unidades por mililitro
U L ⁻¹	Unidades internacionais por litro
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
VCM	Volume corpuscular médio
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
μL	Microlitro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Ilustração 1	Representação estrutural da dissertação.....	18
---------------------	--	----

REVISÃO DE LITERATURA

Ilustração 1	Prospecção de plantas medicinais para o tratamento da esquistossomose.....	20
Ilustração 2	Biossíntese dos terpenos	23
Ilustração 3	Reação química de obtenção do acetato de carvacrila (5-isopropil-2-metilfenil acetato)	26
Ilustração 4	Ciclo de transmissão da esquistossomose	29

CAPÍTULO I

Ilustração 1	Estrutura química do acetato de carvacrila	43
---------------------	--	----

CAPÍTULO II

Ilustração 1	Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda.....	54
Ilustração 2	Campo aberto usado para avaliar atividade locomotora.....	55
Ilustração 3	Barra giratória usada para avaliar a coordenação motora	55
Ilustração 4	Processamento do sangue para análise hematológica e bioquímica.	57
Ilustração 5	Médias do Peso corporal de camundongos tratados com acetato de carvacrila para 14 dias	58
Ilustração 6	Médias do consumo de água de camundongos tratados com acetato de carvacrila para 14 dias	59
Ilustração 7	Médias do consumo de ração de camundongos tratados com acetato de carvacrila para 14 dias	60
Ilustração 8	Médias da produção de excretas de camundongos tratados com acetato de carvacrila para 14 dias.....	61

CAPÍTULO III

Ilustração 1	Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila	
---------------------	---	--

	pelo método DPPH'.....	80
Ilustração 2	Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila pelo método ABTS ^{•+}	81
Ilustração 3	Avaliação do potencial redutor do acetato de carvacrila.....	82
Ilustração 4	Protocolo experimental para o ensaio cometa.....	84
Ilustração 5	Tipos de danos celulares em Ensaio Cometa (0) sem dano, (1) dano do tipo 1, (2) dano do tipo 2, (3) dano do tipo 3, (4) dano do tipo 4	85
Ilustração 6	Efeitos do Acetato de carvacrila na inibição do radical DPPH'	86
Ilustração 7	Efeitos do Acetato de carvacrila na inibição do radical ABTS ^{•+}	87
Ilustração 8	Potencial redutor (Fe ³⁺ /Fe ²⁺) do acetato de carvacrila	88
Ilustração 9	Propostas de possíveis mecanismos da ação antioxidante do AC contra o radical DPPH'	90
Ilustração 10	Propostas de possíveis mecanismos da ação antioxidante do AC contra o cátion radical ABTS ^{•+}	91

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1	Patentes desenvolvidas a partir de óleos essenciais.....	21
Tabela 2	Atividade farmacológica de óleos essenciais.....	22
Tabela 3	Atividades farmacológicas de monoterpenos.....	24
Tabela 4	Óleos essenciais de plantas com atividade em doenças negligenciadas.....	27
Tabela 5	Óleos essenciais de plantas com atividade antihelmíntica.....	30

CAPÍTULO I

Tabela 1	Total de artigos pesquisados nas bases science direct, google scholar, PubMed e LILACS, no período de 2003 a 2013.....	44
Tabela 2	Exemplos de pedidos e depósitos de patentes envolvendo monoterpenos e terapia em saúde.....	46

CAPÍTULO II

Tabela 1	Efeitos do acetato de carvacrila em camundongos após administração aguda.....	62
Tabela 2	Efeitos do acetato de carvacrila após administração aguda sobre os pesos dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas.....	62
Tabela 3	Efeitos do acetato de carvacrila sobre atividade locomotora de camundongos.....	64
Tabela 4	Efeitos do acetato de carvacrila sobre a coordenação motora de camundongos.....	64
Tabela 5	Efeitos do acetato de carvacrila sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas após tratamento durante 14 dias por via oral e intraperitoneal.....	65
Tabela 6	Efeitos do acetato de carvacrila sobre os parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas após tratamento durante 14 dias por via oral e intraperitoneal.....	66

CAPÍTULO III

Tabela 1	Efeitos genotóxicos de monoterpenos.....	79
Tabela 2	Efeitos genotóxicos em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas tratados com acetato de carvacrila por via oral para 14 dias.....	89

FRANCISCO RODRIGO DE ASEVEDO MENDES DE OLIVEIRA. Ensaios pré-clínicos com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos. Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 104 p, 2013.

RESUMO

O acetato de carvacrila (AC) é um derivado acetilado do carvacrol, quimicamente definido como 5-isopropil-2-metilfenil acetato e que possui atividade anti-helmíntica, ansiolítica, anti-inflamatória e antinociceptiva. Entretanto, ainda não há pesquisas sobre a toxicidade aguda, propriedades genotóxicas e antioxidantes desse composto. Assim, o presente estudo teve por objetivo a investigação da sua toxicidade, genotoxicidade e seu potencial antioxidante. Para tanto, foi realizada uma avaliação da toxicidade aguda após a administração do AC em camundongos *Swiss* (25-30 g), 2 meses de idade, de ambos os sexos tratados com veículo, 1000 e 2000 mg kg⁻¹ por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p) sobre os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos, bem como verificado seus efeitos sobre a atividade locomotora e coordenação motora em camundongos. Além disso, foi determinada dose letal 50% (DL₅₀) desse monoterpreno. Em adição, nos camundongos que receberam o tratamento agudo com acetato de carvacrila, a genotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio cometa, em diferentes momentos (24 e 72 h), tanto em células do sangue periférico quanto no hipocampo destes camundongos. Para complementar, foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* do AC por meio da eliminação dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS^{•+}) e pelo potencial redutor. Os resultados evidenciaram que a administração aguda com as doses selecionadas do AC, não induziu modificações significativas nos dados fisiológicos, bioquímicos e hematológicos. O AC não interferiu na atividade locomotora dos animais, entretanto, a dose de 2000 mg kg⁻¹ produziu uma redução da coordenação motora dos animais quando comparado com o grupo controle. O estudo de toxicidade aguda indicou que o tratamento com AC por via oral, nas doses selecionadas, foi bem tolerado em todos os animais tratados, sugerindo sua segurança para posteriores investigações. A DL₅₀ para via i.p foi de 1542,21 mg kg⁻¹ em camundongos. O AC nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹ pode induzir danos ao DNA em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas pelo aumento significativo no índice de dano (ID) e frequência de dano (FD), em relação ao grupo veículo. Entretanto, houve redução significativa do ID e FD de machos (2000 mg kg⁻¹) e fêmeas (1000 e 2000 mg kg⁻¹), após 72h do tratamento, sugerindo uma capacidade de células do sangue periférico de camundongos tratados de forma aguda com AC em reparar danos genéticos. Os resultados antioxidantes demonstraram que o AC nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹ tem a capacidade de atuar na remoção dos radicais DPPH[•] (CE₅₀ = 6,27 µg mL⁻¹) e ABTS^{•+} (CE₅₀ = 5,46 µg mL⁻¹), e potencial redutor (CE₅₀ = 3,2 µg mL⁻¹).

Palavras-chave: Acetato de carvacrila, Ensaio cometa, Fitomedicamento, Segurança.

FRANCISCO RODRIGO DE ASEVEDO MENDES DE OLIVEIRA. Preclinical trials with a semisynthetic derivative of carvacrol: inputs for the development of new phytochemicals. Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master's thesis. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2013.

ABSTRACT

Carvacryl acetate (CA) is an acetylated derived of carvacrol, chemically defined as 5-isopropyl-2-methylphenyl acetate and that has anthelmintic, anxiolytic, anti-inflammatory and antinociceptive proven pharmacological activity. However, there is no research on acute toxicity, genotoxic and antioxidant properties of this compound. Thus, the present study aimed to investigate the toxicity, genotoxicity and its antioxidant potential. To this end, an evaluation of acute toxicity following administration of AC in *Swiss* mice (25-30 g), 2 months old, of both sexes treated with vehicle, 1000 and 2000 mg kg⁻¹ by oral (p.o) and intraperitoneally (i.p) route on the physiological, biochemical and hematological parameters and checked their effects on locomotor activity and motor coordination in mice. Furthermore, it was determined lethal dose 50% (LD₅₀) of this monoterpene. In addition, in mice that received acute treatment with carvacryl acetate, the genotoxicity was evaluated by the comet assay at different times (24h and 72h) in both the peripheral blood cells and in the hippocampus of these mice. To complement, was evaluated the *in vitro* antioxidant capacity of CA by the elimination of the radicals 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and acid 2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) and by potential reducer. The results showed that acute administration of CA with selected doses did not induce significant changes in physiological, biochemical and haematological data. The CA did not affect the locomotor activity of the animals, however, the dose of 2000 mg kg⁻¹ produced a reduction of motor coordination of the animals when compared with the control group. The acute toxicity study indicated that the treatment with CA orally in the selected doses, was well tolerated in all treated animals, suggesting its security for further investigations. The LD₅₀ for i.p route was 1542.21 mg kg⁻¹ in mice. The CA at doses of 1000 and 2000 mg kg⁻¹ can induce DNA damage in peripheral blood cells and hippocampus from male and female mice by a significant increase in damage index (DI) and damage frequency (DF) in relation to vehicle group. However, a significant reduction of ID and FD of males (2000 mg kg⁻¹) and females (1000 and 2000 mg kg⁻¹) after 72h of the treatment, suggesting a capacity of peripheral blood cells of mice treated acutely with CA in repairing genetic damage. The results antioxidants showed that the CA at concentrations of 0.9, 1.8, 3.6, 5.4 and 7.2 µg mL⁻¹ has the capacity to act on removal of DPPH[•] radical (EC₅₀ = 6.27 µg mL⁻¹) and ABTS^{•+} (EC₅₀ = 5.46 µg mL⁻¹), and potential reducer (EC₅₀ = 3.2 µg mL⁻¹).

Keywords: Safety Pre-clinical, Carvacryl acetate, Phytomedicine, Comet assay.

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são definidas como patologias que afetam populações em ambientes com poucos recursos e, dessa forma, não despertam o interesse da indústria farmacêutica, que não vê um mercado lucrativo que justifique os elevados investimentos na pesquisa de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Portanto, apesar de representar 11% da carga global de doenças do mundo, na última década, essas doenças receberam apenas 4% das novas terapias do mundo e 1,2% de novas entidades químicas (JOHNSTON; FORD; TAYLOR, 2013; WILLYARD, 2013).

A cada dia, aproximadamente três mil pessoas morrem no mundo vítimas de doenças negligenciadas como doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose visceral e malária, ocasionando mais de um milhão de mortes ao ano (PONTES, 2009). No Brasil, a prevalência é elevada nas regiões Norte e Nordeste, nas quais há os menores índices de desenvolvimento humano (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Dessa forma, o governo Brasileiro tem trabalhado em iniciativas promissoras de inovação por meio do desenvolvimento de medicamentos para os programas públicos de saúde, instituindo o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas, o qual foca sete doenças, a saber: doenças de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose e dengue (SANTOS et al., 2012).

Nessa perspectiva, o Brasil possui a flora mais rica do mundo, com até 45.000 espécies de plantas superiores representando 20% do total mundial, o que fornece um arsenal terapêutico inestimável que deve, por sua vez, ser explorado no sentido de identificar moléculas que possam ser utilizadas para aplicação direta na medicina ou para servirem como protótipos à síntese de produtos farmacologicamente ativos. Também é relevante mencionar a importância dos medicamentos fitoterápicos que, em curto prazo, continuam sendo a alternativa mais viável e que requer menor investimento financeiro. Destarte, a busca de produtos naturais com propriedades medicinais passou a constar como prioridade, inclusive para empresas farmacêuticas de grande porte, sendo um exemplo de como os produtos da biodiversidade podem apresentar solução para as doenças negligenciadas, além de alavancar a economia do país (MORAES FILHO, 2010).

A prospecção e caracterização farmacológica de moléculas da biodiversidade brasileira com potencial atividade terapêutica é uma estratégia interventiva viável para os principais problemas de saúde de países em desenvolvimento. Existe uma necessidade contínua e atraente para novos e melhores tratamentos para doenças para países em

desenvolvimento. Estas incluem doenças infecciosas bacterianas, por protozoários e helmintos, como a tuberculose, a malária, leishmaniose, doença de Chagas, filariose linfática e esquistossomose. Uma gama de fatores limitam a utilidade dos medicamentos existentes em ambientes nos quais há vulnerabilidade social, como alto custo, baixa adesão, resistência a drogas, baixa eficácia e insegurança. Juntamente ao reduzido número de entidades químicas descobertas nos últimos anos, a evolução da resistência aos medicamentos é susceptível de comprometer todas as drogas com o tempo e, dessa forma, a demanda por novas terapias é contínua (SCHMIDT et al., 2011).

Nessa perspectiva, a dissertação intitulada “**Ensaio pré-clínico com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos**” foi estruturada em capítulos originados de artigos científicos submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica e de um pedido de depósito de registro de patente submetido junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). O primeiro capítulo aborda uma prospecção tecnológica e científica, a fim de analisar o estado da arte com o acetato de carvacrila, fornecendo subsídios para estudos posteriores. O segundo capítulo relata os principais resultados pré-clínicos de toxicidade, sendo ponto fundamental para prosseguimento das demais etapas da pesquisa clínica. O terceiro capítulo complementa o anterior, com dados sobre toxicidade genética, além de descrever o potencial farmacológico do acetato de carvacrila como antioxidante. Além disso, o quarto capítulo representou um depósito de registro de pedido de patente no INPI, uma vez que há uma necessidade crescente da transferência de tecnologia entre universidade e indústria, e da indústria à ambientes pobres em recursos com o objetivo de favorecer a construção de pontes que favoreçam as ligações entre os setores econômico-sociais (**Ilustração 1**).

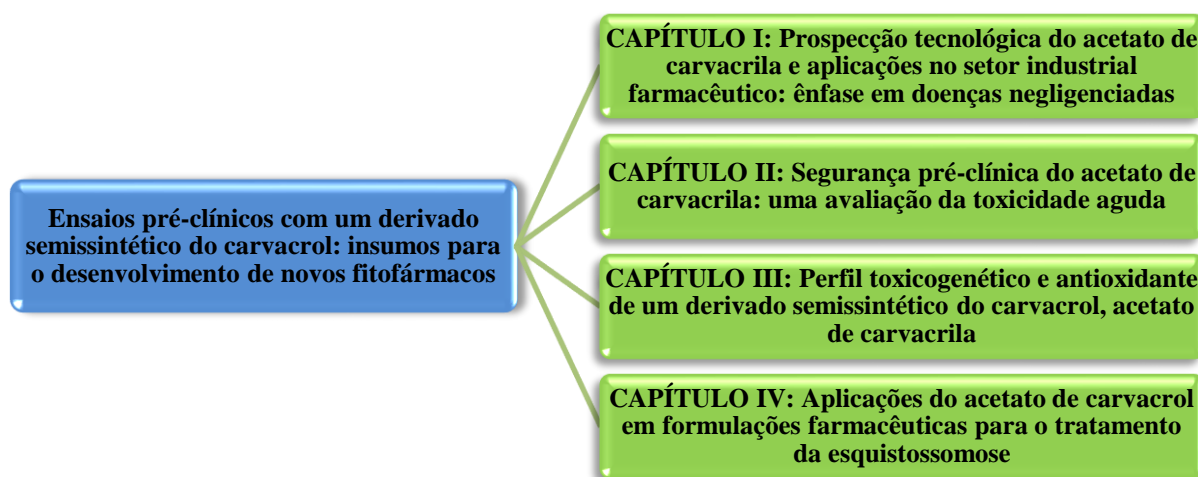


Ilustração 1. Representação estrutural da dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar um estudo pré-clínico em camundongos *Swiss* tratados com acetato de carvacrila, bem como investigar o potencial antioxidante *in vitro* e antihelmíntico contra *S. mansoni*.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a toxicidade aguda do monoterpeno acetato de carvacrila em camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados por via oral e intraperitoneal em parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Realizar *screening hipocrático*, análise morfológica e macroscópica dos principais órgãos, bem como determinar a Dose Letal 50% (DL₅₀);
- Determinar os efeitos genotóxicos por meio do ensaio cometa;
- Investigar a atividade locomotora e coordenação motora em animais submetidos aos testes do campo aberto e da barra giratória, respectivamente;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* por meio dos métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, bem como propor os possíveis mecanismos de ação.
- Verificar a atividade antihelmíntica do acetato de carvacrila em *S. mansoni* na fase adulta e avaliar seu efeito por meio da análise morfológica no tegumento do *S. mansoni*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

Plantas medicinais são definidas como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, constituintes químicos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos, bem como materiais de partida para a síntese de drogas (WHO, 1998).

O uso de plantas medicinais tem marcado a evolução humana, seu papel na medicina e saúde tem refletido a importância em diversas culturas. As diversas atividades biológicas e potencial medicinal de produtos naturais derivados de plantas, reforçam a promessa para o desenvolvimento de novas terapias contra muitas doenças (JI et al., 2009).

Ultimamente, as plantas medicinais movem altos valores econômicos em todo o mundo e representam o tipo de tratamento mais acessível para maioria da população, principalmente entre os países em desenvolvimento que possuem serviços de saúde limitados (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Entretanto, quando realizada prospecção de artigos e patentes envolvendo uma doença negligenciada, usando os termos *schistosomiasis* e *medicinal plant* para as bases internacionais e esquistossomose e planta medicinal para as bases nacionais, foi observado que o grande número de estudos publicados não foi completamente traduzido em produtos patenteáveis (**Ilustração 1**). Dessa forma, apenas uma pequena fração da imensa diversidade do metabolismo das plantas tem sido explorada para a produção de novos medicamentos e outros produtos importantes para saúde humana (LUCA et al., 2012).

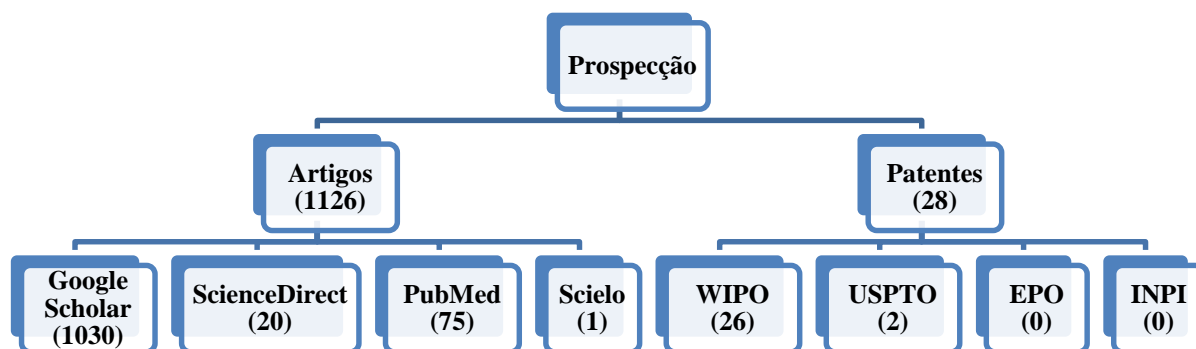


Ilustração 1. Prospecção de plantas medicinais para o tratamento da esquistossomose.

As plantas medicinais, por meio do seu metabolismo secundário, proporcionam uma mistura complexa de moléculas voláteis conhecidos como os óleos essenciais, produtos naturais de grande importância para economia e saúde de um país (FALEIRO; MIGUEL,

2013). Nessa perspectiva, o presente estudo marca a invenção de um novo composto para o tratamento de esquistossomose, confirmando aplicabilidade farmacêutica do acetato de carvacrila.

3.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenoides e fenilpropanóides, sendo que os primeiros constituem a maior parte dos óleos essenciais. A exploração da bioatividade destes compostos tem sido foco de pesquisadores que vêem neles uma fonte promissora de princípios ativos diretos ou precursores na síntese ou semissíntese de outros compostos de maior importância e valor agregado (OOTANI et al., 2013).

Recentemente, a população mundial tem desenvolvido um interesse crescente em produtos naturais, como alternativas aos aditivos artificiais ou agentes farmacológicos. Entre eles, os óleos essenciais têm adquirido grande popularidade nos alimentos, cosméticos, bem como a indústria farmacêutica (TUREK; STINTZING, 2013) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Patentes desenvolvidas a partir de óleos essenciais

Nº do Processos	Títulos
PI 0704355-4	Processo de uso dos óleos essenciais da erva-doce (<i>Pimpinella spp.</i>) na fabricação de doces em calda, principalmente doce de banana em calda.
PI 0900802-0	Óleos essenciais e compostos isolados de extratos de <i>Baccharis spp.</i> , formulações farmacêuticas e/ou cosméticas e seus usos.
PI 1102829-7	Métodos para preparo de enxaguatórios bucais sem álcool a base de óleo essencial bioativos.
PI 0602027-5	Formulações a base do óleo essencial de alecrim pimenta (<i>Lippia sidoides</i> Cham.) para proteção pessoal contra o mosquito <i>Aedes aegypti</i> linn.
PI 0905099-0	Composto bioativo de plantas para cicatrização de pele a base de óleos essenciais.
PI 0603005-0	Fungicida natural a base de óleos essenciais.
PI 0901501-9	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais vegetais.

Embora nem todas invenções estejam disponíveis comercialmente, várias formulações farmacêuticas com metabólitos secundários derivados de plantas aromáticas estão sendo direcionados ao tratamento ou prevenção de várias doenças e, nessa perspectiva, diversos óleos essenciais possuem uma variedade de atividades farmacológicas antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, ansiolítica, anticonvulsivante e antinocicepitiva (TOSUN et al., 2008; MENICHINI et al., 2009; CHANDRASHEKAR;

PRASANNA, 2010; GUILHON et al., 2011; AIT-OUAZZOU et al., 2012; KUMAR et al., 2012; LEE et al., 2012) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Atividade farmacológica de óleos essenciais.

Óleos essenciais	Atividades	Referências
<i>Heracleum crenatifolium</i>	Anticonvulsivante	Tosun e colaboradores (2008)
<i>Teucrium brevifolium</i>	Anti-inflamatória	Menichini e colaboradores (2009)
<i>Teucrium flavum</i>	Antitumoral	
<i>Teucrium montbretii</i> ssp.		
<i>Heliotropiifolium</i>		
<i>Teucrium polium</i> ssp.		
<i>capitatum</i>		
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Anti-inflamatória Analgésica	Chandrashekar e Prasanna (2010)
<i>Lippia gracilis</i>	Antinociceptiva Anti-inflamatória	Gilhon e colaboradores (2011)
<i>Mentha pulegium Juniperus</i>	Antimicrobiana	Ait-Ouazzou e colaboradores (2012)
<i>phoenicea Cyperus longus</i>		
<i>Stachys tibetica</i>	Ansiolítica	Kumar e colaboradores (2012)
<i>Psidium Guajava</i> L.	Antioxidante	Lee e colaboradores (2012)

Imensuráveis atividades biológicas destes óleos essenciais são atribuídas aos terpenos, que são seus principais constituintes químicos (AMARAL et al., 2007). Assim, a abundância de terpenos contribuem sobretudo para seleção de moléculas potenciais ao desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos.

3.3 Monoterpenos

Os terpenos pertencem ao mais importante grupo de produtos naturais, compreendendo a maior variedade de tipos estruturais. Estão classificados de acordo com o número de unidades de isopreno de cinco carbonos, os mais comuns são os monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀) e triterpenos (C₃₀), conforme exemplificado na **Ilustração 2** (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

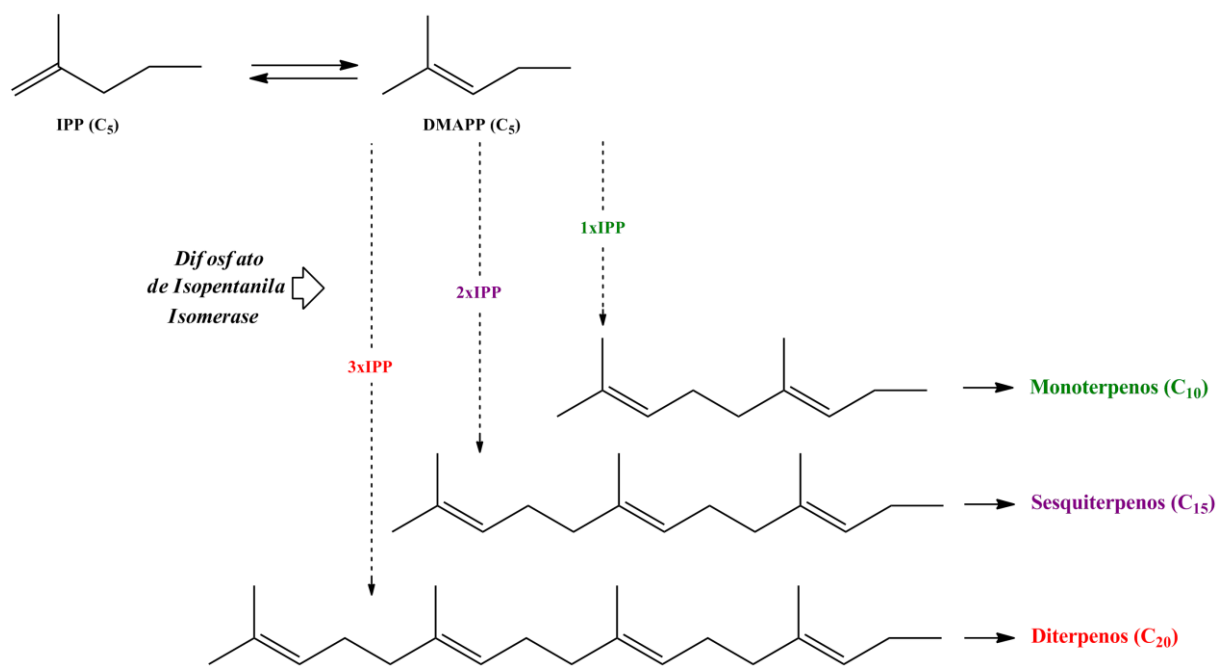
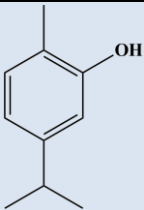
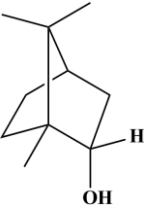
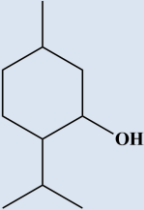
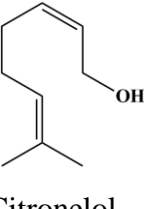


Ilustração 2. Biossíntese dos terpenos (SCHMIDT et al., 2011). (IPP) difosfato de isopentanila. (DMAPP) difosfato de dimetilalila.

Os terpenóides podem ser originados por duas vias de biossíntese, a via do mevalonato e metileritritol fosfato (MEP). A via do metileritritol fosfato, que forma os monoterpenos, ocorre nos plastídeos e seus precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Os terpenos são originados a partir da formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), com 5 carbonos, que deve ser convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), sob ação da enzima IPP isomerase. Para a formação dos monoterpenos, uma unidade de IPP é somada a uma de DMAPP, por meio de uma preniltransferase, formando o seu precursor difosfato de geranila (GPP), com dez carbonos (OOTANI et al., 2013).

Na busca por novas opções terapêuticas, as plantas são uma importante fonte de novas moléculas. Os monoterpenos compõe 90% de óleos essenciais, e existe um interesse crescente na compreensão dos mecanismos subjacentes à sua atividade farmacológica (GUIMARÃES et al., 2013). Dentre eles podemos destacar o carvacrol, borneol, mentol e citronelol com ações antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e anticonvulsivante, respectivamente (SOUSA et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; KAMATOU et al., 2013) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Atividades farmacológicas de monoterpenos.

Compostos	Atividades	Referências
 Carvacrol	Antioxidante	Sousa e colaboradores (2006)
 Borneol	Anti-inflamatória	Almeida e colaboradores (2013)
 Mentol	Analgésica	Guimarães e colaboradores (2010)
 Citronelol	Anticonvulsivante	Kamatou e colaboradores (2013)

3.4 Acetato de Carvacrila

O vasto acervo de moléculas presentes em óleos essenciais tem possibilitado a descoberta constante de várias atividades biológicas em monoterpenos. Além disso, modificações estruturais destes compostos permitem o desenvolvimento de drogas com amplo espectro farmacológico e toxicidade reduzida. Deste modo, o carvacrol é um fenol monoterpênico que ocorre naturalmente nos óleos essenciais de diversas plantas como *Origanum vulgare* L., *Thymus vulgaris* L., *Mosla chinensis*, *Falcaria vulgaris* (BORGES, Antonia et al., 2012; PIRBALOUTI; HASHEMI; GHAHFAROKHI, 2013; CAO et al., 2009; JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013), além de poder ser adquirido comercialmente com pureza de até 99%.

Nessa perspectiva, o acetato de carvacrila é um monoterpeneo ester, derivado do carvacrol, quimicamente definido como 5-isopropil-2-metilfenil acetato (fórmula molecular: $C_{12}H_{16}O_2$; peso molecular: 192,26; índice de refração: 1,497; ponto de ebulição: 94,56 °C em 760 mmHg; entalpia de vaporização: 48,414 KJ mol⁻¹ e densidade: 0,994 g cm⁻³) e que possui atividade anti-helmíntica, ansiolítica, anti-inflamatória e antinociceptiva.

Em um estudo de Moraes e colaboradores (2013), o acetato de carvacrila demonstrou ser capaz de afetar a motilidade e viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*, bem como reduzir a aptidão reprodutiva por inibição da produção de ovos destes vermes. Em outra investigação, Pires e colaboradores (2013) relataram potencial ansiolítico, sem evidência de alterações psicomotoras de camundongos tratados com acetato de carvacrila, sugerindo uma droga alternativa para transtornos da ansiedade. Damasceno e colaboradores (2013) forneceram evidência de que o acetato de carvacrila possui efeito anti-inflamatório, por redução de mediadores inflamatórios, migração de neutrófilos e concentração de citocinas, e, antinociceptivo, por envolvimento das vias capsaicina e glutamato. Assim, notáveis avanços com o acetato de carvacrila o fazem promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.

Em nosso estudo, o acetato de carvacrila (98% de pureza) foi obtido por meio da acetilação do carvacrol, usando anidrido acético como agente acilante e piridina como catalizador (**Ilustração 3**). Inicialmente em um balão de 50 mL, equipado com agitador magnético, acoplado a um condensador Friedrich e com atmosfera inerte, foi adicionado carvacrol (5 g, 0,033 moles), piridina (7,5 mL) e anidrido acético (12,5 mL). Posteriormente foi submetido a agitação magnética constante e sob refluxo por 24 horas. Continuando o procedimento de preparação a mistura reacional foi vertida em água gelada (60 mL), sendo feita a extração do produto reacional em um funil de decantação utilizando clorofórmio como solvente extrator (3 vezes de 60 mL). As fases clorofórmicas foram reunidas e lavadas com solução saturada de sulfato de cobre (3 vezes de 60 mL).

A fase clorofórmica foi lavada com água (3 vezes de 60 mL) e secada com Na₂SO₄ anidro. Posteriormente, foi evaporado o solvente em evaporador rotativo. O produto reacional foi submetido à cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano: acetato de etila (95:5) como fase móvel. Foi obtido 4,779 g (0,025 moles) de acetato carvacrila, com 76% de rendimento (VOGEL; TATCHELL; FURNIS, 1996).

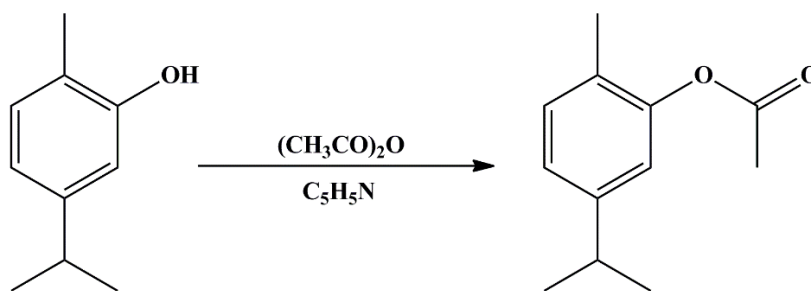


Ilustração 3. Reação química de obtenção do acetato de carvacrila (5-isopropil-2-metilfenil acetato).

A identificação estrutural do acetato de carvacrila foi realizada por meio das análises de RMN de ^1H e ^{13}C , infravermelho e comparação com dados da literatura.

3.5 Óleos Essenciais *versus* Doenças Negligenciadas

As doenças transmissíveis mais relevantes no mundo em desenvolvimento são denominadas negligenciadas e merecem atenção especial das agências de fomento de pesquisa por não serem tidas como prioridades para a indústria farmacêutica (CARVALHEIRO, 2008). Em adição, no ano de 2013, o Brasil não incluiu em sua Agenda de Prioridades de Pesquisa em Saúde as enfermidades dessa natureza e, dessa forma, não têm sido contempladas em editais do CNPq e do Ministério da Saúde.

As Doenças Negligenciadas (DNs) estão divididas em treze doenças parasitárias e bacterianas, incluindo três verminoses transmitidas pelo solo (ascaridíase, ancilostomose e tricuriase), filariose, oncocercose, dracunculose, esquistossomose, doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose, hanseníase e tracoma (HOTEZ et al., 2008).

Estudos têm reportado a atividade esquistossomicida de vários óleos essenciais como de *Baccharis trimera* (Less) DC (OLIVEIRA et al., 2012), *Plectranthus neochilus* Schltr. (CAIXETA et al., 2011), *Piper cubeba* L. (MAGALHÃES et al., 2012), *Ageratum conyzoides* L. (MELO et al., 2011), *Baccharis dracunculifolia* DC. (PARREIRA et al., 2010). Além disso, pode ser destacado a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (MACHADO et al., 2012) e tripanomicida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Lippia organoides* (BORGES, Andrezza et al., 2012) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Óleos essenciais de plantas com atividade contra doenças negligenciadas.

Nome Científico	Nome Popular	Atividade	Referência
<i>Baccharis trimera</i> (Less) DC	Carqueja, Cacaia, Vassoura, Iguape.	Esquistossomicida	OLIVEIRA et al., 2012.
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	Boldo-japonês, Boldo-de-jardim, Boldo-gambá.	Esquistossomicida	CAIXETA et al., 2011.
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Mentrasito, Camará-opela, Catinga-de-bode, Catinga-de-borrão, Celestina.	Esquistossomicida	MELO et al., 2011.
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Capim-limão, Belgate, Belgata, Capim-cidreira, Erva-cidreira, Capim-cheiroso.	Leishmanicida	MACHADO et al., 2012.
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Alecrim-pimenta, Alecrim-do- nordeste, Estrepa- cavalo, Alecrim- bravo.	Tripanomicida	BORGES, Andrezza et al., 2012.

Assim, considerando que a maioria das Doenças Negligenciadas serem endêmicas em países com recursos limitados, as enormes lacunas na área de prevenção e tratamento destas enfermidades podem ser preenchidas por esforços aplicados na descoberta e desenvolvimento de novos fitomedicamentos, tendo em vista o amplo acervo de recursos naturais presentes nesses países.

Neste contexto, o Brasil, um país endêmico para doenças negligenciadas, detém de recursos naturais inigualáveis, com destaque para as plantas medicinais que apresentam em seus óleos essenciais diversas ações terapêuticas. Em recente estudo, Melo e colaboradores (2013) identificaram atividade leishmanicida do óleo essencial da *Lippia gracilis* Schauer,

planta popularmente conhecida como alecrim-de-tabuleiro e extensivamente encontrada no nordeste.

3.6 Óleos essenciais *versus* Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônica que afeta mais de 200 milhões de pessoas e constitui um grande problema de saúde pública em grandes partes do mundo em desenvolvimento. Entretanto, a esquistossomose continua sendo uma das chamadas "doenças negligenciadas", já que afeta principalmente as populações pobres e em áreas rurais, nas quais há falta de acesso à água e ao saneamento adequado (FENWICK; UTZINGER, 2008). Segundo o Ministério da Saúde, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas são acometidas por esquistossomose no Brasil, sendo que a maioria destes localizados nos estados do Nordeste (BRASIL, 2005; VITORINO et al., 2012).

O agente etiológico da esquistossomose é o trematódeo digenético *Schistosoma mansoni* que na fase adulta habita os vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo (homem/vertebrado) e nas formas intermediárias (esporocistos primários, esporocistos secundários e cercárias) se desenvolvem no molusco do gênero *Biomphalaria* (SILVA et al., 2012).

O ciclo de transmissão da doença é iniciado quando fezes humanas contendo ovos de *S. mansoni* contaminam ambientes aquáticos (**Ilustração 4**). Condições ideais de temperatura e luz proporcionam que os ovos eclodam e liberem os miracídios, larvas ciliadas que penetram no hospedeiro intermediário e sofrem transformações em seu interior, originando os esporocistos primários e esporocistos secundários, e no seu último estágio, a cercária no interior do molusco. Estas rompem os tecidos dos moluscos e se espalham no ambiente aquático e em contato com o hospedeiro definitivo, penetram na sua pele e ou mucosa iniciando o processo infeccioso humano. Após penetrar na pele humana se transformam na forma parasitária denominada esquistossômulo, que para evitar as reações celulares, invadem os vasos venosos e/ou linfáticos e migram em direção ao coração. Do ventrículo direito elas são bombeadas para a pequena circulação, retornando ao coração pelas veias pulmonares e do ventrículo esquerdo saem pela aorta, passando por vários órgãos, para transitarem pelas artérias mesentéricas e passarem da circulação arterial para a venosa nos capilares mesentéricos, atingindo o fígado pela veia porta ou pela veia hepática. No fígado os vermes adultos migram contra a corrente vascular por meio da veia porta e vão se alojar nos vasos mesentéricos, próximos ao intestino. Os principais sintomas associados à doença incluem dor

abdominal, diarreia, sangue nas fezes, cirrose hepática e hipertensão portal (BARBOSA et al., 2008; LENZI et al., 2008; MELO, 2011; DANSO-APPIAH et al., 2013).

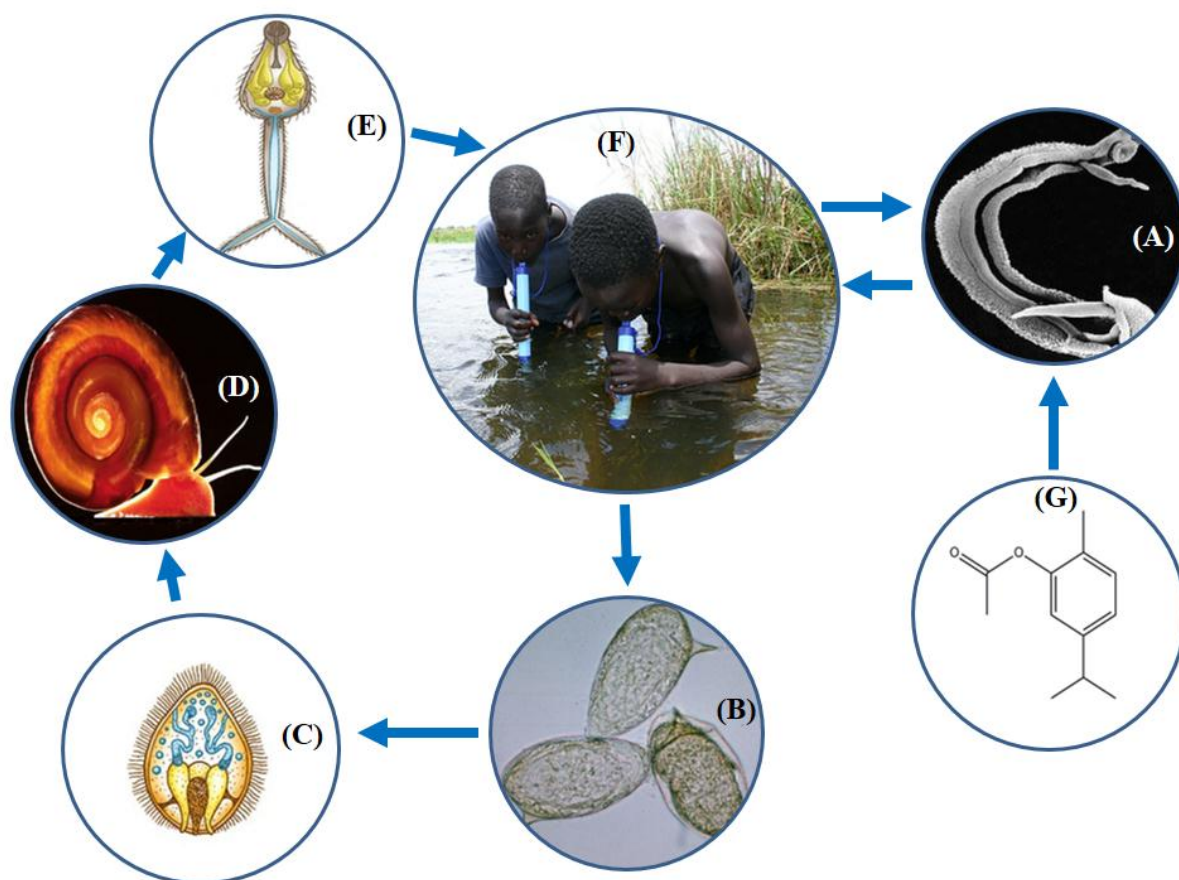


Ilustração 4. Ciclo de transmissão da esquistossomose. (A) Verme adulto; (B) Ovos; (C) Miracídio; (D) Caramujo; (E) Cercária; (F) Hospedeiro definitivo; (G) Acetato de carvacrila.

Atualmente, o praziquantel é a droga de escolha usada para o tratamento dessa doença. Entretanto, o praziquantel apresenta relativa toxicidade devido à sua baixa solubilidade, além de parasitas se apresentarem resistentes ao tratamento. Dessa forma, há necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes que possam ser utilizadas no tratamento dessa patologia (SILVA et al., 2012). Nessa perspectiva, o acetato de carvacrila tem sido eficaz contra a fase adulta do *Shistosoma mansoni*.

Assim, óleos essenciais com atividade antihelmíntica permitem uma abordagem inovadora e com custo reduzido para doenças negligenciadas (**Tabela 5**). A literatura descreve a referida atividade em óleos de diversas plantas a saber, *Hedychium gardnerianum*, *Laurus azorica* e *Juniperus brevifolia* (TEIXEIRA et al., 2012).

Tabela 5. Óleos essenciais de plantas com atividade antihelmíntica.

Plantas	Atividades	Referência
<i>Arisaema franchetianum</i> e <i>Arisaema lobatum</i> .	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> .	Zhu e colaboradores (2013)
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> .	Ribeiro e colaboradores (2013)
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> .	Lone e colaboradores (2012)
<i>Mentha pulegium</i>	Contra <i>Echinococcus</i> <i>granulosus</i> .	Maggiore e colaboradores (2012)
<i>Cymbopogon martinii</i> , <i>Cymbopogon schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> .	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> e <i>Trichostrongylus</i> spp.	Katiki e colaboradores (2011)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> .	Macedo e colaboradores (2011)
<i>Lippia sidoides</i>	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> e <i>Trichostrongylus</i> spp.	Camurça-vasconcelos e colaboradores (2008)
<i>Croton zehntneri</i> e <i>Lippia</i> <i>sidoides</i> .	Contra <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> , <i>Syphacia obvelata</i> e <i>Aspiculuris tetráptera</i> .	Camurça-vasconcelos e colaboradores (2007)

3.7 Óleos Essenciais versus Toxicidade

Os óleos essenciais compreendem uma vasta gama de compostos naturais, produtos do metabolismo primário e secundário, que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos no organismo. Em adição, diversos óleos são utilizados para fins medicinais sem o conhecimento de seu possível efeito tóxico (ALMEIDA et al., 2009).

Em um estudo desenvolvido de forma semelhante a esta dissertação, Höld e colaboradores (2000) observaram que a α -tujona, monoterpeno com atividade antinociceptiva, inseticida e antihelmíntica, apresenta DL₅₀ de 45 mg kg⁻¹ em camundongos tratados por via intraperitoneal. Em outro estudo, Almeida e colaboradores (2012), evidenciaram que o monoterpeno (+)-epóxi-limoneno apresenta DL₅₀ de 4000 mg kg⁻¹ em camundongos tratados por via intraperitoneal de forma aguda para 14 dias.

A planta *Hyptis martiusii* Benth., conhecida popularmente como cidreira-do-campo e amplamente encontrada no nordeste brasileiro, tem sido relatada na literatura por seus efeitos citotóxico, inseticida, antimicrobiano, antioxidante e antiulcerogênico. Os resultados de Caldas e colaboradores (2013) indicaram que o tratamento de doses repetidas com o óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. mostrou baixa toxicidade em camundongos, no qual os compostos majoritários foram 1,8-cineol, δ -3-careno, cânfora, α -pineno e óxido de cariofileno. A planta medicinal *Shinus molle* L., popularmente conhecida como aroeira, tem sido usada na medicina tradicional como anti-bacteriana, antiviral, anti-séptico tópico, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, antiespasmódico e analgésico, no entanto, poucos estudos toxicológicos foram realizados. Nesse sentido, Martins e colaboradores (2014) relataram a baixa toxicidade aguda de óleos essenciais da *Shinus molle* L. em camundongos *Swiss* ($DL_{50} > 2000 \text{ mg kg}^{-1}$), sendo que os compostos dominantes no óleo foram os monoterpenos α -felandreno, β -felandreno, β -mirceno, limoneno e α -pineno.

Dessa forma, por meio dos dados anteriormente citados é possível compreender que substâncias naturais de mesma classificação química podem apresentar valores diferentes para toxicidade, fato que confirma a necessidade de investigar a toxicidade dos diferentes compostos obtidos de óleos essenciais.

Em muitos países em desenvolvimento, a medicina tradicional é comumente utilizada, pois é um tratamento acessível e de baixo custo. Entretanto, a avaliação científica deve ser realizada sobre a eficácia e toxicidade potencial de remédios empregados na medicina popular (BUSSMANN et al., 2011). Diante disso, o presente estudo avaliou a toxicidade aguda do acetato de carvacrila em camundongos *Swiss*, bem como seus efeitos genotóxicos por meio do ensaio cometa.

Um dos métodos mais versáteis para estudar lesões e a capacidade de reparo do DNA é o ensaio cometa. Também conhecido como eletroforese em gel de células individuais, o ensaio do cometa é um método simples, sensível e quantitativo para medir quebras de DNA. Células em gel agarose sobre uma lâmina de vidro são lisadas para remover as membranas e os componentes solúveis, deixando o DNA ligado à matriz nuclear. Por conseguinte, estas células são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração de segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo (SILVA et al., 2007; COLLINS; AZQUETA, 2012).

Assim, conhecimentos sobre os efeitos tóxicos de óleos essenciais, bem como de compostos naturais isolados destes, fornecerão subsídios importantes para o desenvolvimento de novos fármacos.

3.9 Óleos Essenciais *versus* Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres excede a capacidade antioxidante do sistema. Espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN), incluindo o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, oxigênio singlete, radical hidroxila, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito estão envolvidos no crescimento, diferenciação, progressão e morte celular. Tais espécies podem reagir com os lipídeos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras moléculas pequenas. Dessa forma, baixas concentrações de ERO e ERN desempenham um papel indispensável na sinalização intracelular e defesa contra agentes patogênicos, enquanto que, as quantidades exacerbadas influenciam na origem de várias doenças humanas, incluindo artrite, câncer, diabetes, aterosclerose, isquemia, disfunções na imunidade e endócrinas (VASCONCELOS et al., 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; RAJENDRAN et al., 2014).

Neste contexto, antioxidantes presumivelmente podem atuar na proteção contra o acúmulo de radicais livres e sua eliminação do sistema. Assim, atenção tem sido dada sobre a capacidade antioxidante de produtos naturais, incluindo óleos essenciais que possuem amplo acervo de substâncias com atividades biológicas.

Em estudo recente, Lone e colaboradores (2014) comprovaram atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Senecio graciliflorus* DC, por meio do método DPPH. Por semelhante método, Prakash e colaboradores (2014) mostraram o potencial antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Angelica archangelica*. Em outro estudo, foi evidenciada a capacidade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter), utilizando o método DPPH[•] e ABTS^{•+} (GAZIM et al., 2014).

Assim, o acetato de carvacrila no presente estudo demonstrou capacidade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos, a saber: DPPH[•], ABTS^{•+} e poder redutor (Fe³⁺/Fe²⁺).

REFERÊNCIAS

AIT-OUAZZOU, A.; LORÁN, S.; ARAKRAK, A.; LAGLAOUI, A.; ROTA, C.; HERRERA, A.; PAGÁN, R.; CONCHELLO, P. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 313-319, 2012.

ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E.M.; PINHO, L.; SILVA, P.N.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R.; SANTOS, O.H.; BRANDI, I.V.; CANGUSSU, A.S.; COSTA, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 200-203, 2009.

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

ALMEIDA, J.R.G.D.S.; SOUZA, G.R.; SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; OLIVEIRA JUNIOR, R.G.; QUINTANS, J.S.S.; BARRETO, R.S.S.; BONJARDIM, L.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; QUINTANS JUNIOR, L.J. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.G.; AQUINO NETO, M.R.A.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, P.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; AMARAL, R.S.; PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 965-1008.

BORGES, A.M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.G.; ALVES, J.A.; LUCENA, E.M.P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 656-665, 2012.

BORGES, A.R.; AIRES, J.R.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BUSSMANN, R.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, D.; PARRIS, B.; DUBOSE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MARTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121-140, 2011.

CAIXETA, S.C.; MAGALHÃES, L.G.; MELO, N.I.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G.P.; AGUIAR, D.P.; MANTOVANI, A.L.L.; ALVES, J.M.; OLIVEIRA, P.F.; TAVARES, D.C.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S.; SILVA FILHO, A.A.; CROTTI, A.E.M. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in Southeast Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 11, p. 2149-2157, 2011.

CALDAS, G.F.R.; . Repeated-Doses Toxicity Study of the Essential Oil of *Hyptis martiusii* Benth.(Lamiaceae) in Swiss Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3, p. 288-294, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1, p. 167-170, 2008.

CAO, L.; SI, J.Y.; LIU, Y.; SUN, H.; JIN, W.; LI, Z.; ZHAO, X.H.; PAN, R.L. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 801-805, 2009.

CARVALHEIRO, J. R. Epidemics on a Global scale and in Brazil. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 7-17, 2008.

CHANDRASHEKAR, K.S.; PRASANNA, K.S. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 14, p. 23-25, 2010.

COLLINS, A.R.; AZQUETA, A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 736, n. 1-2, p. 122-129, 2012.

DAMASCENO, S.R.B.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; CARVALHO, N.S.; BRITO, C.F.C.; SILVA, I.S.; SOUSA, F.B.M.; SILVA, R.O.; SOUSA, D.P.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J-V.R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, *in press*, 2013.

DANSO-APPIAH, A.; OLLIARO, P.L.; DONEGAN, S.; SINCLAIR, D.; UTZINGER, J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. **Cochrane Database of Systematic Review**, v. 2000, n. 2, CD000528, 2013.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15, p. 1621-1637, 2009.

FALEIRO, M.L.; MIGUEL, M.G. Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. In: RAI, M.K.; KON, K.V. (Ed.). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 65-94.

FENWICK, A.; UTZINGER, J. Helminthic Diseases: Schistosomiasis. In: HEGGENHOUGEN, H.K. (Ed.). **International Encyclopedia of Public Health**. Oxford: Academic Press, 2008. p.351-361.

GAZIM, Z.C.; RODRIGUES, F.; AMORIN, A.C.L.; REZENDE, C.M.D.; SOKOVIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.; VUČKOVIĆ, I.; KRSTIĆ, G.; CORTEZ, L.E.R.; COLAUTO, N.B.; LINDE,

G.A.; CORTEZ, D.A.G. New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 514-524, 2014.

GUILHON, C.C.; RAYMUNDO, L.J.R.P.; ALVIANO, D.S.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MATHEUS, M.F.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.S.S.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Monoterpenes with Analgesic Activity—A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013.

HÖLD, K.M.; SIRISOMA, N.S.; IKEDA, T.; NARAHASHI, T.; CASIDA, J.E. α -Thujone (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 3826-3831, 2000.

HOTEZ, P.J.; BOTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C., AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 237-244, 2013.

JI, H-F.; LI, X-J.; ZHANG, H-Y. Natural products and drug discovery. **EMBO reports**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

JOHNSTON, K.L.; FORD, L.; TAYLOR, M.J. Overcoming the Challenges of Drug Discovery for Neglected Tropical Diseases The A·WOL Experience. **Journal of Biomolecular Screening**, *in press*, 2013.

KAMATOU, G.P.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M.; LAWRENCE, B.M. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013.

KATIKI, L.M.; CHAGAS, A.C.S.; BIZZO, H.R.; FERREIRA, J.F.S.; AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KUMAR, D.; BHAT, Z.A.; KUMAR, V.; KHAN, N.A.; CHASHOO, I.A.; ZARGAR, M.I.; SHAH, M.Y. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 4, n. 2, p. e169-e176, 2012.

LEE, W.C.; MAHMUD, R.; PILLAI, S.; PERUMAL, S.; ISMAIL, S. Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium Guajava* L. Leaves. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 86-91, 2012.

LENZI, H.L.; JUBERG, A.D.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, J.A. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* em hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, p. 85-145.

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LONE, B.A.; CHISHTI, M.Z.; BHAT, F.A.; TAK, H.; BANDH, S.A. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 317-321, 2012.

LONE, S.H.; BHAT, K.A.; BHAT, H.M.; MAJEED, R.; ANAND, R.; HAMID, A.; KHUROO, M.A. Essential oil composition of *Senecio graciliflorus* DC: Comparative analysis of different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 919-925, 2014.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S.M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658-1661, 2012.

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.V.; AMÓRA, S.S.A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 223-227, 2011.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A.M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M.C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MAGALHÃES, L.G.; SOUSA, J.M.; WAKABAYASHI, K.A.L.; LAURENTIZ, R.S.; VINHÓLIS, A.H.C.; REZENDE, K.C.S.; SIMARO, G.V.; BASTOS, J.K.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V.R.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L.(Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012.

MAGGIORE, M.A.; ALBANESE, A.A.; GENDE, L.B.; EGUARAS, M.J.; DENEGRI, G.M.; ELISSONDO, M.C. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus*

granulosus protoscoleces and metacestodes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1103-1112, 2012.

MARTINS, M.D.R.; ARANTES, S.; FÁTIMA, C.; TINOCO, M.T.; MORAIS, J.C. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

MELO, A.G.S. **Epidemiologia da esquistossomose e conhecimento da população em área periurbana de Sergipe**. 2011. 19 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

MELO, N.I.; MAGALHÃES, L.G.; CARVALHO, C.E.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G.P.; RAMOS, R.C.; MANTOVANI, A.L.L.; TURATTI, I.C.C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S.; CROTTI, A.E.M. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 762-773, 2011.

MELO, J.O.; BITENCOURT, T.A.; FACHIN, A.L.; CRUZ, E.M.O.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; FRANCA, S.C.; BELEBONI, R.O.; FERNANDES, R.P.M.; BLANK, A.F.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 110-115, 2013.

MENICHINI, F.; CONFORTI, F.; RIGANO, D.; FORMISANO, C.; PIOZZI, F.; SENATORE, F. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 679-686, 2009.

MORAES FILHO, M.O.D. A biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos inovadores. **Parcerias Estratégicas**, v. 15, n. 31, p. 171-192, 2010.

MORAES, J.; CARVALHO, A.A.L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.C.; MARQUES, T.H.C.; ANDRADE, L.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.G.; OLIVEIRA, A.S.S.; MONTANARI JÚNIOR, I.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; JERALDO, V.L.S.; LINHARES, A.X.; ALLEGRETTI, S.M. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 135-143, 2012.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; GONI, R.; RAINA, A.K.P.; DUBEY, N.K. Efficacy of *Angelica archangelica* essential oil, phenyl ethyl alcohol and α -terpineol against isolated molds from walnut and their antiaflatoxic and antioxidant activity. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-9, 2014. No prelo.

PIRBALOUTI, A.G.; HASHEMI, M.; GHAFAROKHI, F. T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 43-48, 2013.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; SILVA, O.A.; ALMEIDA, A.A.C.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.

PONTES, F. Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo. **Inovação em pauta**. Disponível em:
<<http://www.farmacia.ufpa.br/Agenda/doen%C3%A7as%20negligenciadas%20II.PDF>>.
Acesso em: 08 dez. 2013.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, 2014. No prelo.

RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; SANTOS, J.M.L.; OLIVEIRA, E.F.; CAMURÇAVASCONCELOS, A.L.F.; PAULA, H.C.B.; BEVILAQUA, C.M.L. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 24-29, 2013.

SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; SILVA, K.E.R.; ROLIM, L.A.; GOMES, T.C.B.L.; FERRAZ, L.R.M.; LIMA, A.A.N.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIMNETO, P.J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.

SCHMIDT, A.; NAGEL, R.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E.; GERSHENZON, J.; KRONKENE, P. Induction of isoprenyl diphosphate synthases, plant hormones and defense signalling genes correlates with traumatic resin duct formation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Molecular Biology**, v. 77, n. 6, p. 577-590, 2011.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, p. 30-37, 2007.

SILVA, K.E.R.; SILVA, R.M.F.; COSTA, S.P.M.; ROLIM, L.A.; LIMA, M.C.A.; ROLIMNETO, P.J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012.

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

SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2233-2252, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

TEIXEIRA, T.; ROSA, J.S.; RAINHA, N.; BAPTISTA, J.; RODRIGUES, A. Assessment of molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against *Radix peregra* (Müller, 1774). **Chemosphere**, v. 87, n. 1, p. 1-6, 2012.

TOSUN, F.; KIZILAY, Ç.A.; EROL, K.; KILIÇ, F.S.; KÜRKÇÜOĞLU, M.; BASER, K.H.C. Anticonvulsant activity of furanocoumarins and the essential oil obtained from the fruits of *Heracleum crenatifolium*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 990-993, 2008.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.D.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.D.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VITORINO, R.R.; SOUZA, F.P.C.; COSTA, A.P.; FARIA JÚNIOR, F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

VOGEL, A.I., TATCHELL, A.R., FURNIS, B.S. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5th Edition, Prentice Hall, 1996.

WHO. **Bulletin of the World Health Organization. Regulatory Situation of Herbal Medicines. A Worldwide Review**. World Health Organization, Geneva, 1998.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nature Medicine**, v. 19, n. 1, p. 2, 2013.

ZHU, L.; DAI, J.; YANG, L.; QIU, J. Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 311-316, 2013.

CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica do acetato de carvacrila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas

(Artigo publicado na Revista GEINTEC – GESTÃO, INOVAÇÃO E TECNOLOGIAS)

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO ACETATO DE CARVACRILA E APLICAÇÕES NO SETOR INDUSTRIAL FARMACÊUTICO: ÊNFASE EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Francisco Rodrigo de Asevedo Mendes de Oliveira¹, Guilherme Antônio Lopes de Oliveira¹, George Laylson da Silva Oliveira¹, Rivelilson Mendes de Freitas¹

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

RESUMO

As doenças negligenciadas (DNs) são endêmicas e atingem a África, Ásia e Américas, e podem causar a morte de um milhão de pessoas por ano. Atualmente há limitações no tratamento das diversas DNs, principalmente no que se refere a resistência aos medicamentos existentes. Destarte, o acetato de carvacrila constitui uma droga potencial, com comprovada atividade esquistossomicida e que pode colaborar com a erradicação das DNs. O objetivo do presente estudo foi realizar uma prospecção tecnológica das aplicações industriais do acetato de carvacrila em DNs, analisando a participação dos países nos depósitos de pedido de patente em bases nacionais e internacionais até o momento. Para isso, a prospecção foi realizada no Banco Europeu de Patentes, no banco da Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Banco Americano de Marcas e Patentes e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil. Os achados contribuem para um crescente investimento em pesquisa com o acetato de carvacrila no desenvolvimento de medicamentos eficazes, seguros e que permitam acesso às camadas com vulnerabilidade social.

Palavras-chave: Acetato de carvacrila; Doenças negligenciadas; Prospecção tecnológica.

INTRODUÇÃO

A humanidade faz uso dos produtos naturais desde os primórdios da civilização. Talvez uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais foi pela ingestão de ervas para o alívio e cura de doenças. No início do desenvolvimento de fármacos, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, isolando e determinando a estrutura de substâncias ativas, dessa forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e permanecem até hoje como medicamentos (VIEGAS JR et al., 2006).

A importância da pesquisa de produtos naturais e desenvolvimento de derivados semissintéticos para o uso terapêutico ultrapassam os fatores históricos e da grande biodiversidade do Brasil (PUPO et al., 2007). Depois das resoluções RDC nº 17 de 24/02/2000 e RDC nº 48 de 16/03/2004, dispendo sobre o registro de fitoterápicos no Brasil, cresceu o número de publicações referentes a fitomedicamentos e houve avanço na busca de substâncias bioativas impulsionado pelo baixo custo destes medicamentos para a saúde pública e a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde nacional.

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

Pesquisas envolvendo derivados sintéticos de componentes dos óleos essenciais tem demonstrado grandes efeitos na terapia de várias patologias. Por exemplo, α -terpineol (BICAS et al., 2011), α -tujona, (MOTHANA et al., 2011), α -pineno (WANNES et al., 2010) demonstraram características antioxidantes, *R*-(-)-carvona e timol (ESCOBAR et al., 2010) apresentaram atividade antiparasitária e o carvacrol (WU et al., 2010) demonstrou atividade antimicrobiana.

Sob o ponto de vista farmacológico o acetato de carvacrila (fórmula molecular: $C_{12}H_{16}O_2$) (**Ilustração 1**), derivado do carvacrol (CAO et al., 2009), tem demonstrado possuir atividade antihelmíntica (MORAES et al., 2013). Portanto, pode ser eficaz no tratamento de diversas doenças negligenciadas.

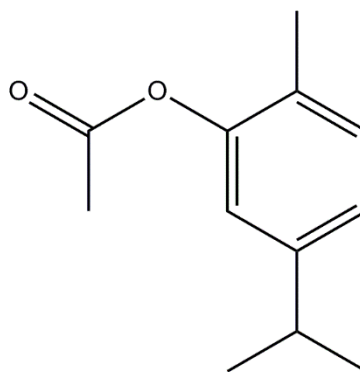


Ilustração 1. Estrutura química do acetato de carvacrila.

Essas patologias ainda causam graves problemas de saúde pública no mundo, porém o avanço de Pesquisa & Desenvolvimento de novos fármacos para aplicação em doenças negligenciadas está ligada à inovação científica e tecnológica incentivando um crescimento regional mais homogêneo e o fortalecimento de acordos bilaterais entre universidade, indústria e governo, integrando, assim, o conhecimento científico e o domínio tecnológico (BEYRER et al., 2007; GUIDO et al., 2010).

Deve-se considerar que os investimentos em P&D de fitomedicamentos tem gerado expectativas de obtenção de direitos sobre os resultados obtidos, para compensar os investimentos. No Brasil ainda é pequeno o número de patentes relacionadas com a área de Produtos Naturais (MOREIRA et al., 2006).

Diante do exposto, a presente investigação objetivou realizar uma prospecção tecnológica e revisão científica sobre o acetato de carvacrila, no setor industrial farmacêutico, com aplicações para o tratamento de doenças negligenciadas, para obter informações sobre a contribuição de diversos países nos depósitos de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais nos últimos anos.

METODOLOGIA

A prospecção foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no European Patent Office (EPO), na World Intellectual Property Organization (WIPO), no United States Patent and Trademark Office (USPTO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A revisão científica consistiu na análise das bases science direct, google scholar, PubMed e LILACS.

O estudo prospectivo foi realizado em maio de 2013 e compreendeu todos os anos disponíveis nas bases. Para revisão científica, foi utilizado o período de 2003 a 2013. Foram

utilizadas como palavras-chave os termos *neglected tropical disease(s) and carvacryl acetate* ou doenças negligenciadas e acetato de carvacrila. Os termos em inglês foram utilizados para as bases internacionais, enquanto que os termos em português para a busca de documentos em base nacional, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título/ou resumo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão científica e prospecção tecnológica foram usados como instrumento para mensuração e avaliação do desenvolvimento técnico, científico e socioeconômico de um país. Em se tratando do Brasil, o estudo serve como parâmetro para construção de novas diretrizes à pesquisa científica e delineamento industrial sobre os produtos naturais.

Diante da pesquisa efetuada, foi encontrado um artigo (MORAES et al., 2013) (**Tabela 1**), entretanto não foi identificado nenhum registro do pedido de depósito de patente.

Tabela 1. Total de artigos pesquisados nas bases science direct, google scholar, PubMed e LILACS, no período de 2003 a 2013.

Autores	Título	Ano
Moraes e colaboradores.	Anthelmintic activity of carvacryl acetate against <i>Schistosoma mansoni</i> .	2013

As doenças negligenciadas (DNs) são endêmicas e atingem a África, Ásia e Américas, e podem causar a morte de um milhão de pessoas por ano. Estas compartilham de várias características, uma delas é que a população afetada, em sua maioria, é assolada pela pobreza. Ainda em agravo, as DNs causam enorme impacto na saúde pública, decorrente de condições crônicas que resultam em deformidade e incapacidade ao longo da vida, afligindo vidas de mais de um bilhão de pessoas no mundo (GARG, 2011). Acrescente resistência aos medicamentos é suscetível de comprometer todas as drogas com o tempo, e por isso, a demanda por novas terapias é contínua. Assim, a descoberta de medicamentos é necessária para ajudar a garantir a disponibilidade de novos produtos que irão reduzir a morbimortalidade resultante das DNs (NWAKA; HUDSON, 2006).

O acesso global a medicamentos para distribuição às pessoas afetadas por DNs tem sido um gargalo, que pode ser resolvido mediante pesquisa com compostos naturais ou

derivados destes para o desenvolvimento de fármacos mais seguros, eficazes e de custo reduzido (GARG, 2011).

Atualmente a indústria, governos e universidades contam com prospecções para mapear as tendências científicas e tecnológicas dentro de áreas específicas da ciência e da tecnologia. A prospecção é uma análise das relações entre os vários conjuntos de indicadores medidos contra dimensões espaciais, temporais e técnicas. Os indicadores podem incluir artigos científicos, patentes, ensaios clínicos ou de campo, aprovações regulatórias e instituições. Análises adicionais representam conexões de diferentes grupos de áreas científicas ou tecnológicas e deste modo, coordenar atividades, pesquisadores e instituições de um determinado país (BUBELA et al., 2013).

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos por milênios, com muitas drogas úteis desenvolvidas a partir de fontes vegetais, e nesse contexto, o Brasil detém uma biodiversidade inigualável. Entretanto, com o advento da química combinatória, mudou o foco dos esforços de descoberta de drogas da natureza para bancada de laboratório, destacando drogas importantes a partir de fontes naturais que revolucionaram o tratamento de doenças graves como as DNs (CRAGG; NEWMAN, 2013).

No momento em que há limitações no tratamento das diversas DNs, principalmente no que tange a resistência aos medicamentos existentes, o acetato de carvacrila constitui uma droga potencial, com comprovada atividade esquistossomicida e que pode colaborar com a erradicação das DNs.

Hoje existe a necessidade nas indústrias farmacêuticas, no governo e nas universidades de desenvolver meios terapêuticos baratos e naturais para o tratamento de DNs, neoplasias e outras enfermidades que vêm acometendo a população. O número de pedidos e depósitos de patentes envolvendo monoterpenos já é significativo, o que mostra o interesse por pesquisas com substâncias de óleos essenciais. Na **Tabela 2** encontram-se pedidos e/ou depósitos de patentes com monoterpenos para o uso na saúde.

Tabela 2. Exemplos de pedidos de depósitos de patentes envolvendo monoterpenos e terapia em saúde.

Nº do Processo	Título
PI0905003-5	Uso de timol e carvacrol em formulações antimicrobianas naturais.
PI0017198-0	Formulação compreendendo timol útil no tratamento de infecções bacterianas resistentes a droga.
PI0619383-8	Composições e métodos compreendendo terpenos ou misturas de terpeno selecionadas de timol, eugenol, geraniol, citral e l-carvona.
PI9207127-9	Limoneno de ponto terminal bactericida de referência, processo para produzir composição bactericida e fungicida estável e processo para produzir microbicida estável.

Pelo fato de a produção de acetato de carvacrila ser recente, existe um baixo número de publicações com essa molécula, porém o que já se sabe é suficiente para continuar as discussões para o planejamento de novos fármacos. O interesse por novas patentes envolve a inovação terapêutica, proteção intelectual e os incentivos em P&D que objetiva a competitividade com medicamentos estabelecidos no mercado (MEINERS, 2008).

CONCLUSÃO

Um artigo foi encontrado, quando realizada a revisão científica e não foram encontrados pedidos de depósitos de patentes em nenhuma das bases pesquisadas.

Nossa investigação revela a importância do monitoramento tecnológico mundial de um produto natural derivado, para o direcionamento racional da pesquisa em DNs. Recentes avanços em compostos naturais têm sido relatados, e nesse contexto, o acetato de carvacrila, compreende muitas possibilidades de desenvolvimento de medicamentos potenciais às patologias que atingem as camadas sociais mais debilitadas.

REFERÊNCIAS

BEYRER, C.; VILLAR, J.C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S.D.; MILLS, E.J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. **The Lancet**, v. 370, p. 619-27, 2007.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1610–1615, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, 24.02.2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 25.02.2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 16.03.2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 18.03.2004.

BUBELA, T.; GOLD, E.R.; GRAFF, G.D.; CAHOY, D.R.; NICOL, D.; CASTLE, D. Patent landscaping for life sciences innovation: toward consistent and transparent practices. **Nature Biotechnology**, v.31, p. 202–206, 2013.

CAO, L.; SI, J.Y.; LIU, Y.; SUN, H.; JIN, W.; LI, Z.; ZHAO, X.H.; PAN, R.L. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, p. 801-805, 2009.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

GARG, N.J. Global Health: Neglected Diseases and Access to Medicines. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 639-651, 2011.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

MEINERS, C.M.M.A. Patentes farmacêuticas e saúde pública: desafios à política brasileira de acesso ao tratamento anti-retroviral. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 7, p. 1467-1478, 2008.

MORAES, J.; CARVALHO, A.A.L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.C.; MARQUES, T.H.C.; ANDRADE, L.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

MOREIRA, A.C.; MULLER, A.C.A.; PEREIRA JÚNIOR, N.; ANTUNES, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. **World Patent Information**, v.28, n. 1, p. 34-42, 2006.

MOTHANA, R.A.A.; HASSON, S.S.; SCHULTZE, W.; MOWITZ, A.; LINDEQUIST, U. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1149-1154, 2011.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, p. 941-955, 2006.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Chemical biology: a modern strategy for the natural products research. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OUCHIKH, O.; HAMD AOUI, G.; Kchouk, M.E. ; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362–1370, 2010.

CAPÍTULO II: Segurança pré-clínica do acetato de carvacrila: uma avaliação da toxicidade aguda

(Artigo submetido à Revista Food Chemical and Toxicology)

SEGURANÇA PRÉ-CLÍNICA DO ACETATO DE CARVACRILA: UMA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Francisco Rodrigo de Asevedo Mendes de Oliveira¹, George Laylson da Silva Oliveira¹, Antonio Luiz Gomes Junior¹, Damião Pergentino de Sousa², Rivelilson Mendes de Freitas ¹

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

²Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, CEP 58.051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

RESUMO

O acetato de carvacrila é um éster monoterpênico, derivado do carvacrol, que possui atividades anti-helmíntica e ansiolítica comprovadas. O objetivo do presente estudo foi determinar a dose letal 50% (DL₅₀), os efeitos da administração aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como da atividade locomotora e coordenação motora de camundongos tratados com acetato de carvacrila. Camundongos Swiss de ambos os sexos pesando entre 25-30 g foram utilizados nos experimentos. Para avaliação da toxicidade aguda foram separados 12 grupos de 5 animais pareados por peso e sexo. O acetato de carvacrila, suspenso assepticamente em 0,05% de Tween 80, dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado em única dose via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p) nas doses de 0, 1000 e 2000 mg kg⁻¹. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animal da Universidade Federal do Piauí. As manifestações comportamentais de toxicidade, como hipoatividade e astenia, foram evidenciadas apenas em animais tratados com a dose de 2000 mg kg⁻¹. Não houveram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos dos animais. O acetato de carvacrila não interferiu na atividade locomotora dos animais, entretanto, na dose de 2000 mg kg⁻¹ produziu redução da coordenação motora dos animais, sugerindo uma não influência psicomotora do composto. O estudo de toxicidade aguda indicou que o tratamento com acetato de carvacrila por via oral, nas doses selecionadas, foi bem tolerado em todos os animais em teste, sugerindo que o composto pode ser classificado como moderadamente tóxico.

Palavras-chave: Acetato de carvacrila; Camundongos; Monoterpenos; Toxicidade aguda.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são as principais fontes naturais usadas na medicina humana, sua vasta utilização está associada com a redução da carga de doença global (AKPANABIATU et al., 2013). Em adição, a concepção errônea de que compostos bioativos derivados de plantas são inócuos, contribui de forma significativa com essa ampla utilização na medicina tradicional.

A descoberta de fármacos, pela indústria farmacêutica, é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, onerosa, demorada, que envolve a aplicação de técnicas e metodologias avançadas, e cujo os investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) mostra uma relação de produtividade inversamente proporcional com a descoberta de novas entidades moleculares (NEM). É estimado que taxa de insucesso neste processo seja superior a 90% e as principais razões incluem perda de eficácia clínica, limitações farmacocinéticas, razões comerciais, reações adversas e toxicidade. As NEMs são identificadas no estágio de desenvolvimento pré-clínico do programa de descoberta de fármacos, sendo que a taxa de sucesso da etapa de descoberta até o desenvolvimento pré-clínico, pode variar de 1 a cada 100 ou 1 a cada 5000 compostos, e que a cada 25 NEMs apenas 1 se tornará um fármaco comercializado (LIMA, 2007).

Assim, o desenho de drogas e desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais tem aumentado substancialmente a cada ano. A identificação de novas moléculas com propriedades farmacológicas e mínimos efeitos tóxicos tem sido um desafio contínuo para a indústria farmacêutica. Nesse contexto, a investigação toxicológica pré-clínica contribui para identificação de drogas mais promissoras, tendo visto que os resultados destes estudos na descoberta, permitem a exclusão do candidato antes do consumo de recursos no desenvolvimento (BASS et al., 2009; MARQUES et al., 2013).

É sabido que os monoterpenos e derivados sintéticos possuem várias atividades farmacológicas (ALMEIDA et al., 2012; HUO et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Nessa perspectiva, o acetato de carvacrila é um ester monoterpênico, derivado do carvacrol, que possui comprovada atividade anti-helmíntica e ansiolítica (MORAES et al., 2013; PIRES et al., 2013).

Além disso, a identificação farmacológica de produtos farmacêuticos devem ser submetidos a uma série de estudos toxicológicos pré-clínicos para fornecer informações sobre a segurança de uma nova opção terapêutica antes do início dos vários ensaios clínicos em seres humanos, que são necessários antes de uma molécula se tornar um medicamento

aprovado. A ordem dos estudos gerais começa com o rastreio de toxicologia aguda e progride através de longos períodos de exposição (DENNY; STEWART, 2013).

Assim, o objetivo do estudo foi determinar a Dose Letal 50% (DL₅₀) e registrar os efeitos da administração aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como avaliar a atividade locomotora e coordenação motora de camundongos tratados por via oral e intraperitoneal com acetato de carvacrila.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas e dosagens

O AC foi preparado em nosso laboratório como previamente descrito (PIRES et al., 2013). O AC foi dissolvido em 0,05% de Tween 80 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA), dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral e intraperitoneal nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹. Os controles receberam veículo com o mesmo volume (10 ml/kg) e através da mesma via que os outros grupos tratados.

Animais e testes comportamentais

Foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos pesando entre 25-30 g. Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada (26 ± 1 °C) e um ciclo de 12 h claro/escuro. Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Todos os testes comportamentais foram realizados 60 minutos após as administrações, em salas silenciosas nas mesmas condições referidas acima e isoladas de ruídos externos. Todos os grupos foram tratados de forma aguda com dose única e observados diariamente por um período de 14 dias.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Washington DC, 1985. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI # 013/2011).

Estudo da toxicidade aguda em camundongos

Camundongos *Swiss* (25-30g) de ambos os sexos foram divididos em 12 grupos de 5 animais pareados por peso e tamanho. Estes animais foram alojados cinco camundongos por sexo/via/gaiola em um local bem ventilado com 12 h ciclo de dia e de noite as condições de luz e temperatura mantida em torno de 26 ± 1 °C. Todos os animais tiveram livre acesso à água da torneira e do mesmo tipo de alimento durante todo o experimento.

O acetato de carvacrila, suspenso asépticamente em Tween 80 0,05%, dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado em única dose via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p) (1000 e 2000 mg kg⁻¹). O comportamento geral dos camundongos foi monitorizado continuamente durante 1 hora após a dosagem, periodicamente, durante as primeiras 24 h (com especial atenção durante as primeiras 3 h) (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949), e, em seguida, diariamente a partir daí, para um total de 14 dias. As alterações nas atividades normais dos camundongos e os seus pesos foram monitorizados, bem como o tempo em que os sinais de toxicidade ou de morte apareceram. Para via intraperitoneal, a DL₅₀ foi determinada (HAMILTON et al., 1977).

Os estudos de toxicidade aguda foram realizados de acordo com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, da Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília-DF, 2013.

Protocolo experimental e triagem experimental

Após o tratamento agudo com acetato de carvacrila em doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹, cada animal foi submetido a uma série de testes do modo descrito abaixo. Primeiramente, os animais foram observados em ambiente fechado, à temperatura constante (26 ± 1 °C) (**Ilustração 1**). Os animais foram então colocados em uma área de campo aberto e observados durante 5 minutos. Imediatamente após o teste do campo aberto, os animais foram colocados em uma barra giratória, na qual foram avaliados por 3 min. Todos os testes foram realizados às 13:00 horas.

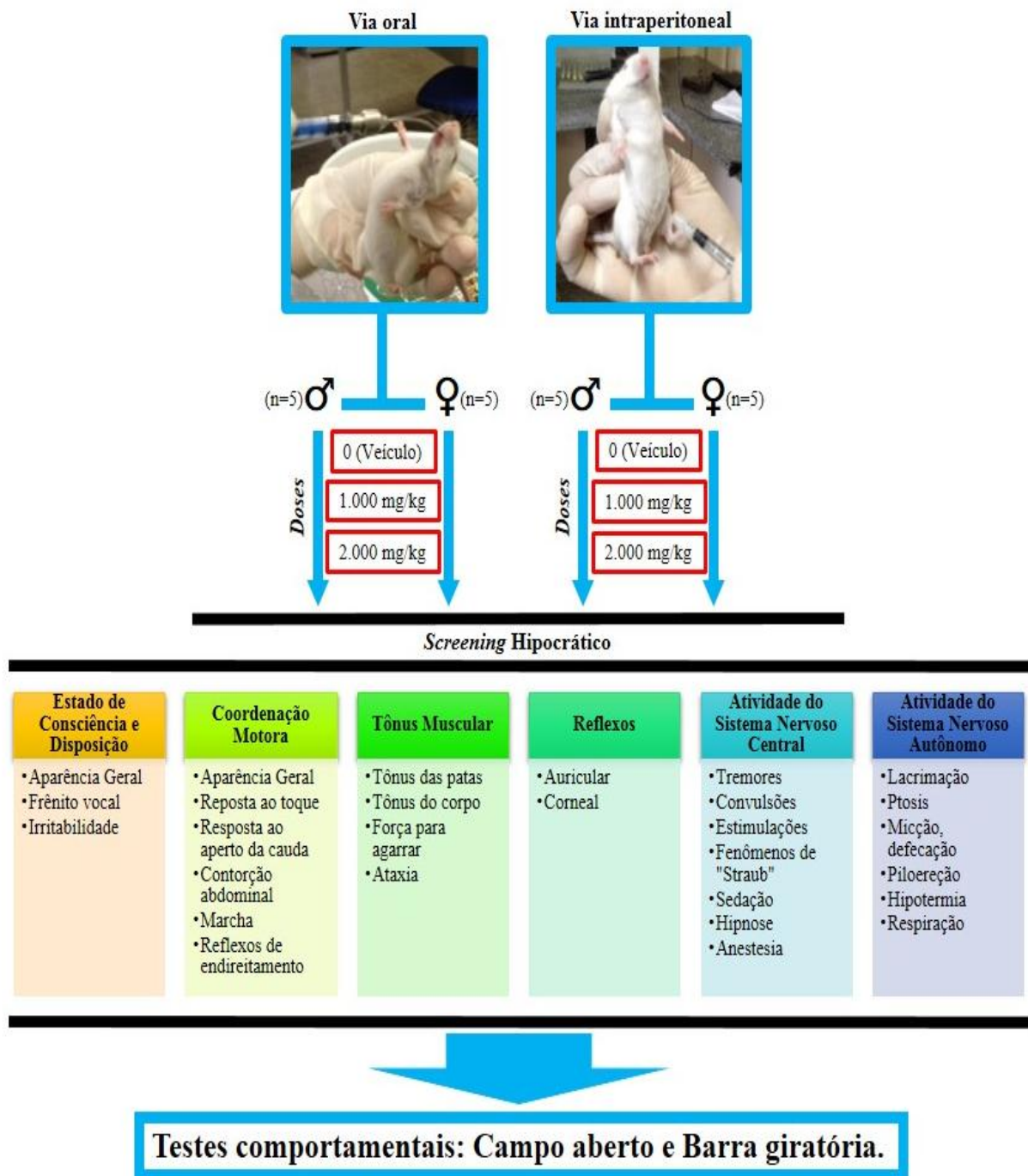


Ilustração 1. Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda.

Atividade locomotora

Para avaliar a atividade exploratória, os animais, um por vez, foram colocados em um campo aberto (**Ilustração 2**) feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 × 30 × 15 cm), dividido em nove quadrados de áreas iguais (ARCHER, 1973). Os parâmetros observados foram o número de quadrados cruzados (com quatro patas), número de

comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), gravados durante 5 minutos.



Ilustração 2. Campo aberto usado para avaliar atividade locomotora.

Coordenação motora

O teste da barra giratória (**Ilustração 3**) foi escolhido para determinar os efeitos do AC sobre a coordenação motora e relaxamento muscular nos animais. Os camundongos foram treinados antes do experimento para desenvolver a capacidade de permanecer durante 180 segundos em uma barra de 25 mm de diâmetro a uma velocidade de rotação de 17 rpm. Dois ou três ensaios, geralmente eram suficientes para o animal aprender a tarefa. Cada animal foi avaliado quanto ao número de quedas (até três quedas) e o tempo de permanência na barra durante 180 segundos foram registrados (DUNHAM; MIYA, 1957).



Ilustração 3. Barra giratória usada para avaliar a coordenação motora.

Análise dos dados fisiológicos

Foram observados e registrados, diariamente, dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração e produção de excretas).

Análise macroscópica dos órgãos

Após o 14º dia, os animais que restaram foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g (8,75mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100mg/mL)), conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education*, segundo descrito por Flecknell (1996) e Kohn (1997), e eutanasiados por deslocamento cervical. Sucedida à eutanásia, foi feita avaliação macroscópica órgãos, além da pesagem dos pulmões, fígado, coração, baço e rins.

Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Depois de 14 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados e em seguida foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante EDTA (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro e avaliação dos parâmetros bioquímicos (**Ilustração 4**).

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

Os parâmetros eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta, por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (MALONE, 1977; AL-HABORI et al., 2002).

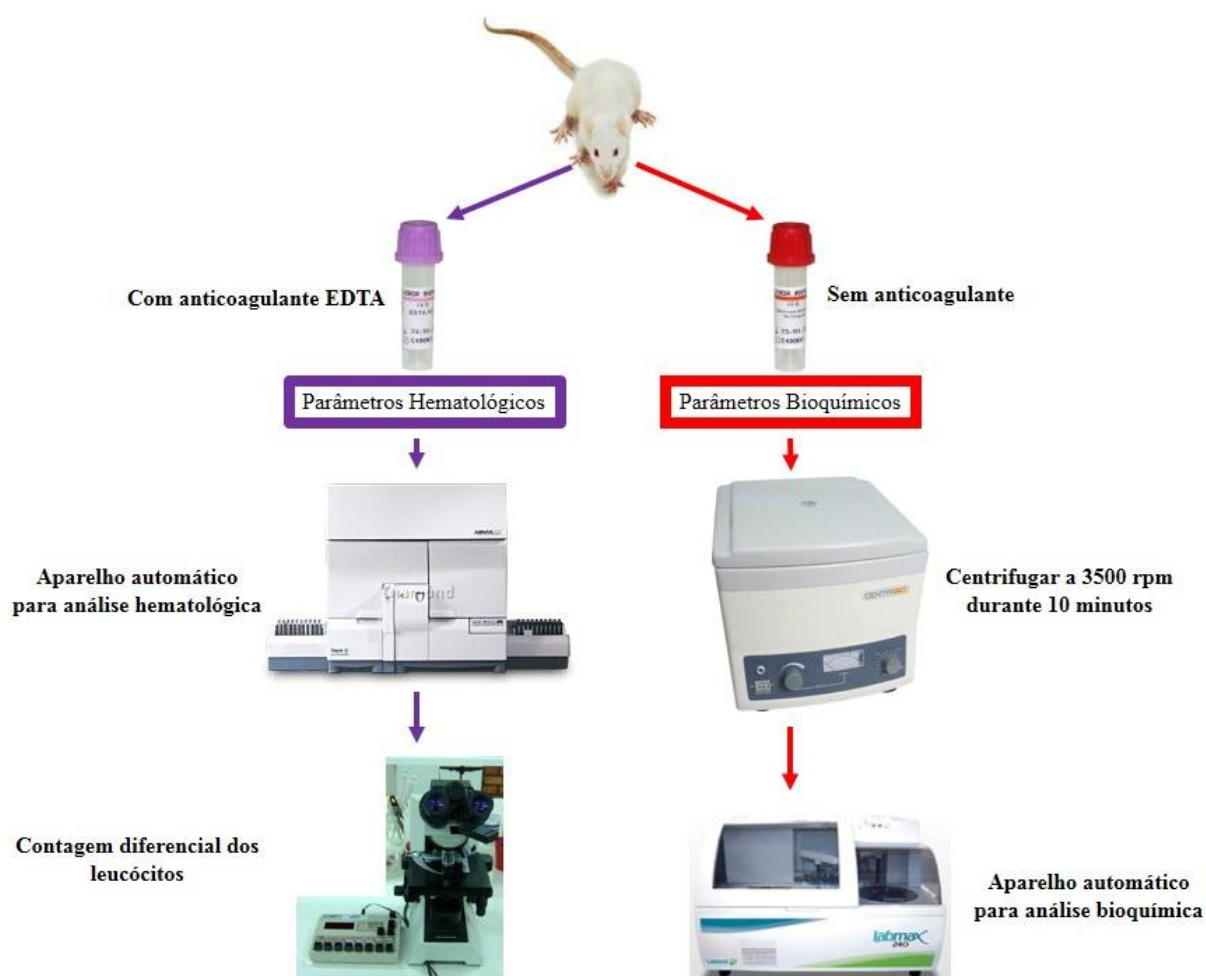


Ilustração 4. Processamento do sangue para análise hematológica e bioquímica.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média) e analisados com análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Estudo da toxicidade aguda em camundongos tratados com acetato de carvacrila

Apesar de verificado sintomas de toxicidade para dose de 2000 mg kg^{-1} , não houve mortes após administração oral de doses únicas de acetato de carvacrila. No entanto, a mortalidade e a toxicidade aguda foram evidenciadas após administração intraperitoneal, na qual, a dose de 2000 mg kg^{-1} produziu efeitos adversos que persistiram até a morte. Para via intraperitoneal, a dose de 1000 mg kg^{-1} correspondeu ao nível de efeito adverso não

observado (NOAEL) e para oral, a dose de 2000 mg kg⁻¹ correspondeu ao nível de efeito adverso não observado (ALEXEEFF et al., 2002). As manifestações comportamentais de toxicidade foram hipoatividade e astenia (**Tabela 1**). A toxicidade aguda (DL₅₀) calculada da administração intraperitoneal em camundongos foi 1,54 g/kg.

Peso corporal em camundongos tratados com acetato de carvacrila

O peso corporal do grupo controle e tratados com acetato de carvacrila estão apresentados na Ilustração 5. Na dose de 2000 mg kg⁻¹ o acetato de carvacrila, administrado via intraperitoneal, reduziu significativamente o peso de camundongos machos no 7º e 14º dia após o tratamento. Em contraposição, as respectivas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹ quando administradas por via oral, não influenciou significativamente o peso dos machos. Por conseguinte, para as fêmeas tratadas por ambas as vias de administração, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, dos pesos corporais médios dos grupos em tratamento em comparação com o grupo controle.

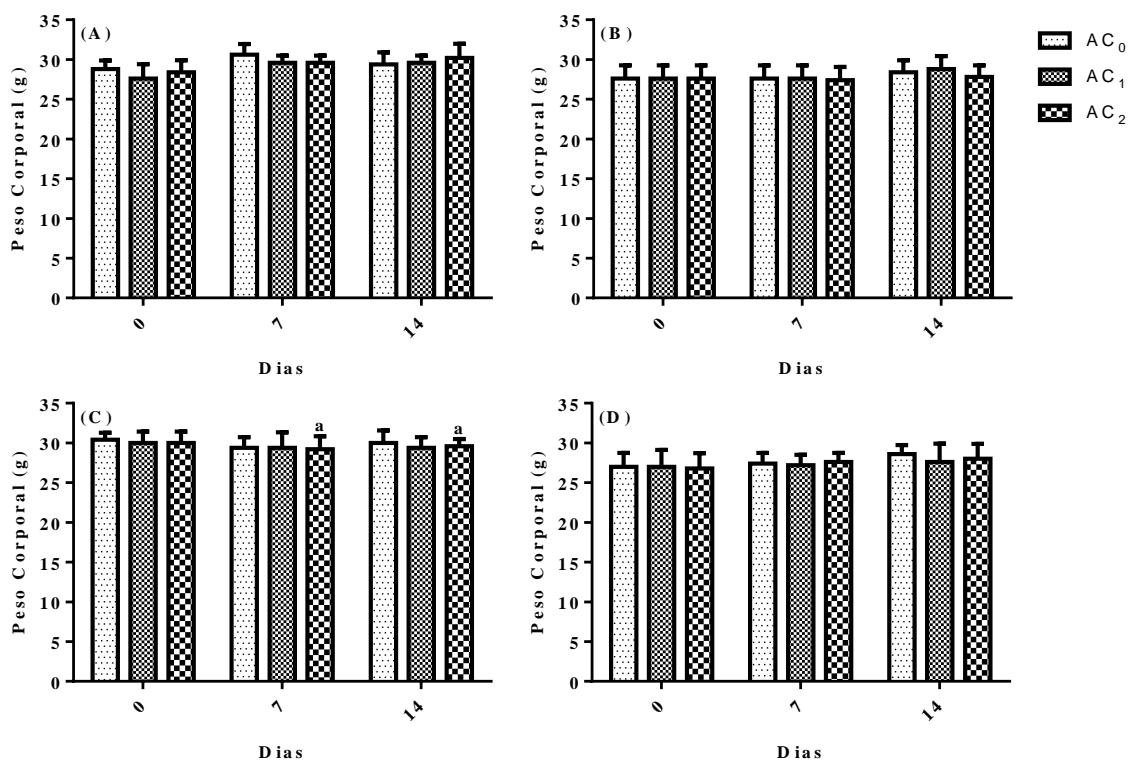


Ilustração 5. Médias do peso corporal de camundongos tratados com acetato de carvacrila e observado durante 14 dias (^ap<0,05 versus o controle). (AC₀) Veículo, (AC₁) 1000 mg kg⁻¹, (AC₂) 2000 mg kg⁻¹. Painel (A): Machos tratados por via oral; Painel (B): Fêmeas tratadas por

via oral; Painel (C): Machos tratados por via intraperitoneal; Painel (D): Fêmeas tratadas por via intraperitoneal.

Consumo de água em camundongos tratados com acetato de carvacrila

Os valores das médias do consumo de água de camundongos tratados com acetato de carvacrila estão expressos na Ilustração 6. O acetato de carvacrila não produziu alterações significativas no consumo de água de camundongos tratados nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹ em relação ao controle.

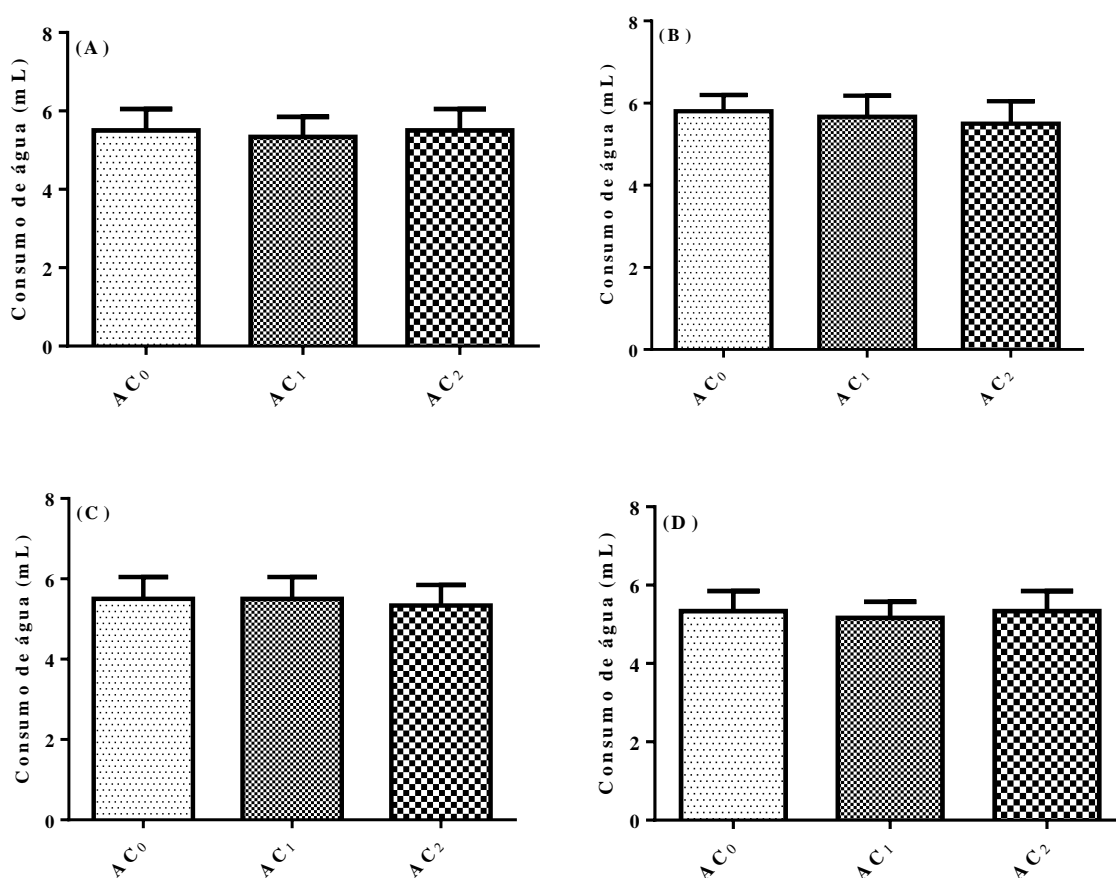


Ilustração 6. Médias do consumo de água de camundongos tratados com acetato de carvacrila e observados durante 14 dias. (AC₀) Veículo, (AC₁) 1000 mg kg⁻¹, (AC₂) 2000 mg kg⁻¹. Painel (A): Machos tratados por via oral; Painel (B): Fêmeas tratadas por via oral; Painel (C): Machos tratados por via intraperitoneal; Painel (D): Fêmeas tratadas por via intraperitoneal.

Consumo de ração em camundongos tratados com acetato de carvacrila

Conforme descrito na Ilustração 7, os camundongos tratados com acetato de carvacrila nas doses 1000 e 2000 mg kg⁻¹ não sofreram alterações significativas em relação ao controle.

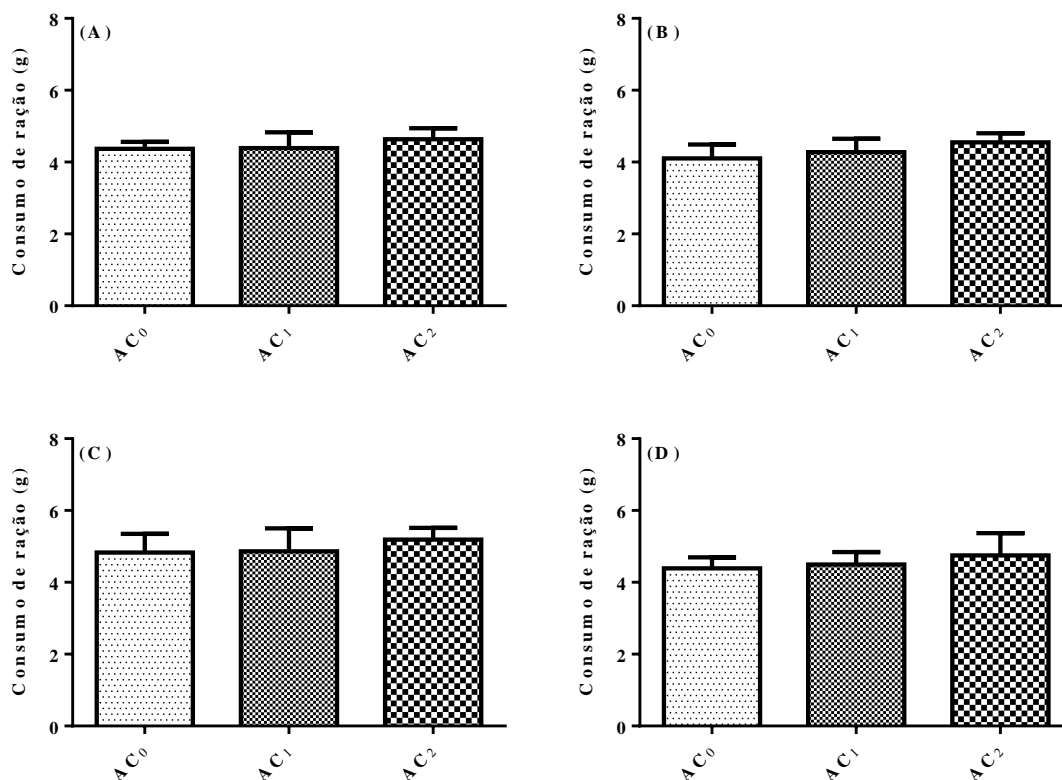


Ilustração 7. Médias do consumo de ração de camundongos tratados com acetato de carvacrila e observados durante 14 dias. (AC₀) Veículo, (AC₁) 1000 mg kg⁻¹, (AC₂) 2000 mg kg⁻¹. Painel (A): Machos tratados por via oral; Painel (B): Fêmeas tratadas por via oral; Painel (C): Machos tratados por via intraperitoneal; Painel (D): Fêmeas tratadas por via intraperitoneal.

Produção de excretas em camundongos tratados com acetato de carvacrila

Os valores referentes a produção de excretas estão demonstrados na Ilustração 8. Embora os resultados expressem aumento na produção de excretas em animais tratados com acetato de carvacrila na dose de 2000 mg kg⁻¹, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

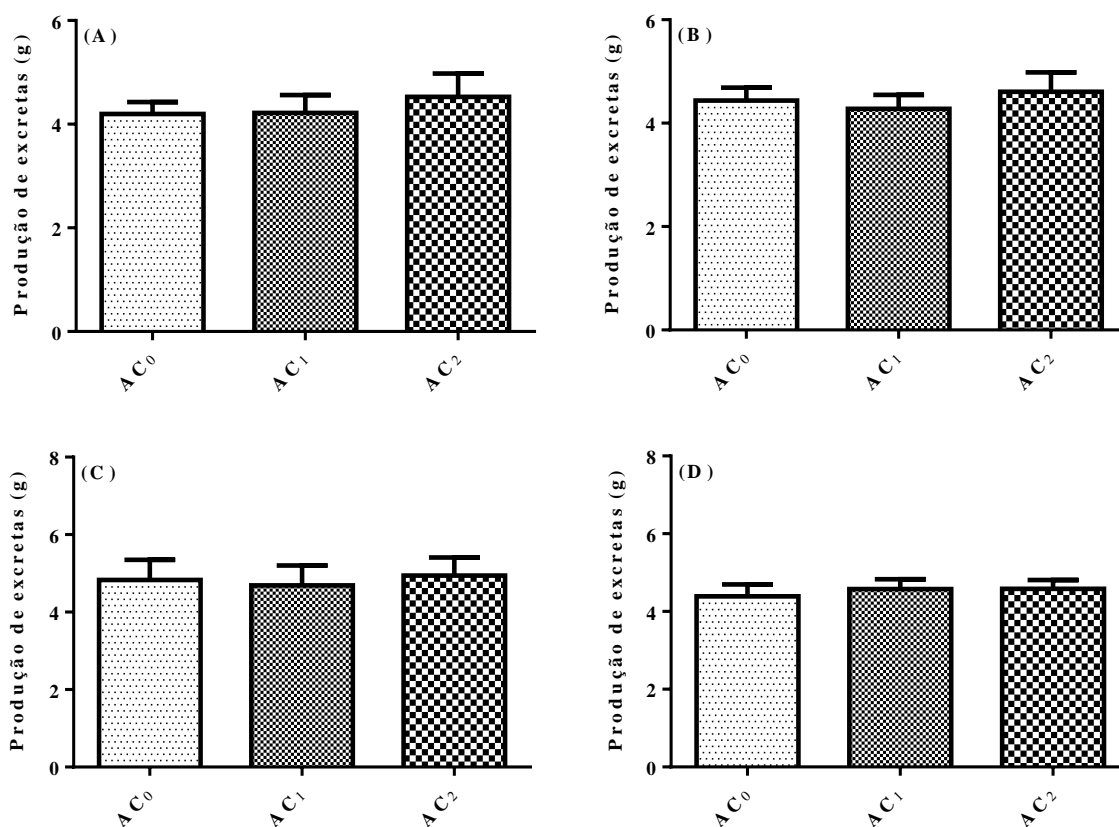


Ilustração 8. Médias da produção de excretas de camundongos tratados com acetato de carvacrila e observado durante 14 dias. (AC₀) Veículo, (AC₁) 1000 mg kg⁻¹, (AC₂) 2000 mg kg⁻¹. Painel (A): Machos tratados por via oral; Painel (B): Fêmeas tratadas por via oral; Painel (C): Machos tratados por via intraperitoneal; Painel (D): Fêmeas tratadas por via intraperitoneal.

Análise Macroscópica dos Órgãos em camundongos tratados com acetato de carvacrila

O exame macroscópico dos órgãos dos animais tratados e controle mostrou arquitetura normal, sugerindo que não houveram alterações prejudiciais e desordem morfológica induzidas pela administração oral e intraperitoneal aguda do acetato de carvacrila por 14 dias.

Peso dos Órgãos em camundongos tratados com acetato de carvacrila

A Tabela 2 apresenta o peso médio dos órgãos de camundongos tratados com acetato de carvacrila. Os animais tratado com acetato de carvacrila não apresentaram alterações significativas nos pesos dos órgãos.

Tabela 1. Efeitos do acetato de carvacrila em camundongos após administração aguda.

Via	Dose (g/kg)	Sexo	M/T	Latência para Mortalidade (min)	Sintomas de Toxicidade
Oral	AC ₀	M	0/5	–	Nenhum
		F	0/5	–	Nenhum
	AC ₁	M	0/5	–	Nenhum
		F	0/5	–	Nenhum
	AC ₂	M	0/5	–	Hipoatividade
		F	0/5	–	Hipoatividade
Intraperitoneal	AC ₀	M	0/5	–	Nenhum
		F	0/5	–	Nenhum
	AC ₁	M	0/5	–	Nenhum
		F	0/5	–	Nenhum
	AC ₂	M	4/5	>30, 60<	Hipoatividade, Astenia.
		F	4/5	>30, 60<	Hipoatividade, Astenia.

O acetato de carvacrila, suspenso assepticamente em 0,05% de Tween 80, dissolvido em 0,9% de solução salina (veículo), foi administrado em doses únicas orais e intraperitoneais para grupos de 5 camundongos. Todos animais foram cuidadosamente analisados quanto aos sintomas de toxicidade (mudanças de comportamento e mortalidade) para 14 dias. Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂). Machos (M), Fêmeas (F). Mortes (M), Tratados (T).

Tabela 2. Efeitos do acetato de carvacrila após administração aguda sobre os pesos dos órgãos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas.

Parâmetros	Via Oral			Via Intraperitoneal		
	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)
Machos						
Baço	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Coração	0,15 ± 0,09	0,15 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,02
Fígado	0,74 ± 0,18	0,83 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,91 ± 0,13	0,87 ± 0,12	0,84 ± 0,03
Pulmões	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Rins	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Fêmeas						
Baço	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,02
Coração	0,14 ± 0,08	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,03
Fígado	0,76 ± 0,04	0,74 ± 0,20	0,76 ± 0,08	0,69 ± 0,03	0,72 ± 0,07	0,71 ± 0,01
Pulmões	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,10	0,15 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,03
Rins	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,06	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,02

^ap<0,05, comparado ao grupo controle. Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂).

Efeitos do Acetato de Carvacrila sobre Atividade Locomotora de camundongos

Como apresentado na **Tabela 3**, o acetato de carvacrila não produziu alterações comportamentais (*groomings*, *rearings* e número de cruzamentos) significativas ($p < 0,05$) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto depois da administração aguda com as doses 1000 e 2000 mg kg⁻¹ pelas vias oral e intraperitoneal, quando comparados ao grupo controle.

Efeitos do Acetato de Carvacrila sobre a Coordenação Motora de camundongos

A **Tabela 4** apresenta os efeitos do acetato de carvacrila no teste da barra giratória que consiste em avaliar a coordenação motora, bem como possível efeito relaxante muscular. Não houveram alterações no tempo de permanência e no número de quedas na barra giratória após administração do acetato de carvacrila na dose de 1000 mg kg⁻¹, por ambas as vias e sexos, quando comparado com o controle. Entretanto, a dose de 2000 mg kg⁻¹ de acetato de carvacrila conseguiu reduzir significativamente o tempo de permanência e o número de quedas de camundongos machos e fêmeas tratados por via oral e intraperitoneal, em relação ao controle.

Efeitos do AC sobre os Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de camundongos

Alguns parâmetros tais como glicose, ureia, ácido úrico, alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 5**) entre os grupos tratados com acetato de carvacrila e o grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, podemos notar que os valores de creatinina foram maiores em machos que receberam a dose de 2000 mg kg⁻¹ por via oral, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Valores menores de triglicérides foram identificados em animais machos e fêmeas tratados por via oral e intraperitoneal na dose de 2000 mg kg⁻¹, bem como para fêmeas tratados por via oral e intraperitoneal na dose de 1000 mg kg⁻¹, em relação ao controle ($p < 0,05$). Quanto aos valores para colesterol total, os camundongos machos tratados com a dose de 1000 e 2000 mg kg⁻¹, por ambas as vias, apresentaram menores valores em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), plaquetas, leucócitos, neutrófilos e linfócitos não apresentaram diferença significativa, quando comparados ao controle. As fêmeas tratadas com 2000 mg kg⁻¹ de acetato de carvacrila, por via oral, apresentaram valores menores de concentração de hemoglobina corpuscular média, em relação ao controle.

Tabela 3. Efeitos do acetato de carvacrila sobre atividade locomotora de camundongos.

Parâmetros	Via Oral			Via Intraperitoneal		
	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)
Machos						
Groomings	6,60 ± 2,85	5,20 ± 1,24	6,20 ± 0,86	4,00 ± 1,41	8,20 ± 1,11	3,00 ± 0,00
Rearings	10,80 ± 1,65	17,40 ± 2,63	15,60 ± 4,70	12,00 ± 2,70	13,00 ± 2,28	15,00 ± 0,00
Cruzamentos	64,00 ± 2,88	55,20 ± 6,04	51,00 ± 7,87	50,80 ± 7,92	49,80 ± 6,55	60,00 ± 0,00
Fêmeas						
Groomings	5,80 ± 1,82	3,00 ± 0,44	5,00 ± 0,31	3,80 ± 1,62	7,60 ± 2,37	10,00 ± 0,00
Rearings	13,00 ± 1,78	9,00 ± 2,64	16,00 ± 2,28	11,40 ± 2,65	14,60 ± 3,40	13,00 ± 0,00
Cruzamentos	65,60 ± 8,48	67,60 ± 13,00	59,20 ± 6,71	50,80 ± 7,92	59,00 ± 9,85	70,00 ± 0,00

Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂). Os valores representam a média ± E.P.M. para o número de quadrados cruzados, *rearings* e *groomings* de 5 camundongos (por grupo) utilizados nos protocolos experimentais. As diferenças nos grupos experimentais foram determinados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste.

Tabela 4. Efeitos do acetato de carvacrila sobre a coordenação motora de camundongos.

Parâmetros	Via Oral			Via Intraperitoneal		
	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)
Machos						
Tempo de Permanência	177,6 ± 1,60	124,4 ± 22,91	89,4 ± 31,39 ^a	178,6 ± 0,60	178,2 ± 1,80	160,0 ± 0,00 ^a
Número de Quedas	0,60 ± 0,24	1,80 ± 0,74	2,20 ± 0,58 ^a	0,60 ± 0,24	0,20 ± 0,20	2,00 ± 0,00 ^a
Fêmeas						
Tempo de Permanência	177,2 ± 1,31	175,8 ± 1,90	131,0 ± 25,37 ^a	179,0 ± 0,63	177,0 ± 2,00	142,0 ± 0,00 ^a
Número de Quedas	0,80 ± 0,37	0,80 ± 0,37	2,00 ± 0,54 ^a	0,40 ± 0,24	0,40 ± 0,24	3,00 ± 0,00 ^a

Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂). Os valores representam a média ± E.P.M. para o tempo de permanência e número de quedas de 5 camundongos (por grupo) utilizados nos protocolos experimentais. As diferenças nos grupos experimentais foram determinados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^ap<0,05, quando comparado com o controle.

Tabela 5. Efeitos do acetato de carvacrila sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas após tratamento durante 14 dias por via oral e intraperitoneal.

Parâmetros	Via Oral			Via Intraperitoneal		
	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)
Machos						
Glicose (mg dL ⁻¹)	130,60 ± 15,45	134,30 ± 15,07	131,30 ± 15,82	117,80 ± 16,36	118,30 ± 4,70	120,7 ± 0,03
Uréia (mg dL ⁻¹)	60,85 ± 6,82	61,20 ± 12,88	61,80 ± 8,58	50,25 ± 1,25	51,24 ± 4,90	51,00 ± 0,04
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,47 ± 0,02	0,46 ± 0,04	0,45 ± 0,06 ^a	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,05
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	1,95 ± 0,35	1,94 ± 0,22	1,97 ± 0,52	1,98 ± 0,85	1,94 ± 0,26	1,99 ± 0,03
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	92,68 ± 6,22	93,00 ± 4,96	71,50 ± 10,78 ^a	96,75 ± 4,76	93,60 ± 6,82	75,00 ± 0,01 ^a
Colesterol Total (mg dL ⁻¹)	103,60 ± 7,85	75,01 ± 7,07 ^a	65,28 ± 4,09 ^a	94,23 ± 5,64	79,50 ± 4,17 ^a	61,00 ± 0,04 ^a
ALT (U mL ⁻¹)	49,40 ± 10,46	48,03 ± 7,04	49,29 ± 9,37	50,70 ± 3,48	50,20 ± 1,10	50,01 ± 0,11
AST (U mL ⁻¹)	166,10 ± 18,27	165,20 ± 3,61	166,3 ± 51,47	155,46 ± 4,92	154,03 ± 3,46	153,02 ± 0,21
Fêmeas						
Glicose (mg dL ⁻¹)	90,01 ± 38,81	89,33 ± 31,86	90,81 ± 31,91	90,67 ± 17,23	91,02 ± 1,55	92,00 ± 0,21
Uréia (mg dL ⁻¹)	31,01 ± 11,08	32,10 ± 8,40	31,03 ± 4,02	32,67 ± 5,45	31,01 ± 5,77	33,09 ± 0,02
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,43 ± 0,04	0,44 ± 0,12	0,42 ± 0,10	0,43 ± 0,03	0,44 ± 0,13	0,42 ± 0,23
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	3,05 ± 0,22	3,08 ± 0,57	3,13 ± 0,08	2,13 ± 0,03	2,16 ± 0,05	2,15 ± 0,02
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	106,00 ± 5,77	88,20 ± 30,01 ^a	72,3 ± 9,91 ^a	100,30 ± 8,99	68,26 ± 6,89 ^a	58,00 ± 0,05 ^a
Colesterol Total (mg dL ⁻¹)	70,80 ± 10,93	70,67 ± 6,98	69,52 ± 3,82	71,10 ± 2,64	70,64 ± 4,37	71,00 ± 0,03
ALT (U mL ⁻¹)	46,60 ± 5,06	47,00 ± 3,22	47,78 ± 8,77	46,50 ± 11,77	47,25 ± 4,15	45,00 ± 0,23
AST (U mL ⁻¹)	166,30 ± 5,77	166,60 ± 3,26	165,20 ± 20,91	166,50 ± 26,26	164,83 ± 11,34	165,00 ± 0,01

Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂). Aspartato Aminotrasaminase (AST), Alanina Aminotrasaminase (ALT). Os valores representam a média ± E.P.M. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^ap<0,05, quando comparado com o controle.

Tabela 6. Efeitos do acetato de carvacrila sobre os parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas após tratamento durante 14 dias por via oral e intraperitoneal.

Parâmetros	Via Oral			Via Intraperitoneal		
	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)	AC ₀ (0 mg kg ⁻¹)	AC ₁ (1000 mg kg ⁻¹)	AC ₂ (2000 mg kg ⁻¹)
Machos						
Hemácias (mm ³)	8,04 ± 0,82	8,07 ± 0,46	8,17 ± 0,59	8,13 ± 0,76	8,41 ± 0,57	8,45 ± 0,01
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	13,22 ± 0,44	13,58 ± 0,43	13,33 ± 1,03	13,13 ± 0,57	13,08 ± 1,39	13,60 ± 0,01
Hematócrito (%)	44,66 ± 0,81	45,22 ± 1,40	44,29 ± 3,07	46,95 ± 0,85	43,23 ± 2,21	47,40 ± 0,03
VCM (fL)	52,40 ± 0,80	52,20 ± 1,73	52,27 ± 1,79	53,20 ± 1,00	52,80 ± 2,32	52,00 ± 0,02
HCM (pg)	16,24 ± 0,86	16,84 ± 0,48	16,30 ± 0,48	15,75 ± 0,45	16,28 ± 2,02	16,60 ± 0,01
CHCM (g dL ⁻³)	27,64 ± 0,74	28,38 ± 0,69	27,78 ± 3,68	27,60 ± 0,30	27,23 ± 1,68	27,10 ± 0,04
Plaquetas (mm ³)	308,80 ± 46,92	303,80 ± 59,99	308,00 ± 58,89	305,50 ± 32,50	306,50 ± 43,40	307,0 ± 0,05
Leucócitos totais (mm ³)	8,04 ± 0,19	7,96 ± 0,43 ^a	8,07 ± 1,21	7,95 ± 0,95	7,90 ± 0,34	7,91 ± 0,03
Neutrófilos (%)	8,01 ± 2,07	8,04 ± 2,29	8,05 ± 1,37	8,02 ± 0,50	8,06 ± 2,53	8,01 ± 0,04
Linfócitos (%)	74,80 ± 3,30	74,80 ± 2,15	73,19 ± 2,21	73,50 ± 1,50	74,50 ± 4,40	73,00 ± 0,01
Fêmeas						
Hemácias (mm ³)	8,16 ± 0,78	8,06 ± 0,42	8,01 ± 0,59	8,19 ± 0,20	8,23 ± 0,23	8,08 ± 0,01
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	15,48 ± 0,99	14,79 ± 0,37	15,48 ± 0,35	15,98 ± 0,30	15,82 ± 0,54	15,71 ± 0,03
Hematócrito (%)	48,82 ± 2,63	45,14 ± 1,08	49,85 ± 3,67	48,23 ± 2,19	47,84 ± 1,41	48,72 ± 0,02
VCM (fL)	52,12 ± 1,93	52,36 ± 0,83	52,00 ± 1,87	53,05 ± 1,12	53,22 ± 0,44	52,03 ± 0,01
HCM (pg)	17,66 ± 0,63	16,12 ± 0,75	17,18 ± 0,32	17,53 ± 0,34	17,08 ± 0,62	17,01 ± 0,03
CHCM (g dL ⁻³)	29,00 ± 0,75	29,48 ± 1,62	28,58 ± 1,82 ^a	28,53 ± 0,33	29,40 ± 1,74	29,23 ± 0,02
Plaquetas (mm ³)	309,80 ± 57,82	307,60 ± 50,58	306,30 ± 39,46	309,00 ± 40,22	308,00 ± 30,22	309,01 ± 0,04
Leucócitos totais (mm ³)	6,79 ± 0,17	6,72 ± 0,53	6,76 ± 1,53	6,67 ± 0,49	6,72 ± 0,47	6,72 ± 0,05
Neutrófilos (%)	6,80 ± 1,02	6,73 ± 2,42	6,75 ± 1,03	6,78 ± 1,47	6,49 ± 0,66	6,52 ± 0,03
Linfócitos (%)	72,80 ± 1,31	74,80 ± 2,37	72,25 ± 3,09	76,50 ± 1,55	76,20 ± 1,53	75,01 ± 0,01

Veículo (AC₀), 1000 mg kg⁻¹ (AC₁), 2000 mg kg⁻¹ (AC₂). Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Os valores representam a média ± E.P.M. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^ap<0,05, quando comparado com o controle.

DISCUSSÃO

Na presente investigação, as doses até 2000 mg kg⁻¹ não apresentaram qualquer mortalidade ou quaisquer sinais de toxicidade após administração oral de uma dose única. Esta dose pode ser considerada como o nível de efeito não observado (NOAEL) (ALEXEEFF et al., 2002) para o acetato de carvacrila. A DL₅₀ em camundongos tratados por via oral é superior a 2000 mg kg⁻¹, resultado inserido na categoria 5 de substâncias com toxicidade aguda relativamente baixa do Sistema Globalmente Harmonizado (GHS, 2007). Além disso, as diretrizes de toxicidade aguda da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico nos desencoraja à ensaios em animais na categoria 5 (2000-5.000/mg kg⁻¹) (OECD, 2001). Apesar disso, a mortalidade e sinais de toxicidade como hipoatividade e astenia ocorreram em camundongos que receberam 2000 mg kg⁻¹ de acetato de carvacrila por via intraperitoneal (DL₅₀ = 1.542,21 mg kg⁻¹). A substância em estudo apresentou significativa segurança pré-clínica, quando comparamos com o seu precursor carvacrol (DL₅₀ = 73.30 mg kg⁻¹) (ANDERSEN, 2006), e com outros monoterpenos administrados intraperitonealmente em camundongos, incluindo *m*-cresol (DL₅₀ = 450 mg kg⁻¹) (STERNITZKE et al., 1992), *o*-cresol (DL₅₀ = 350 mg kg⁻¹) (STERNITZKE et al., 1992), *p*-cresol (DL₅₀ = 150 mg kg⁻¹) (STERNITZKE et al., 1992), timol (DL₅₀ = 110 mg kg⁻¹) (VIANA et al., 1981). O estudo de toxicidade aguda indicou que o tratamento com acetato de carvacrila por via oral, nas doses selecionadas, foi bem tolerado em todos os animais em teste, sugerindo sua segurança para posteriores investigações (BONIFACE et al., 2013).

É sabido que diversos produtos químicos podem alterar o funcionamento ou até lesar vários tecidos e órgãos. O cérebro, órgão ricamente vascularizado, possui subdivisões incluindo o hipotálamo, região responsável pelo controle de funções essenciais do organismo como fome e sede. Em adição, alterações no padrão de alimentação podem ser observadas em alterações no Sistema Nervoso Autônomo (GREAVES, 2007). Assim, a análise da evolução ponderal de camundongos tratados com candidatos à fármacos como o acetato de carvacrila servem de parâmetro para avaliação toxicológica.

A avaliação das alterações orgânicas induzidas por novas drogas em animais representa um ponto fundamental para análise de segurança, antes que sejam realizados testes pela primeira vez em humanos. O coração, por exemplo, pode se adaptar por uma resposta hipertrófica à uma variedade de estímulos mecânicos, hemodinâmicos, hormonais ou patológicos. Por sua vez, os pulmões podem sofrer um aumento de peso induzido por extravasamento de fluido, como edema, em resposta à agentes químicos. O baço possui duas

funções principais, a de filtração e resposta imunológica. Assim, os efeitos de drogas no sistema linfóide e hematopoiético podem se manifestar por alterações morfológicas no baço. O fígado representa o principal órgão de metabolismo de xenobióticos e, dessa forma, seu aumento de peso pode ser influenciado por muitas razões, incluindo acúmulo de lipídeos, glicogênio, outras substâncias ou resultar de danos celulares, congestão e hipertrofia hepatocelular. Não menos importante, os rins representam o principal órgão de eliminação de compostos. Muitos agentes terapêuticos e de diagnósticos utilizados em seres humanos possuem o potencial para causar dano renal. Dessa forma, existem três tipos principais de insuficiência renal induzida por drogas: uma reação alérgica independente da dose levando à inflamação, dano tubular agudo dependente da dose devido a uma agressão tóxica direta e nefropatia obstrutiva em que drogas ou metabólitos cristalizam na parte distal do néfron, levando à obstrução e insuficiência renal. De fato, em estudos pré-clínicos de toxicidade, alterações renais são particularmente susceptíveis de ocorrer por causa das altas doses e do fato de que os rins eliminam muitas drogas e seus metabólitos (GROSSMAN, 1980; BARTLETT; REMMERS, 1971; ROSSE, 1987; VEERMAN; EWIJK, 1975; GREAVES, 2007).

Assim como em seres humanos, os animais submetidos a situações de estresse, seja ambiental ou por compostos químicos, apresentam comportamento retraído, que resulta de um efeito ansiogênico. Dessa forma, o teste campo aberto descrito primariamente por Hall (1936), tem sido largamente usado para avaliar os efeitos de fármacos potenciais sobre o comportamento de roedores (HEREDIA et al., 2014; KURHE et al., 2014; MORENO et al., 2014).

Nesse contexto, o aumento dos parâmetros *rearing*, *grooming* e números de cruzamentos podem ser observados em animais que receberam drogas capazes de produzir ansiólise. No entanto, a diminuição destas variáveis pode estar associada a efeitos ansiogênicos. O efeito de diversas drogas tem sido investigado por meio do teste no campo aberto, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (benzodiazepinas, ligantes de serotonina), estimulantes (anfetamina e cocaína), sedativos (neurolépticos) ou indutoras de prostração (drogas anticonvulsivantes). Porém, o acetato de carvacrila nas doses utilizadas não interferiu na atividade psicomotora (PRUT; BELZUNG, 2003; HSIAO et al., 2012).

Em nosso estudo, o efeito relaxante muscular pode ser evidenciado apenas na dose mais elevada. Neste teste, a diferença no tempo de permanência e número de quedas entre grupos tratados com acetato de carvacrila e veículo foi tomado como índice de relaxamento muscular. Semelhante ao teste campo aberto, o teste *Rota rod* foi introduzido como ensaio

para avaliar a neurotoxicidade, capaz de prever disfunção motora produzida por drogas, bem como determinar possíveis alterações na capacidade de coordenação motora do animal. De fato, diversos agentes farmacológicos podem causar disfunção na coordenação motora e relaxamento muscular, incluindo drogas neurolépticas, ansiolíticas, sedativas e hipnóticas, na qual reduzem a atividade do Sistema Nervoso Central. No entanto, é razoável afirmar que compostos neurotóxicos podem produzir alterações na coordenação motora neste modelo animal. Dessa forma, o acetato de carvacrila na dose de 1000 mg kg^{-1} não mostrou alterações psicomotoras, sugerindo possível segurança neurológica (NAGARAJA et al., 2012; LIU et al., 2012).

Em geral, os nossos resultados dos exames bioquímicos mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com acetato de carvacrila e veículo. No entanto, quando observadas diferenças significativas não houve associação com possível condição patológica, tendo visto que os resultados evidenciaram uma redução dos parâmetros em relação ao grupo veículo. Não foram identificadas alterações nos níveis de transaminases hepáticas (ALT e AST) e ureia e creatinina, que são indicadores de função hepática e renal (SILVA et al., 2011). Assim, é razoável sugerir que o acetato de carvacrila, nas doses administradas, não induziu danos ao fígado e rins.

Os resultados para os níveis de glicose e ácido úrico não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que o composto em estudo não foi capaz de causar desordem metabólica. Apesar dos níveis reduzidos de colesterol total e triglicérides, uma investigação farmacológica sobre o possível efeito hipolipemiante é necessária, haja visto que as doses foram utilizadas para identificação de parâmetros tóxicos.

O sistema hematopoiético é muito sensível aos compostos tóxicos e serve como um relevante indicador do estado fisiológico e patológico para animais e seres humanos (ADENEYE et al., 2006; YA'U et al., 2013).

Dessa forma, a avaliação dos parâmetros hematológicos podem ser usados para determinar a extensão dos efeitos deletérios de compostos químicos sobre os constituintes do sangue de um animal (ATTANAYAKE et al., 2013). Embora, as fêmeas tratadas com 2000 mg kg^{-1} de acetato de carvacrila por via oral tenham apresentado valor reduzido para o parâmetro CHCM, não é possível afirmar desordem no sistema hematopoiético, considerando que os resultados para os demais índices hematimétricos (VCM e HCM) não alteraram significativamente em relação ao grupo controle. O não significativo aumento ou diminuição dos valores hematológicos é uma indicação de que o acetato de carvacrila não afeta o sistema

hematopoiético e leucopoiético quando administrado oral e intraperitonealmente em machos e fêmeas nas doses utilizadas neste estudo.

Embora a exposição à drogas, por mecanismos relacionados à características químicas intrínsecas da molécula, possa potencialmente levar a uma maior incidência de riscos à efeitos tóxicos de drogas, existem outros mecanismos, entre os quais o dimorfismo de gêneros que pode também potencialmente influenciar. Dessa forma, fatores incluindo percentagem de gordura maior em fêmeas, volume plasmático e fluxo de sangue em órgãos maior em machos, bem como ações dos hormônios sexuais podem influenciar na variabilidade toxicológica de drogas (ARBUCKLE, 2006; FRANCONI et al., 2007; NICOLSON et al., 2010). Entretanto, em nosso estudo, não foram identificadas variações na toxicidade do acetato de carvacrila em função do sexo.

Vale destacar que a via de administração pode ter sido o fator determinante para elucidação da DL₅₀ de apenas uma das vias. Ao considerar o efeito de primeira passagem, sofrido pelo acetato de carvacrila quando administrado por via oral, pode ter ocorrido inativação de parte da droga antes de chegar à circulação sistêmica, fato que colabora para não determinação da DL₅₀ por esta via. Em contrapartida, os animais que receberam o AC via intraperitoneal, podem ter recebido maior quantidade da droga na circulação sistêmica, antes de sofrer modificação hepática, e por isso, maior toxicidade do AC foi identificada por esta via de administração (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009).

CONCLUSÃO

A toxicidade aguda (DL₅₀) calculada da administração intraperitoneal em camundongos foi 1542,21 mg kg⁻¹. Diante da análise conjunta dos dados é possível sugerir que a administração oral e intraperitoneal aguda do acetato de carvacrila não produziu efeitos tóxicos significativos em camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Entretanto são necessários estudos histológicos para melhor confirmação dos dados. Além disso, o acetato de carvacrila representa um composto inovador e promissor à seguir as próximas etapas da pesquisa clínica justificando a necessidade da realização de novos ensaios de forma aguda com doses repetidas, subcrônica e crônica.

REFERÊNCIAS

ADENEYE, A.A.; AJAGBONNA, O.P.; ADELEKE, T.I.; BELLO, S.O. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 3, p. 374-379, 2006.

AKPANABIATU, M.I.; EKPO, N.D.; UFOT, U.F.; UDOH, N.M.; AKPAN, E.J.; ETUK, E.U. Acute toxicity, biochemical and haematological study of *Aframomum melegueta* seed oil in male Wistar albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, *in press*, 2013.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.

ALEXEEFF, G.V.; BROADWIN, R.; LIAW, J.; DAWSON, S.V. Characterization of the LOAEL-to-NOAEL uncertainty factor for mild adverse effects from acute inhalation exposures. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 96–105, 2002.

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

ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International Journal of Toxicology**, v. 25, p. 29-127, 2006.

ARBUCKLE, T.E. Are there sex and gender differences in acute exposure to chemicals in the same setting? **Environmental Research**, v. 101, n. 2, p. 195-204, 2006.

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

ATTANAYAKE, A.P.; JAYATILAKA, K.A.P.W.; PATHIRANA, C.; MUDDUWA, L.K.B. Efficacy and toxicological evaluation of *Coccinia grandis* (Cucurbitaceae) extract in male Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 6, p. 460-466, 2013.

BASS, A.S.; CARTWRIGHT, M.E.; MAHON, C.; MORRISON, R.; SNYDER, R.; MCNAMARA, P.; BRADLEY, P.; ZHOU, Y.Y.; HUNTER, J. Exploratory drug safety: A discovery strategy to reduce attrition in development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 60, n. 1, p. 69-78, 2009.

BARTLETT JR, D.; REMMERS, J.E. Effects of high altitude exposure on the lungs of young rats. **Respiration Physiology**, v. 13, n. 1, p. 116-125, 1971.

BONIFACE, P.K.; SINGH, M.; MAURYA, A.K.; PAL, A. Acute and sub-chronic toxicity of HPLC fingerprinted extract of *Conyza sumatrensis* (Retz.) E.H. Walker in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 833-837, 2013.

DENNY, K.H.; STEWART, C.W. Acute, Sub-Acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In: FAQI, A.S. (Ed.). **A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development**: Academic Press, 2013. p. 87-105.

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

1957.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anesthesia**. New York: Academic Press, 1996.

FRANCONI, F.; BRUNELLESCHI, S.; STEARDO, L.; CUOMO, V. Gender differences in drug responses. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 2, p. 81-95, 2007.

GHS (The Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals). Health and Environmental Hazards Classification Criteria for Substances, 2th Ed. **United Nations Economics Commission for Europe**, 2007. Disponível em: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/GHS_presentations/English/health_env_sub_e.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2013.

GREAVES, P. **Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (3th Ed)**. New York: Academic Press, 2007.

GROSSMAN, W. Cardiac hypertrophy: Useful adaptation or pathologic process? **The American Journal of Medicine**, v. 69, n. 4, p. 576-584, 1980.

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

HEREDIA, L.; TORRENTE, M.; COLOMINA, M.T.; DOMINGO, J.L. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 2, p. 108-114, 2014.

HSIAO, Y.-T.; YI, P.-L.; LI, C.-L.; CHANG, F.C. Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 373-384, 2012.

HUO, M.; CUI, X.; XUE, J.; CHI, G.; GAO, R.; DENG, X.; GUAN, S.; WEI, J.; SOROMOU, L.W.; FENG, H.; WANG, D. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. **Journal of Surgical Research**, v. 180, p. e47-e54, 2013.

KOHN, D.F.; WIXSON, S.K.; WHITE, W.J.; BENSON, G.J. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. New York: Academic Press, 1997.

KURHE, Y.; RADHAKRISHNAN, M.; GUPTA, D.; VADOSS, T. QCM-4 a novel 5-HT₃ antagonist attenuates the behavioral and biochemical alterations on chronic unpredictable mild stress model of depression in *Swiss* albino mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 122-132, 2014.

LIMA, L.M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

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

LIU, Z.; GAO, W.; MAN, S.; WANG, J.; LI, N.; YIN, S.; WA, S.; LIU, C. Pharmacological evaluation of sedative–hypnotic activity and gastro-intestinal toxicity of *Rhizoma Paridis* saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 67-72, 2012.

MALONE, M.H. **Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation**. In: WAGNER, H.; WOLF, P. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 23-53.

MARQUES, T.H.C.; MARQUES, M.L.B.G.C.B.; LIMA, D.S.; SIQUEIRA, H.D.S.; NOGUEIRA NETO, J.D.; BRANCO, M.S.B.G.C.; SOUZA, A.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of the neuropharmacological properties of nerol in mice. **World Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 32-38, 2013.

MORENO, L.C.G.E.A.I.; OLIVEIRA, G.Z.S.; CAVALCANTI, I.M.F.; MAGALHÃES, N.S.S.; ROLIM, H.M.L.; FREITAS, R.M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 64-68, 2014.

NAGARAJA, T.S.; MAHMOOD, R.; KRISHNA, V.; THIPPESWAMY, B.S.; VEERAPUS, V.P. Evaluation of Anxiolytic effect of *Erythrina mysorensis* Gamb. in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 489, 2012.

NICOLSON, T.J.; MELLOR, H.R.; ROBERTS, R.R.A. Gender differences in drug toxicity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 108-114, 2010.

OECD (The Organisation of Economic Cooperation Development), 2001. **The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 423 Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. OECD, Paris, p. 1–14.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; SILVA, O.A.; ALMEIDA, A.A.C.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3-33, 2003.

ROSSE, W.F. The spleen as a filter. **The New England journal of medicine**, v. 317, n. 11, p. 704-706, 1987.

SILVA, M.G.B.; ARAGÃO, T.P.; VASCONCELOS, C.F.B.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; COSTA, I.M.A.; COSTA-SILVA, J.H.; WANDERLEY, A.G.; LAFAYATTE, S.S.L. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 341-346, 2011.

SOUZA, F.V.M.; ROCHA, M.B.; SOUZA, D.P.; MARÇAL, R.M. (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. **Fitoterapia**, v. 85, p. 20-24, 2013.

STERNITZKE, A.; LEGRUM, W.; NETTER, K. Effects of phenolic smoke condensates and their components on hepatic drug metabolizing systems. **Food and chemical toxicology**, v. 30, n. 9, p. 771-781, 1992.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo dos Fármacos. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN JR, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2^a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan. 2009. cap. 4.

VEERMAN, A.; EWIKK, W.V. White pulp compartments in the spleen of rats and mice. **Cell and Tissue Research**, v. 156, n. 4, p. 417-441, 1975.

VIANA, G.S.B.; MATOS, F.F.; ARAUJO, W.L.; MATOSE, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A. Essential oil of *Lippia grata*: pharmacological effects and main constituents. **Pharmaceutical Biology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 1981.

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

YA'U, J.; CHINDO, B.A.; YARO, A.H.; OKHALE, S.E.; ANUKA, J.A.; HUSSAINI, I.M. Safety assessment of the standardized extract of *Carissa edulis* root bark in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 653-661, 2013.

**CAPÍTULO III: Perfil antioxidante e genotóxico de um derivado semissintético do
carvacrol**

(Artigo submetido à Toxicology Letters)

PERFIL ANTIOXIDANTE E GENOTÓXICO DE UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DO CARVACROL

Francisco Rodrigo de Asevedo Mendes de Oliveira¹, George Laylson da Silva Oliveira¹, Marcus Vinícius de Oliveira Barros de Alencar¹, Ana Amélia de Carvalho melo Cavalcante¹, Damião Pergentino de Sousa², Rivelilson Mendes de Freitas¹

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

²Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, CEP 58.051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

RESUMO

O acetato de carvacrila (AC) é um éster monoterpênico semissintético derivado a partir do carvacrol, que tem apresentado atividades farmacológicas incluindo anti-inflamatória, antinociceptiva e ansiolítica. O presente trabalho faz parte de uma pesquisa que visa estudar a segurança e eficácia do AC. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* e o potencial genotóxico *in vivo* do AC. Em camundongos *Swiss* (25-30 g) de ambos os sexos foram administrado por via oral e intraperitoneal o AC nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹ e a genotoxicidade foi avaliada por meio do teste cometa em diferentes momentos (24 e 72 h) realizado em células do sangue periférico e hipocampo, para identificação de um possível reparo do material genético. A capacidade antioxidante do AC foi avaliada pela eliminação dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS^{•+}) e pelo potencial redutor. O resultado obtido revelou que o AC nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹ pode induzir danos ao DNA em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas pelo aumento significativo no índice de dano (ID) e frequência de dano (FD), em relação ao grupo veículo. Entretanto, houve redução significativa do ID e FD de machos (2000 mg kg⁻¹) e fêmeas (1000 e 2000 mg kg⁻¹), após 72h do tratamento. Os resultados antioxidantes demonstraram que o AC nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹ tem a capacidade de atuar na remoção dos radicais DPPH[•] (CE₅₀ = 6,27 µg mL⁻¹) e ABTS^{•+} (CE₅₀ = 5,46 µg mL⁻¹), e potencial redutor (CE₅₀ = 3,2 µg mL⁻¹). O AC possui atividade antioxidante *in vitro* e células do sangue

periférico de camundongos tratados de forma aguda com AC demonstraram capacidade em reparar danos genéticos.

Palavras-chave: Acetato de carvacrila; Atividade antioxidante; Ensaio cometa.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido usados na medicina tradicional a milhares de anos e por isso são fontes promissoras para as descobertas de novos potenciais agentes terapêuticos. As substâncias do metabolismo secundário apresentam inúmeros benefícios para a saúde e por isso são de grande interesse para o desenvolvimento de muitas pesquisas científicas. Uma dessas importantes substâncias são os óleos essenciais, que são produtos naturais derivados de plantas aromáticas e que têm uma ampla gama de utilizações em práticas etnofarmacológicas, cosmética e em indústrias farmacêuticas (BAKKALI et al., 2008; LAWAL; OGUNWANDE, 2013).

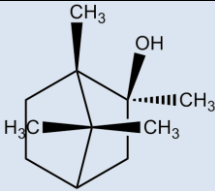
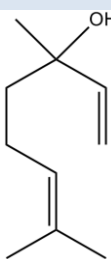
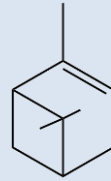
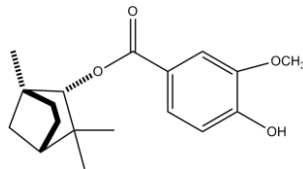
Nesse contexto, as composições químicas dos óleos essenciais são bem conhecidas e incluem terpenos como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. Por possuir uma grande variedade de estruturas e constituir 90% dos óleos essenciais, os componentes principais são monoterpenos fenólicos como timol e carvacrol que são responsáveis por atividades farmacológicas como antimicrobiana (BEN ARFA et al., 2006), anti-inflamatória (LIMA et al., 2013), antioxidante (ÜNDEĞER et al., 2009), anticarcinogênico (ARUNASREE, 2010), neuroprotetor (YU et al., 2012), antidepressivo (MELO et al., 2011) e ansiolítico (MELO et al., 2010).

Nessa perspectiva, considerando as propriedades farmacológicas do carvacrol, Mastelić e colaboradores (2008) relataram a síntese e atividades biológicas de novos compostos a partir do carvacrol, sugerindo que este composto pode ser um protótipo natural para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Mais recentemente, Pires e colaboradores (2013) publicaram um estudo destacando o potencial do acetato de carvacrila, um derivado acetilado do carvacrol, como uma possível droga alternativa para o tratamento de transtornos de ansiedade.

Dessa forma, os monoterpenos podem ser conhecidos como uma classe de compostos naturais com um largo espectro de atividades biológicas e conseqüentemente, nos últimos anos tem recebido uma grande atenção com relação aos potenciais riscos para a saúde (**Tabela 1**).

Sendo assim, o presente estudo é parte de uma de pesquisa de toxicidade pré-clínica que visa estudar a segurança e eficácia do acetato de carvacrila (um derivado do carvacrol), sendo que para isso, o potencial genotóxico desse novo composto será avaliado. Além disso, o potencial antioxidante contra os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} e potencial redutor também será investigado.

Tabela 1. Efeitos genotóxicos de monoterpenos.

Compostos	Efeitos Tóxicos	Protocolo Experimental	Referências
 <p>2-metilisoborneol</p>	Lesões ao DNA na concentração de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ensaio Cometa <i>in vitro</i>	Burgos e colaboradores (2014)
 <p>(-)-linalol</p>	Incapaz de proteger ou danificar o DNA nas doses de 10, 50, 100 e 200 mg kg^{-1} .	Ensaio Cometa <i>in vivo</i>	Coelho e colaboradores (2013)
 <p>α-pineno</p>	Lesões ao DNA de forma dependente da concentração (25, 30 e 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	Ensaio Cometa <i>in vitro</i>	Catanzaro e colaboradores (2012)
 <p>estilosina</p>	Lesões ao DNA na concentração de 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ensaio Cometa <i>in vitro</i>	Rassouli e colaboradores (2011)

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila pelo método DPPH^{*}

Para o método DPPH^{*}, foi utilizada a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2005) com algumas modificações. Resumidamente, uma mistura reacional contendo 0,3 mL da solução de acetato de carvacrila (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com 2,7 mL da solução estoque de DPPH^{*} (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente na ausência de luz (no escuro) durante 30 minutos. A avaliação antioxidante foi realizada em

triplicata e os valores das absorvâncias foram expressos como porcentagem de inibição da absorvância da solução de DPPH[•] pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}^{\bullet} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH[•] e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorvância da mistura reacional contendo o radical DPPH[•] e as concentrações do acetato de carvacrila. A concentração efetiva (CE_{50}) do acetato de carvacrila necessária para reduzir a absorvância do radical DPPH[•] em 50% a 517 nm foi determinada. O mesmo procedimento foi utilizada com o controle positivo Trolox (140 μg) (**Ilustração 1**).

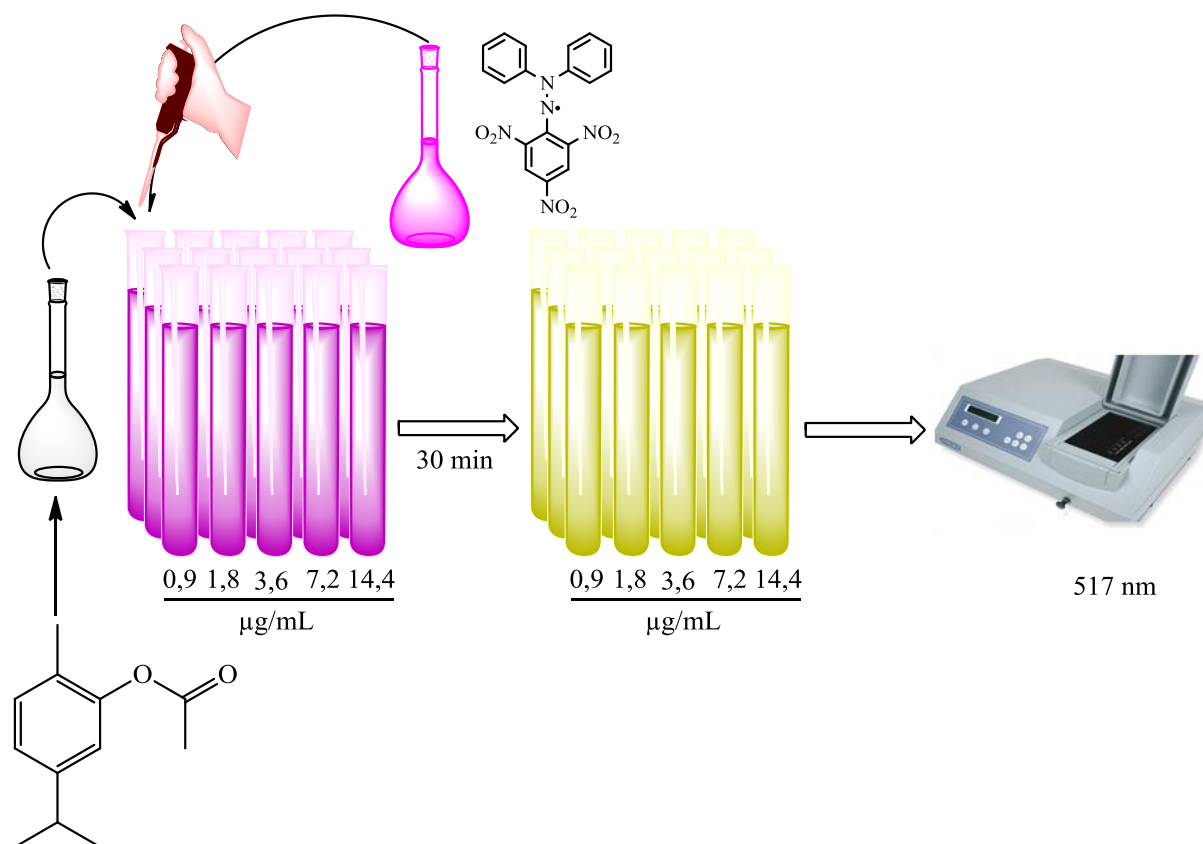


Ilustração 1. Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila pelo método DPPH[•].

Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila pelo método ABTS^{•+}

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS^{•+}, foi utilizada a metodologia descrita por Re e colaboradores (1999), com modificações. Inicialmente formou-se o cátion radical ABTS^{•+}, a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS^{•+} com 88 μL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até obter uma solução com absorvância de 0,70 ($\pm 0,05$), a

734 nm. Em ambiente escuro e em temperatura ambiente foi transferida uma alíquota de 40 μL das concentrações do acetato de carvacrila (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para tubos de ensaio com 1960 μL do radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Foi realizada a leitura da absorvância a temperatura ambiente no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da absorvância da solução de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição do radical } \text{ABTS}^{+\cdot} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorvância da mistura contendo o radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e as concentrações da acetato do carvacrila. A concentração efetiva (CE_{50}) do acetato de carvacrila necessária para reduzir a absorvância do radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ em 50% a 734 nm foi determinada. O mesmo procedimento foi utilizada com o controle positivo Trolox (140 μg) (**Ilustração 2**).

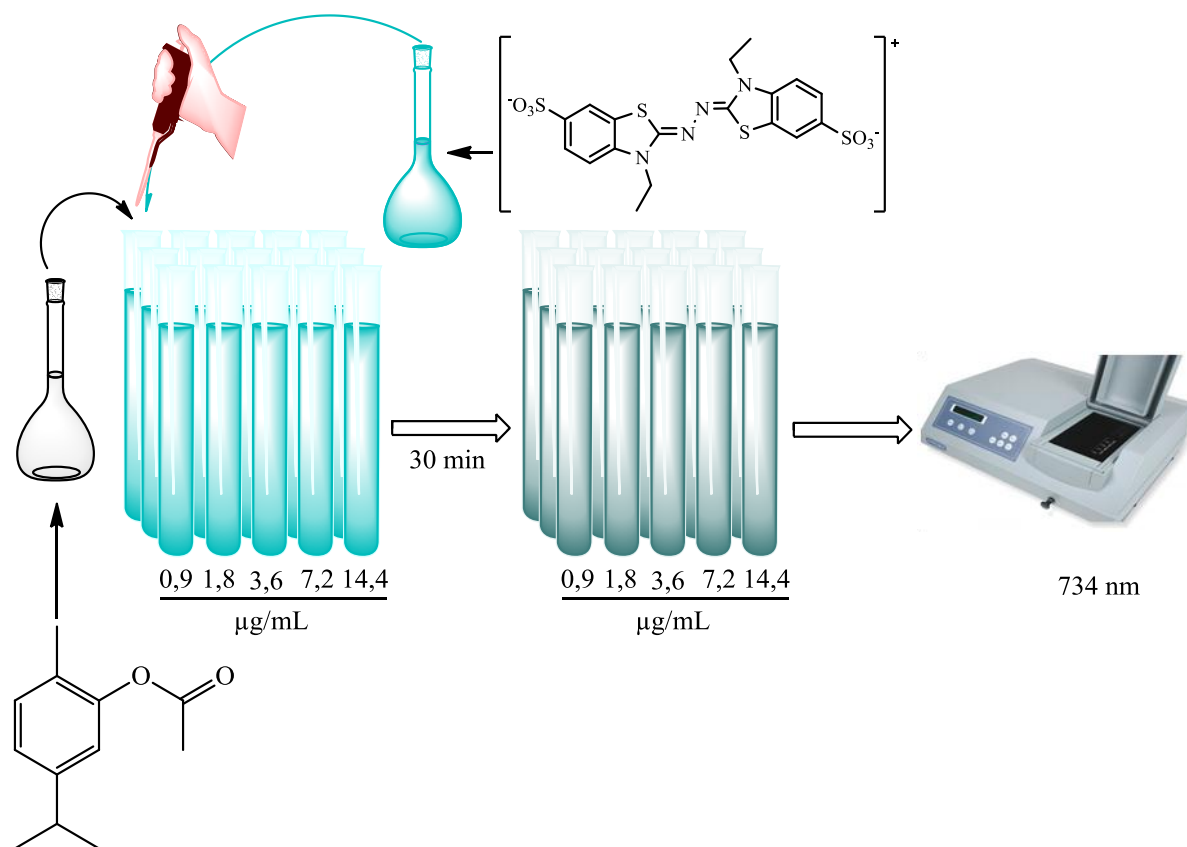


Ilustração 2. Avaliação da capacidade antioxidante do acetato de carvacrila pelo método $\text{ABTS}^{+\cdot}$.

Avaliação do potencial redutor do acetato de carvacrila

Para a determinação do poder redutor do acetato de carvacrila pela redução direta do ferricianeto de potássio (F^{3+}) para ferrocianeto de potássio (F^{2+}), foi utilizada a metodologia

descrita por Singhal e colaboradores (2011), com modificações. Inicialmente, foi preparado uma mistura reacional contendo várias concentrações do acetato de carvacrila (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1 mL de ferricianeto de potássio 1% e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6). O controle negativo continha todos os reagentes, exceto as concentrações do acetato de carvacrila.

A mistura reacional foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, seguido pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10% para ser centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante da mistura reacional foi misturado com 1 ml de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%. Finalmente, a absorbância foi medida a 700 nm contra o branco que continham apenas tampão de fosfato e o aumento da absorbância demonstra o poder redutor do acetato de carvacrila. A concentração do acetato de carvacrila que proporciona um aumento de 0,5 de absorbância (CE_{50}) foi calculada de acordo com concentração de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O mesmo procedimento experimental foi utilizada com o controle positivo Trolox (140 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (**Ilustração 3**).

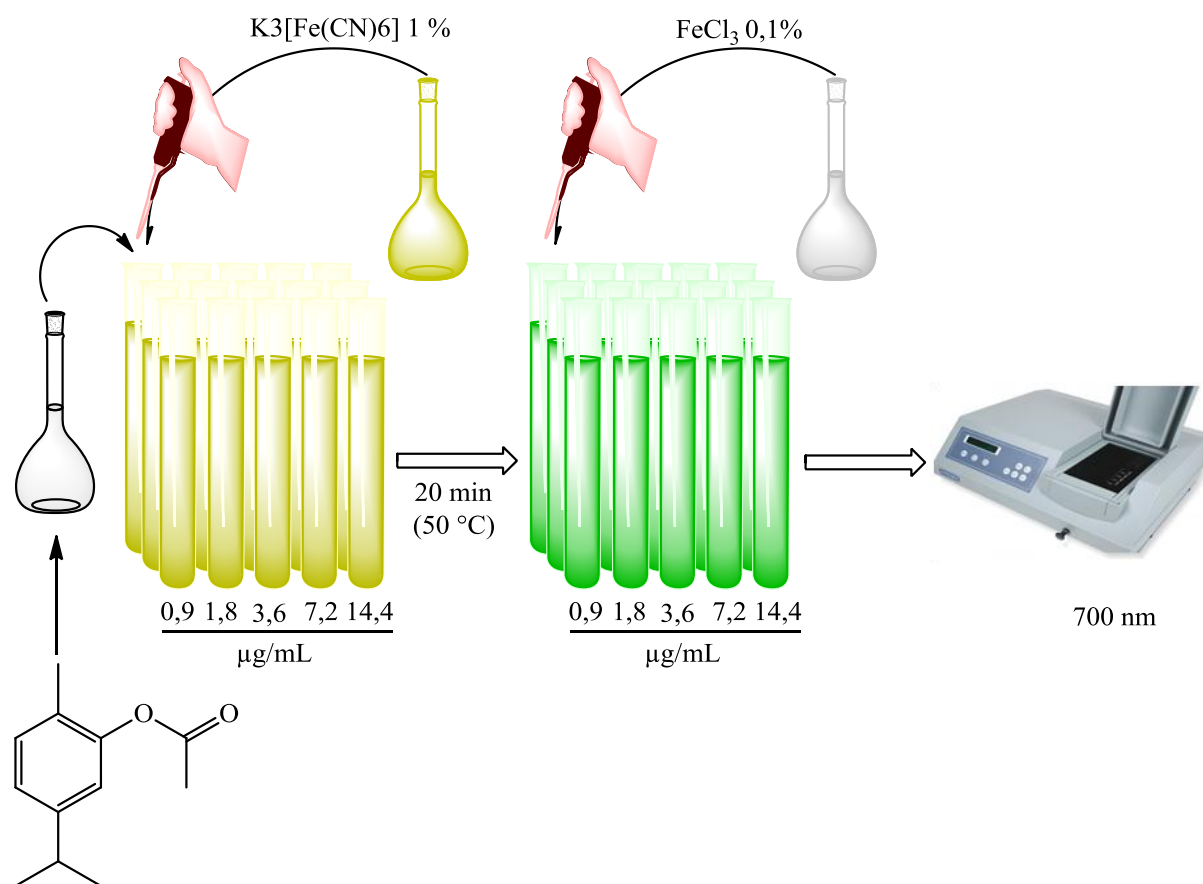


Ilustração 3. Avaliação do potencial redutor do acetato de carvacrila.

Avaliação Genotóxica pelo Ensaio Cometa

Drogas e dosagens

O AC foi preparado em nosso laboratório como previamente descrito (PIRES et al., 2013). O AC foi dissolvido em 0,05% de Tween 80 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, EUA), dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral e intraperitoneal nas doses de 1000 e 2000 mg kg⁻¹. Os controles receberam veículo com o mesmo volume (10 ml/kg) e através da mesma via que os outros grupos tratados.

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos pesando entre 25-30 g. Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada (26 ± 1 °C) e um ciclo de 12 h claro/escuro. Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Todos os testes foram realizados em salas silenciosas nas mesmas condições referidas acima e isoladas de ruídos externos. Todos os grupos foram tratados de forma aguda com doses únicas por um período de 14 dias.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Washington DC, 1985. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI # 013/2011).

Protocolo experimental

Os ensaios foram realizados 24 e 72 horas após a administração, para células do sangue periférico. No 14º dia de experimento, foi realizada dissecação cerebral e retirado o hipocampo para avaliação do dano genotóxico.

Para tanto, foram pipetados 5 µL de células sanguíneas (sangue total com heparina) que foram acrescentados a 95 µL de agarose *low melting* e colocados sobre lâminas embebidas em gel de agarose e cobertos com lamínulas. Para o ensaio com o hipocampo, os animais foram eutanasiados por decapitação, os encéfalos rapidamente retirados e os hipocampos dissecados para preparação dos homogenatos a 10% em solução tampão fosfato (pH 7,4). Foram pipetados 5 µL dos homogenatos que foram acrescentados a 95 µL de agarose *low melting* e colocados sobre lâminas embebidas em gel de agarose e cobertos com lamínulas.

As lâminas foram colocadas brevemente na geladeira para evitar que o material seja perdido ao remover a lamínula. Foram feitas 2 lâminas por animal e expostas à solução de lise. Após 2 horas na solução de lise, as lâminas foram imersas em um tampão de pH alcalino (>13), durante 25 minutos. Este processo permitiu o desenovelamento das cadeias de DNA através rompimento das estruturas, secundária e terciária, presentes no núcleo celular. Após o desenovelamento, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica em cuba de eletroforese, que induziu a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica, durante 25 minutos, a 25 volts e a 300 mA. Todas essas etapas foram realizadas sob luz indireta, fraca para evitar danos adicionais ao DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5, fixadas, lavadas com água destilada e secas *over night*. Após hidratá-las durante 5 minutos em água destilada, foram coradas com solução de prata como descrito por Nadin e colaboradores (2001) (**Ilustração 4**).

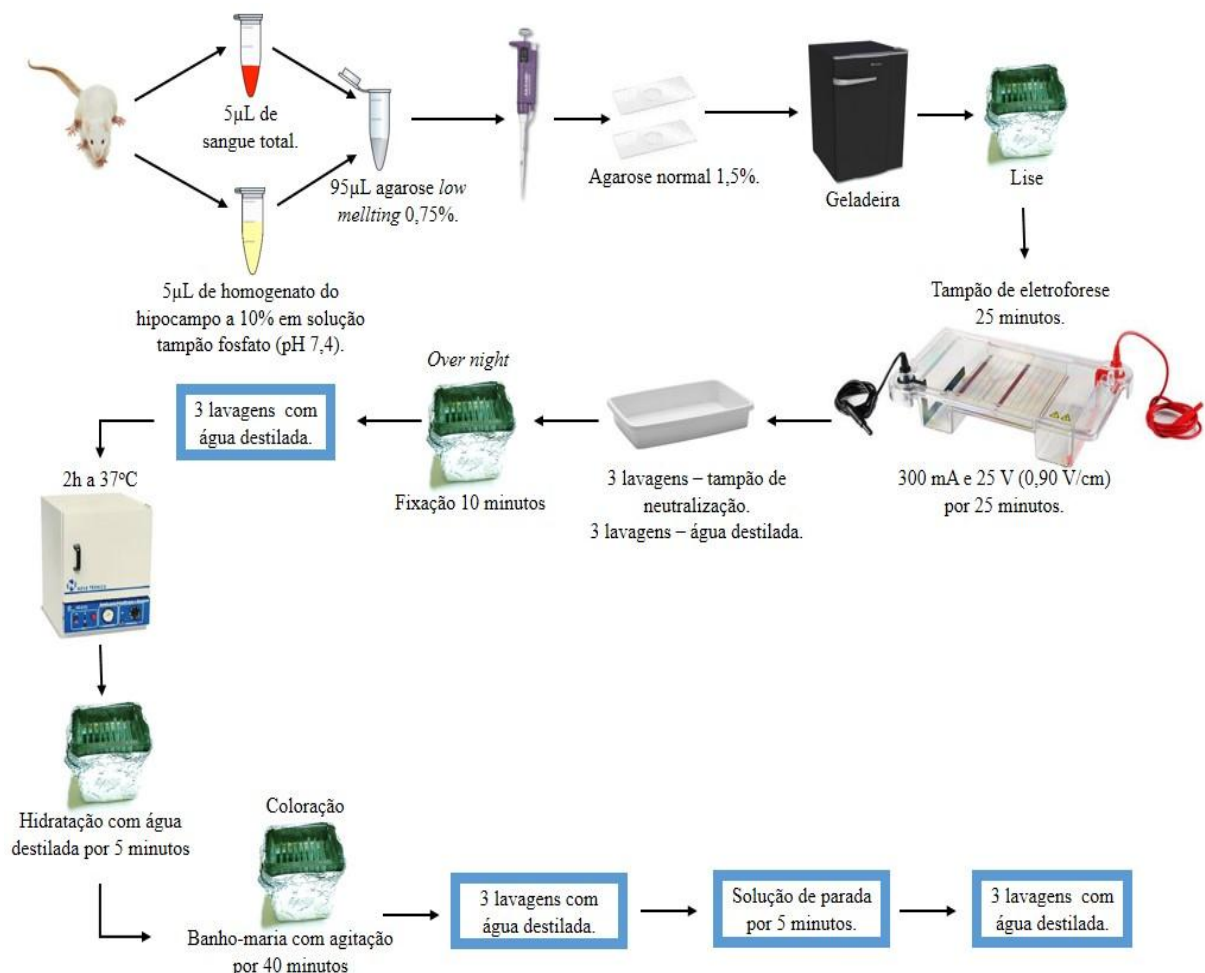


Ilustração 4. Protocolo experimental para o ensaio cometa.

Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação do tipo da cauda, sendo estas classificadas de zero a quatro (50 células por lâmina em duplicata). Os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem dano), já nas células lesadas, o DNA migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa: classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo) (**Ilustração 5**).

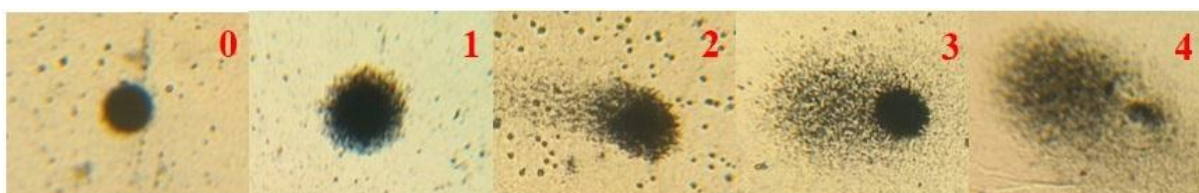


Ilustração 5. Tipos de danos celulares em Ensaio Cometa (0) sem dano, (1) dano do tipo 1, (2) dano do tipo 2, (3) dano do tipo 3, (4) dano do tipo 4.

A FD foi calculada de modo arbitrário subtraindo-se de 100 as células com dano zero, baseada no número de células com dano versus aquelas sem danos.

RESULTADOS

Capacidade antioxidante pelo método DPPH^{*}

Para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do acetato de carvacrila, a utilização do radical DPPH^{*} e foi considerada como um procedimento simples e rápido. Os resultados correspondentes a capacidade antioxidante do acetato de carvacrila em diferentes concentrações são mostrados na ilustração 6. Os valores da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH^{*} nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram respectivamente de $27,74 \pm 0,29$, $32,79 \pm 3,03$, $39,70 \pm 3,16$, $46,48 \pm 2,13$ e $53,42 \pm 0,58\%$, na qual reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração da solução de radical DPPH^{*} (sistema). O Trolox ($140 \mu\text{g mL}^{-1}$) também reduziu o radical DPPH^{*}, apresentando $88,37 \pm 0,5$ de capacidade antioxidante. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante, a CE_{50} do acetato de carvacrila foi de $6,27 \mu\text{g mL}^{-1}$.

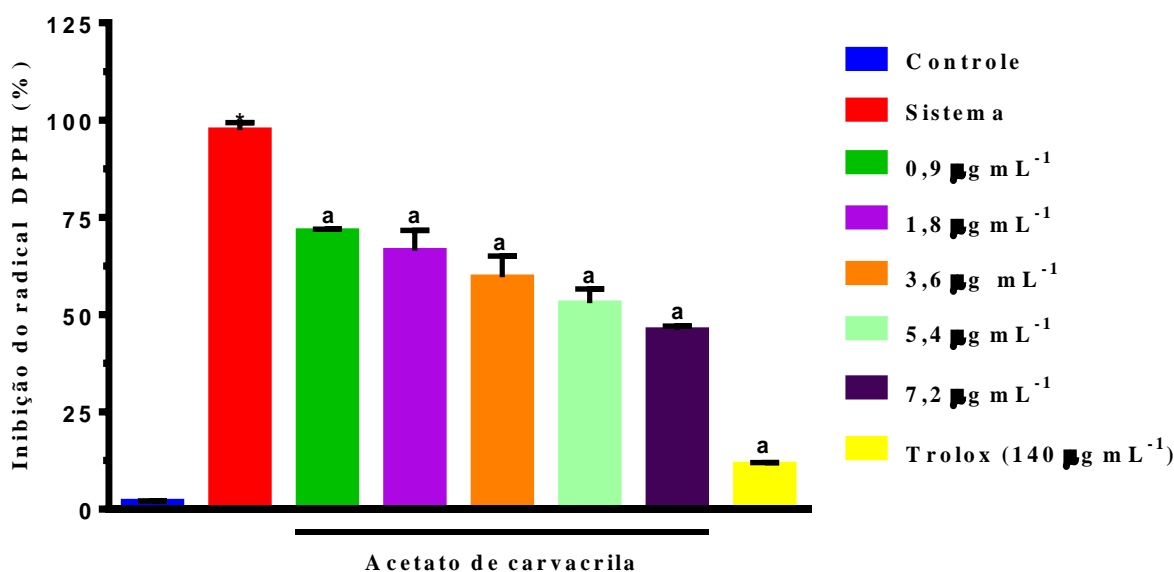


Ilustração 6. Efeitos do Acetato de carvacrila na inibição do radical DPPH[•]. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O trolox 140 $\mu\text{g/mL}$ foi usado como padrão antioxidante. * $p < 0,001$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,001$ em relação ao sistema (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

Assim como para o radical DPPH[•], também foi observada uma redução semelhante para a solução de radical ABTS^{•+} (sistema) pelo acetato de carvacrila, na qual, apresentou capacidade antioxidante de $18,34 \pm 1,14$, $29,92 \pm 0,72$, $34,91 \pm 1,35$, $48,36 \pm 2,35$ e $63,35 \pm 1,76\%$ para as concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O Trolox ($140 \mu\text{g mL}^{-1}$) também reduziu o radical ABTS^{•+} (sistema), apresentando $91,09 \pm 3,00$ de capacidade antioxidante (**Ilustração 7**). De acordo com os resultados da capacidade antioxidante, a CE_{50} do acetato de carvacrila foi de $5,46 \mu\text{g mL}^{-1}$.

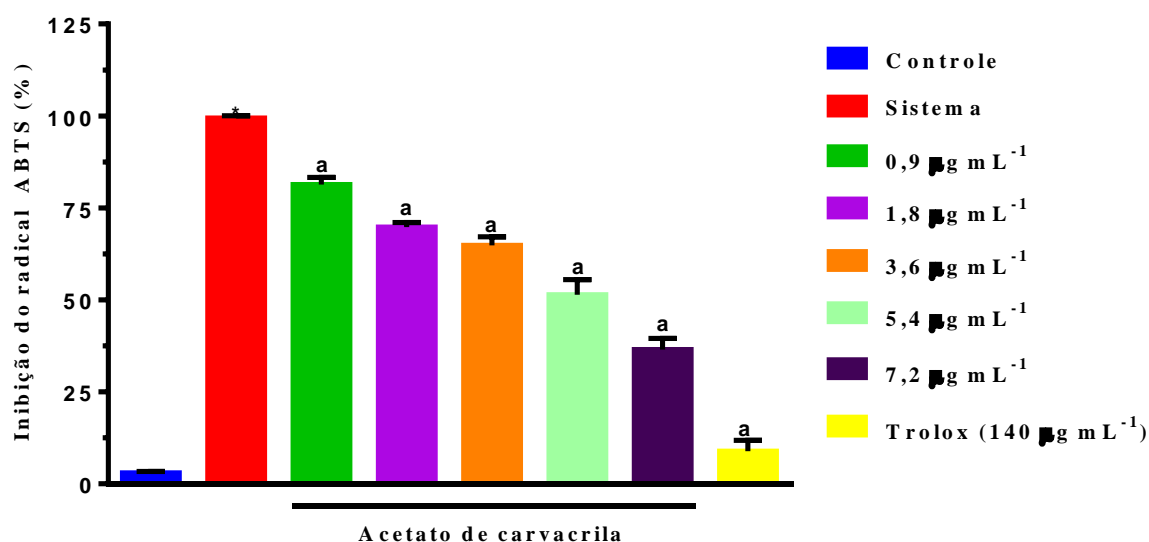


Ilustração 7. Efeitos do Acetato de carvacrila na inibição do radical ABTS⁺. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 3, dos experimentos em duplicata. O trolox 140 µg/mL foi usado como padrão antioxidante. * p<0,001 versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a p<0,001 em relação ao sistema (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Potencial redutor

Neste método, o composto antioxidante forma um complexo corado com ferrocianeto de potássio e cloreto ferroso, que é medida em 700 nm. Como representado na **Ilustração 8**, o acetato de carvacrila demonstrou um aumento da absorbância de acordo com o aumento das concentrações, de forma significativa em relação ao controle. De acordo com os resultados do potencial redutor, a CE₅₀ do acetato de carvacrila foi de 3,2 µg mL⁻¹.

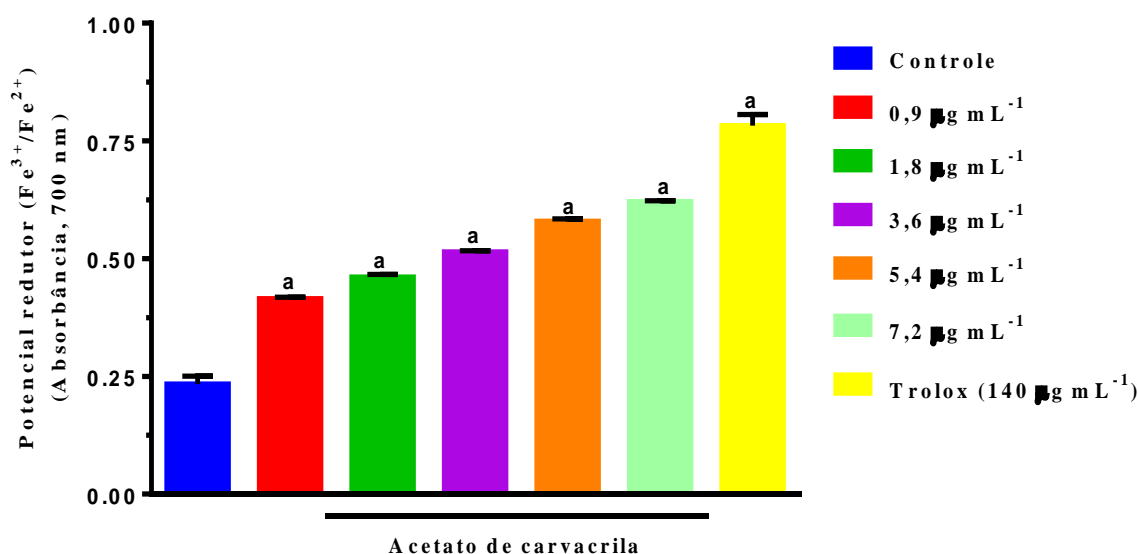


Ilustração 8. Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) do Acetato de carvacrila. Os valores representam a média \pm E.P.M. das absorvâncias em 700 nm, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O trolox 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi usado como padrão antioxidante ^a $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Efeitos Genotóxicos

Os resultados do ensaio cometa referente a genotoxicidade, expressos como índice de danos (ID) e frequência de danos (FD), em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas tratados com acetato de carvacrila nos tempos de exposição (24 h e 72 h) e por sexo são apresentados na **Tabela 2**.

O AC nas doses de 1000 e 2000 mg kg^{-1} induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) no ID e FD em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas quando comparado com o AC₀. Diferenças significativas ($p < 0,05$) no ID e FD também foram encontradas entre as doses de 1000 e 2000 mg kg^{-1} , exceto no ID do HC. Quando avaliados os animais tratados com AC em função do sexo, os resultados evidenciam maiores danos genotóxicos nas fêmeas. Os resultados dos animais tratados com 2000 mg kg^{-1} de AC, avaliados após 72 horas, mostraram redução significativa do ID e FD, em relação a avaliação de 24 horas.

Tabela 2. Efeitos genotóxicos em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas tratados com acetato de carvacrila por via oral para 14 dias.

Grupos	Sexo	Parâmetros do Ensaio Cometa					
		Índice de Danos			Frequência de Danos		
		24h	72h	HIPOCAMPO	24h	72h	HIPOCAMPO
AC0	Machos	7,40 ± 1,63	7,40 ± 1,63	8,60 ± 1,20	6,80 ± 1,20	6,80 ± 1,20	8,20 ± 1,28
	Fêmeas	17,20 ± 1,71	17,20 ± 1,71	6,80 ± 0,96	14,80 ± 1,53	14,80 ± 1,53	5,40 ± 1,28
AC1	Machos	86,00 ± 2,51 ^a	90,80 ± 3,02 ^a	70,80 ± 1,20 ^a	63,00 ± 0,54 ^a	66,20 ± 1,59 ^a	72,00 ± 1,09 ^a
	Fêmeas	114,20 ± 4,32 ^a	109,20 ± 5,71 ^a	84,20 ± 0,73 ^a	78,00 ± 1,18 ^a	72,00 ± 0,89 ^a	84,40 ± 0,67 ^a
AC2	Machos	135,80 ± 8,51 ^{a,b}	122,60 ± 4,92 ^{a,b,c}	76,20 ± 3,05 ^a	82,40 ± 1,36 ^{a,b}	78,80 ± 1,24 ^{a,b,c}	67,60 ± 1,36 ^{a,b}
	Fêmeas	148,20 ± 8,08 ^{a,b}	129,00 ± 3,96 ^{a,b,c}	98,80 ± 5,22 ^a	88,60 ± 2,22 ^{a,b}	81,60 ± 1,07 ^{a,b,c}	71,60 ± 1,77 ^{a,b}

(^ap<0,05, *versus* o AC₀; ^bp<0,05, *versus* o AC₁; ^cp<0,05, 72 *versus* 24 horas). (AC₀) veículo, (AC₁) 1000 mg kg⁻¹, (AC₂) 2000 mg kg⁻¹.

DISCUSSÃO

Entre os procedimentos experimentais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de um determinado composto, o método que envolve o sequestro do radical livre estável DPPH• é um dos mais utilizados por ser rápido e fácil de realizar. Neste método, a capacidade antioxidante é determinada pela análise da diminuição da absorvância da solução de DPPH• a 517 nm em um espectrofotômetro, na qual o radical DPPH• de cor púrpura é reduzido a forma DPPH₂ de cor amarela (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Com base neste princípio, o resultado obtido no presente estudo demonstrou que o AC nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹ é um antioxidante natural. Quando os resultados são comparados com o padrão Trolox, é observado que a capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH• do AC em uma concentração 20 vezes menor (7,2 µg mL⁻¹) demonstrou ser bem mais promissor que o Trolox. De acordo com esse método espectrofotométrico (MUSA et al., 2013), o sequestro do radical DPPH• pelo AC pode ocorrer pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio formando moléculas estáveis de DPPH₂ (**Ilustração 9A, 9B e 9C**).

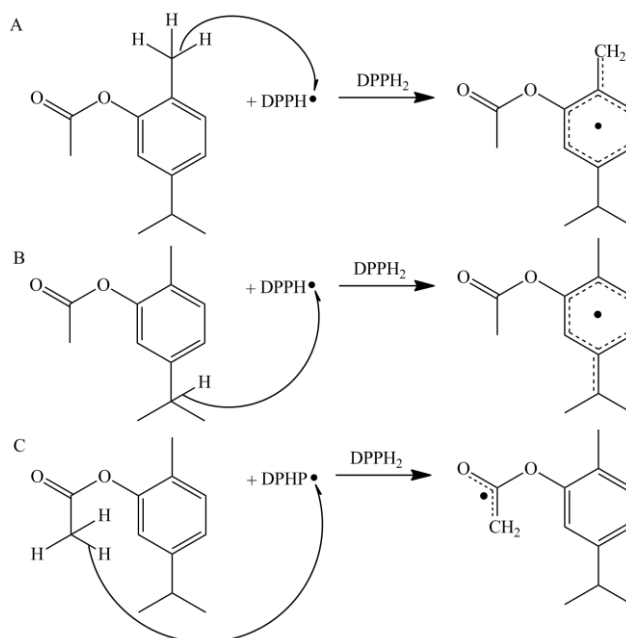


Ilustração 9. Propostas de possíveis mecanismos da ação antioxidante do AC contra o radical DPPH•.

O AC é um éster monoterpênico semissintético derivado a partir do carvacrol, e em um estudo realizado recentemente, o carvacrol (5-100 µg mL⁻¹) demonstrou capacidade

antioxidante contra o radical DPPH[•] com uma CE₅₀ de 131.24 µg mL⁻¹ (BEENA et al., 2013). Assim, no presente estudo, o AC com uma CE₅₀ de 6,27 µg mL⁻¹ demonstrou ser um composto mais efetivo na remoção do radical DPPH[•] quando comparado com os resultados antioxidantes do seu precursor.

A eliminação do cátion radical ABTS^{•+} é um método antioxidante convencional, simples e extensivamente utilizado junto com o radical DPPH[•] para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto (FLOEGEL et al., 2011). Neste método, o radical ABTS^{•+} de coloração azul/verde é produzido por meio da oxidação da solução de ABTS pelo persulfato de potássio e a reação com um composto antioxidante é monitorada pela diminuição da absorvância da reação a 734 nm (DURMAZ et al., 2012). Similarmente aos resultados obtidos no método DPPH[•], o presente estudo demonstrou que o AC nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹ conseguiu atuar na remoção do cátion radical ABTS^{•+}.

Como observado na Ilustração 7, a capacidade antioxidante foi dependente da concentração e quando os resultados são comparado com o padrão, o AC na concentração de 7,2 µg mL⁻¹, 20 vezes inferior ao trolox, demonstrou ser um antioxidante mais eficiente no sequestro do cátion radical ABTS^{•+} que o padrão. De acordo com esse método espectrofotométrico, o sequestro do cátion radical ABTS^{•+} pode envolver a transferência de átomos de hidrogênio ou elétrons, formando moléculas estáveis de ABTS⁺ (**Ilustração 10A, 10B e 10C**).

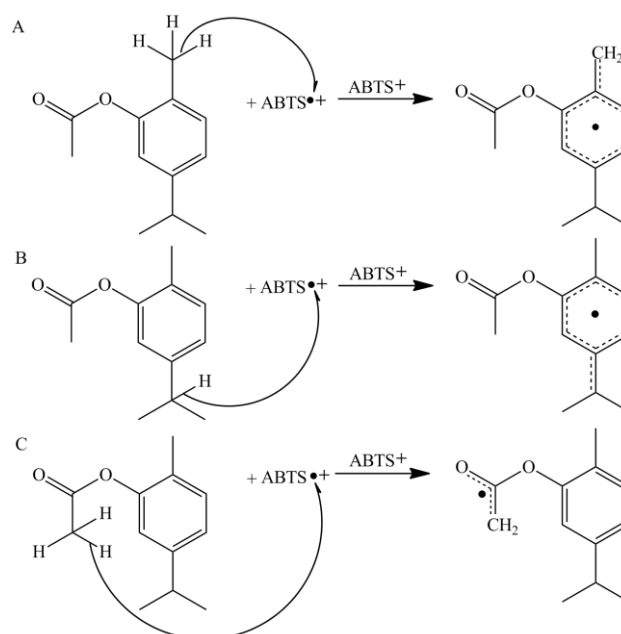


Ilustração 10. Propostas de possíveis mecanismos da ação antioxidante do AC contra o cátion radical ABTS^{•+}.

O potencial redutor do AC foi avaliada pela transformação do ferricianeto de potássio (F^{3+}) de cor amarela à ferrocianeto de potássio (F^{2+}) de cor verde. Essa mudança de cor ocorre por meio da capacidade de transferência de elétrons, na qual, serve como um importante indicador da capacidade antioxidante apresentado pela AC, como demonstrado anteriormente pela remoção dos radicais livres orgânicos DPPH \cdot e ABTS $^{+\cdot}$. Processos como eliminação de radicais livres e/ou inibição da peroxidação lipídica é mediada pela reação redox e de acordo com os resultados demonstrado na Ilustração 8, o AC apresentou um potencial redutor de acordo com o aumento da concentração com o valor da CE_{50} de $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Radicais livres como espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio são frequentemente produzidas *in vivo* e o DNA é o alvo mais importante do estresse oxidativo. Lesões oxidativas ao DNA representam um biomarcador preditivo para monitorar o risco de desenvolvimento de diversas doenças. Assim, avaliações da capacidade antioxidante juntamente com a genotóxica, representam um passo importante para caracterização toxicológica de uma droga (COLLINS, 2014).

Atualmente um crescente foco de pesquisas está sendo direcionado à segurança de produtos naturais (KELBER et al., 2012). Este foco é justificado pela imensa quantidade de compostos naturais que podem ser extraídos de plantas, além das inúmeras ações farmacológicas que podem ser elucidadas a partir destes. Recentemente, estudos realizados demonstraram que o monoterpene AC tem apresentado atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (DAMASCENO et al., 2014) e ansiolítica (PIRES et al., 2013) em camundongos. Diante disso, o presente estudo, foi performado para análise do potencial genotóxico *in vivo* do AC utilizando o ensaio cometa. Este ensaio é recomendado por agências reguladoras em todo o mundo como parte de verificação de segurança de uma possível aplicabilidade de uma droga como fármaco (WU et al., 2010; OUEDRAOGO et al., 2013).

Nesse sentido, os resultados deste estudo revelaram danos ao DNA pelo aumento de forma significativa no ID e FD em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas tratados com AC, principalmente na concentração de 2000 mg kg^{-1} após 24h do tratamento. O ID e FD foram atenuadas após 72 h do tratamento, indicando a reparação de danos ao DNA.

Em estudo realizado por Nikolić e colaboradores (2011), os resultados obtidos com o teste do cometa em células Vero mostraram que as concentrações mais elevadas de monoterpenos (cânfora, eucaliptol e tujona) pode induzir lesões do DNA. No entanto, baixas

concentrações desses monoterpenos podem estimular processos de reparo no DNA. Em adição, estudos genotóxicos realizados com o carvacrol, precursor do AC, pelo ensaio cometa em células V79 demonstraram que esse composto em concentrações acima de 25 μM pode induzir quebras de cadeia de DNA (ÜNDEĞER et al., 2009). Assim, é razoável sugerir que o AC em doses moderadas é um composto seguro, já que as doses definidas para o ensaio cometa são para avaliar padrões de toxicidade. Em adição, as células dos camundongos tratados com AC apresentaram capacidade em reparar o dano. Dessa forma, outros desenhos experimentais para avaliação genotóxica, incluindo doses reduzidas, são necessários para melhor confirmar os achados no presente estudo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o AC apresenta capacidade antioxidante em modelos experimentais *in vitro* e que em doses a partir de 1000 mg kg^{-1} pode induzir danos ao DNA em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos machos e fêmeas pelo ensaio cometa. Para uma melhor confirmação desses resultados, estudos posteriores devem ser realizados para caracterizar melhor o efeitos genotóxico do AC.

REFERÊNCIAS

- ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 581-588, 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.
- BURGOS, L.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.H.R.; ABREU, B.R.R.; SOUZA, A.P.; JULIANO, V.B.; DIHL, R.R. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity assessment of 2-methylisoborneol, causal agent of earthy–musty taste and odor in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 282-286, 2014.
- CATANZARO, I.; CARADONNA, F.; BARBATA, G.; SAVERINI, M.; MAURO, M.; SCIANDRELLO, G. Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 463-469, 2012.
- COELHO, V.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D.F.; SANTOS, A.R.S.; BRUM, L.F.S.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. **Journal of natural medicines**, v. 67, n. 4, p. 876-880, 2013.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 794-800, 2014.

DAMASCENO, S.R.B., OLIVEIRA, F.R.A.M., CARVALHO, N.S., BRITO, C.F.C., SILVA, I.S., SOUSA, F.B.M., SILVA, R.O., SOUSA, D.P., BARBOSA, A.L.R., FREITAS, R.M., MEDEIROS, J.-V.R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58-66, 2014.

DURMAZ, G. Freeze-dried ABTS+ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1658-1663, 2012.

FLOEGEL, A.; KIM, D.O.; CHUNG, S.J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

KELBER, O.; STEINHOFF, B.; KRAFT, K. Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: A co-ordinated approach. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 472-476, 2012.

LAWAL, O. A.; OGUNWANDE, I. A. 5 - Essential Oils from the Medicinal Plants of Africa. In: KUEDE, V. (Ed.). **Medicinal Plant Research in Africa**. Oxford: Elsevier, 2013. p.203-224.

LIMA, M.D.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DE SANTANA, W.A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M.B.; VILLARREAL, C.F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112-117, 2013.

MASTELIĆ, J.; JERKOVIĆ, I.; BLAŽEVIĆ, I.; POLJAK-BLAŽI, M.; BOROVIĆ, S.; IVANČIĆ-BAĆE, I.; SMREČKI, V.; ŽARKOVIĆ, N.; BRČIĆ-KOSTIĆ, K.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; MÜLLER, N. Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989-3996, 2008.

MELO, F.H.C.; MOURA, B.A.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, S.M.M.; MACEDO, D.S.; FONTELES, M.M.D.F.; VIANA, G.S.D.B.; DE SOUSA, F.C.F. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 362-367, 2011.

MELO, F.H.C.; VENÂNCIO, E.T.; DE SOUSA, D.P.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; DE VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; DE SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2010.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NIKOLIĆ, B.; MITIĆ-ĆULAFIĆ, D.; VUKOVIĆ-GACIC, B.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2035-2045, 2011.

OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J.M.; EFFERTH, T.; QU, F.; ZHOU, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 492-512, 2012.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; SILVA, O.A.; DE ALMEIDA, A.A.C.; CERQUEIRA, G.S.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, n. 0, p. 42-48, 2013.

RASSOULI, F.B.; MATIN, M.M.; IRANSHAHI, M.; BAHRAMI, A.R. Investigating the cytotoxic and apoptosis inducing effects of monoterpenoid stylosin *in vitro*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 5, p. 742-749, 2011.

RE, R., PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 1999.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229-233, 2005.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, In press, 2011.

ÜNDEĞER, Ü.; BAŞARAN, A.; DEGEN, G.H.; BAŞARAN, N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2037-2043, 2009.

WU, K.M., DOU, J.; GHANTOUS, H.; CHEN, S.; BIGGER, A.; BIRNKRANT, D. Current regulatory perspectives on genotoxicity testing for botanical drug product development in the U.S.A. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 1-3, 2010.

YU, H.; ZHANG, Z.L.; CHEN, J.; PEI, A.; HUA, F.; QIAN, X.; HE, J.; LIU, C.F.; XU, X. Carvacrol, a Food-Additive, Provides Neuroprotection on Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33584, 2012.

**CAPÍTULO IV: Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas
para o tratamento da esquistossomose**

Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

RESUMO

“APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE”

A presente invenção diz respeito às aplicações farmacêuticas do acetato de carvacrol em produtos farmacêuticos como agente anti-helmíntico. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao potencial contra a fase adulta do *Schistosoma mansoni* e sua utilização na formulação de produtos farmacêuticos em diferentes formas farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de parasitoses devido à presença de ovos em tecidos e/ou órgãos, principalmente esquistossomose, bem como de outras patologias relacionadas com o trato digestório. Dentre os benefícios de se obter um novo fitomedicamento dotado de maior afinidade para o tratamento da esquistossomose, está a menor ocorrência de efeitos colaterais e reações adversas ao tratamento. Portanto, formulações farmacêuticas contendo como princípio ativo acetato de carvacrol e/ou seus derivados têm alto potencial para o tratamento da esquistossomose com aplicação terapêutica para a saúde humana e/ou animal.

REIVINDICAÇÕES

1. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural, caracterizado por sua ação anti-helmíntica contra o *Schistosoma mansoni*.

2. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural da reivindicação 1, caracterizado por serem obtidas na forma seca, semissólida e/ou líquida.

3. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural das Reivindicações 1 e 2, caracterizado por serem obtidas por meio de qualquer solvente ou solução extrativa, independente das proporções entre os solventes.

4. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural das Reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por serem obtidas por meio de qualquer técnica e/ou processo de síntese.

5. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural da Reivindicação 2, caracterizado por serem obtidas na forma seca, por meio do processo de secagem do produto sintético por meio de qualquer processo viável de secagem do diterpeno e que possua ou não qualquer excipiente sólido como carreador.

6. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural da Reivindicação 1, caracterizado por serem veiculadas em qualquer apresentação farmacêutica, esteja esta na forma de produtos farmacêuticos sólidos, semi-sólidos e/ou líquidos, estéreis ou não, independente da via de administração, posologia, concentração do produto sintético na formulação e forma de liberação dos ativos (liberação imediata, liberação controlada, e outros).

7. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto farmacêutico da Reivindicação 7, caracterizado por apresentarem a ação farmacológica de interesse quando isolado ou quando associado a qualquer outro fármaco (sintético,

semissintético, fitofármaco, mineral, biológico, biotecnológico, fitoterápico ou fitomedicamento) que potencialize a ação anti-helmíntica do mesmo.

8. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto farmacêutico da Reivindicação 7, caracterizado por serem obtidas para uso veterinário e/ou humano.

9. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto farmacêutico da Reivindicação 9, caracterizado por serem obtidas para uso humano, e que pode ser destinado a administração pediátrica, adulta ou geriátrica.

10. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto natural da reivindicação 1, caracterizado por produzirem efeito antiparasitário.

11. “APLICAÇÕES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE” produto farmacêutico da Reivindicação 8, caracterizado por serem utilizadas no tratamento da esquistossomose, bem como outras de parasitoses devido à presença de ovos em tecidos e/ou órgãos, principalmente no tecido hepático nas quais as atividade contra os estágios de infecção (fase aguda e a fase crônica com comprometimento hepatoesplênico), responde pela fisiopatologia inerente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na prospecção tecnológica realizada, um artigo científico foi encontrado e não foram encontrados pedidos de depósitos de patentes em nenhuma das bases pesquisadas. Nossa investigação revela a importância do monitoramento tecnológico mundial de um produto natural derivado, para o direcionamento racional da pesquisa em DNs.

O acetato de carvacrila mostrou segurança pré-clínica para os animais tratados por via oral. A toxicidade aguda calculada da administração intraperitoneal com acetato de carvacrila revelou uma DL_{50} de 1542,21 mg kg^{-1} . Os resultados evidenciaram que o acetato de carvacrila não produziu significativas alterações hematológicas e bioquímicas em camundongos adultos de ambos os sexos. O acetato de carvacrila não interferiu na atividade psicomotora dos animais.

O acetato de carvacrila possui atividade antioxidante *in vitro* e demonstrou efeito genotóxico em células do sangue periférico e hipocampo de camundongos tratados de forma aguda.

Formulações farmacêuticas contendo como princípio ativo acetato de carvacrol e/ou seus derivados têm alto potencial para o tratamento da esquistossomose com aplicação terapêutica para a saúde humana e/ou animal. Diante disso, foi realizado o depósito do pedido de patente requerida junto ao INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA**

- *Artigos Publicados*

OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.A.L.; OLIVEIRA, G.L.S.; FREITAS, R.M. Prospecção tecnológica do acetato de carvacrolila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas. **Revista GEINTEC – GESTÃO, INOVAÇÃO E TECNOLOGIAS**, v. 3, n. 3, p. 103-110, 2013.

- *Artigos Submetidos*

OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.L.S.; GOMES JUNIOR, A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Segurança pré-clínica do acetato de carvacrila: uma avaliação da toxicidade aguda. Artigo submetido à revista Food Chemical and Toxicology.

OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.L.S.; ALENCAR, M.V.O.B.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Perfil antioxidante e genotóxico de um derivado semissintético do carvacrol. Artigo submetido à Revista Toxicology Letters.

- *Depósito de pedido de patente*

FORTES, A.C.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; FREITAS, R.M. **Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose** - Patente requerida junto ao INPI -Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, J.S.; OLIVEIRA, G.L.S.; GOMES JUNIOR, A.L.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; ALENCAR, M.V.O.B.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. **Avaliação da atividade locomotora e coordenação motora em camundongos Swiss tratados com acetato de carvacrolila.** In: XXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2013, Caxambu. FESBE 2012. Minas Gerais: FESBE 2013, 2012.

OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.L.S.; GOMES JUNIOR, A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. **Toxicidade aguda em camundongos tratados com acetato de carvacrila.** In: II Workshop de Projetos e Dissertações, 2013, Teresina. II Workshop de Projetos e Dissertações. Teresina: Boletim Informativo GEUM, 2013. v. 4. p. 154-158.

SALDANHA, G.B.; **OLIVEIRA, F.R.A.M.**; OLIVEIRA, G.A.L.; OLIVEIRA, G.L.S.; FREITAS, R.M. **Determinação da atividade antioxidante in vitro de um derivado acetilado do carvacrol.** In: IV Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2013, Juazeiro - Bahia. IV Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco. Juazeiro - Bahia: UNIVASF, 2013. v. QUI546.

CARVALHO, N.S.; DAMASCENO, S.R.B.; **OLIVEIRA, F.R.A.M.**; BRITO, C.F.C.; SILVA, I.S.; SOUSA, F.B.M.; SILVA, R.O.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.R. **Anti-inflammatory activity of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice.** In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal-RN. Annals of 11th World Congress on Inflammation, 2013. v. IP. p. 76-76.

OLIVEIRA, G.A.L.; **OLIVEIRA, F.R.A.M.**; OLIVEIRA, G.L.S.; FREITAS, R.M. **Aplicação do acetato de carvacrolila para doenças negligenciadas: prospecção tecnológica.** In: Simpósio Latino-americano de Biotecnologia do Nordeste, 2013, Parnaíba - PI. Anais SIMBIOTEC, 2013.

ANEXOS



PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO ACETATO DE CARVACROLILA E APLICAÇÕES NO SETOR INDUSTRIAL FARMACÊUTICO: ÊNFASE EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

TECHNOLOGICAL FORECASTING OF CARVACRY ACETATE AND APPLICATIONS IN THE INDUSTRIAL PHARMACIST: EMPHASIS IN NEGLECTED DISEASES

Francisco Rodrigo de Azevedo Mendes de Oliveira¹; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira²; George Layson da Silva Oliveira³; Rivelilson Mendes de Freitas^{1,4,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

rodrigomendesufpi@hotmail.com

²Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

guilhermelopes@live.com

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

georgenota10@hotmail.com

⁴Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

rvmendes@hotmail.com

Resumo

As doenças negligenciadas (DNs) são endêmicas e atingem a África, Ásia e Américas, e podem causar a morte de um milhão de pessoas por ano. Atualmente há limitações no tratamento das diversas DNs, principalmente no que se refere a resistência aos medicamentos existentes. Destarte, o acetato de carvacrolila constitui uma droga potencial, com comprovada atividade esquistossomicida e que pode colaborar com a erradicação das DNs. O objetivo do presente estudo foi realizar uma prospecção tecnológica das aplicações industriais do acetato de carvacrolila em DNs, analisando a participação dos países nos depósitos de pedido de patente em bases nacionais e internacionais até o momento. Para isso, a prospecção foi realizada no Banco Europeu de Patentes, no banco da Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Banco Americano de Marcas e Patentes e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil. Os achados contribuem para um crescente investimento em pesquisa com o acetato de carvacrolila no desenvolvimento de medicamentos eficazes, seguros e que permitam acesso às camadas com vulnerabilidade social.

Palavras-chave: Acetato de carvacrolila; Doenças negligenciadas; Prospecção tecnológica.

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

< Uso exclusivo do INPI >

19 MAR 2027 000042
Espaço reservado ao protocolo Amanda Santa Fé Sousa
Coordenadora
Mat. 006493-91
Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: Amanda Campos Fortes
1.2 Qualificação Mestranda
1.3 CNPJ/CPF: 008.145.433-32
1.4 Endereço Completo: Rua Anfrisio Lobao, 1829, apt 202. Jockey.
1.5 CEP: 64049280 1.6 Telefone (86) 99914366 1.7 Fax:
1.8 E-mail: amandacfortes@hotmail.com

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

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

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):
APLICACOES DO ACETATO DE CARVACROL EM FORMULACOES FARMACEUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

continua em folha anexa

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

5. Prioridade: interna unionista

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

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

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

6.1 Nome: Amanda Campos Fortes
6.2 Qualificação Mestranda 6.3 CPF: 008.145.433-32
6.4 Endereço completo: Rua Anfrisio Lobao, 1829, apt. 202. Jockey.
6.5 CEP: 64049280 6.6 Telefone: (86) 99914366 6.7 Fax:
6.8 E-Mail: amandacfortes@hotmail.com

continua em folha anexa