



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

Bioprospecção do hemiterpenóide prenol: contribuição científico-tecnológica e perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento

ALEXANDRE XAVIER DE LIRA DA SILVA

Teresina – Piauí

2016

ALEXANDRE XAVIER DE LIRA DA SILVA

Bioprospecção do hemiterpenóide prenil: contribuição científico-tecnológica e perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento

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

Teresina – Piauí

2016

ALEXANDRE XAVIER DE LIRA DA SILVA

Bioprospecção do hemiterpenóide prenol: contribuição científico-tecnológica e perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros (Presidente)
Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI

Profa. Dra. Jessica Pereira Costa (Avaliador Interno)
Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (Avaliador Interno)
Departamento de Biofísica e Fisiologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dra. Ana Paula dos Santos Correia Lima Da Silva (Avaliador Externo)
Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Piauí - UESPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-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

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Sergio Luiz Galan Ribeiro

**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

(In memoriam)

“Porque eu sou do tamanho do que vejo, e não do tamanho da minha altura. E o que vejo são os meus sonhos” (**Fernando Pessoa**).

Geralmente descobrimos o que fazer percebendo aquilo que não devemos fazer. Aquele que nunca cometeu um erro nunca fez uma descoberta” (**Samuel Smiles**).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial meus pais Francisco Xavier e Maria Antônia; Por compreenderem minha ausência por tantos dias e fins de semana, por acreditarem em mim mesmo quando nem eu mesmo acreditava. São minha fortaleza em qualquer tempo e lugar deste planeta.

Aos meus irmãos Edson Xavier e Gorette Lira, e irmãs de coração Amanda Karoline e Lauane, pela amizade e companheirismo inestimável, pelo carinho; sei que nem sempre puderam estar perto, mas mesmo distantes torciam por tudo e davam o melhor incentivo.

Às minhas avós queridas, grandes guerreiras que lutam até hoje pelo bem de suas famílias. A todos os tios, primos, padrinhos, madrinhas e amigos que sempre torceram por mim, um grande obrigado.

Em memória do indescritível professor Rivelilson, maior exemplo de professor e pesquisador e pessoa que conheci; de meu grande amigo e cunhado Alexandre Marcus, que mesmo nos momentos mais difíceis não deixou de procurar a paz e a felicidade; à minha madrinha Socorro Valério, exemplo de força e dedicação à sua família, e ao meu avô José Valério Filho, um exemplo de homem bom, digno, íntegro, a melhor referência que um neto pôde ter. Descansem em paz meus queridos. A saudade é o amor que fica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, pela oportunidade de cursar um mestrado em uma respeitada Instituição Federal de ensino.

Agradeço de coração aos meus orientadores Maria das Graças Freire de Medeiros e Rivelilson Mendes de Freitas, exemplos de amor e dedicação à profissão farmacêutica, ao magistério e à pesquisa. Ao Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto por me acolher tão bem em seu laboratório. Aos professores Dr. Luciano da Silva, Dra. Jessica Pereira Costa, Lopes e Ana Paula dos Santos Correia Lima Da Silva.

Aos colegas de turma do mestrado: Aldenora Ximenes, Renata Drumond, Galileia Santos, Terceiro Neto, Mara Layanne, Maria Mendes, Michely Laiany, Rian Felipe, Marcus Alencar, Valéria Lima, Victor Hugo, Italo Rosal e em especial, minhas colegas de turma dos farmanets, Kássia Karoline e Shayara Ciríaco, amigas de uma vida inteira praticamente. Obrigado a todos pelo privilégio de ter estado esse tempo juntos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Profa^a. Dr^a. Antonia Maria das Graças Lopes Citó Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho, Profa^a. Dr^a. Jessica Pereira Costa, Profa^a. Dr^a. Hercília Maria Lins Rolim, Profa^a. Dr^a. Ana Amélia de Cravalho Melo Cavalcante, Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes, Profa^a. Dr^a. Chistiane Mendes Feitosa e Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes.

Aos amigos dos laboratórios Lapnex e Lapcom, Oskar, Brenda, Luciana, Samara, Julyanna, Yan, Layana, Altamiro, Flávio, Jussara, Joilane, Tâmara, Sean, Amanda, Rusbene, Keyla, Katia, Guilherme, George, Everton, um muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	Ix
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE GRÁFICOS	Xi
RESUMO	Xii
ABSTRACT	Xiii
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Inovação Farmacêutica e Tecnológica.....	17
3.2 Estresse oxidativo.....	18
3.3 Infecções Microbianas.....	21
3.4 Terpenos e Terpenóides.....	22
3.4.1 Prenol (3-metil-2-buten-1-ol).....	25
Referências.....	28
4 CAPÍTULO I: Propriedades biológicas dos hemiterpenos: uma prospecção científica e tecnológica	33
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Metodologia.....	35
Resultados e Discussão.....	36
Prospecção científica.....	36
Prospecção tecnológica.....	48
Conclusão.....	53
Referências.....	53
5 CAPÍTULO II: Estudos não clínicos com o hemiterpeno prenil: toxicidade aguda em <i>mus musculus</i> e citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	58
Resumo.....	59
Introdução.....	60
Metodologia.....	61
Resultados e Discussão.....	65

Conclusão.....	79
Referências.....	79
6 CAPÍTULO III: Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> do hemiterpenóide prenil (3-metil-2-buten-1-ol).....	84
Resumo.....	85
Introdução.....	86
Metodologia.....	87
Resultados.....	93
Discussão.....	98
Conclusão.....	103
Referências.....	103
7 CAPÍTULO IV: Avaliação da atividade esquistossomicida, antimicrobiana intrínseca e da interferência de um hemiterpenóide na resistência a fluorquinolonas em <i>Staphylococcus aureus</i>.....	110
Resumo.....	111
Introdução.....	112
Metodologia.....	114
Resultados.....	117
Discussão.....	121
Conclusão.....	126
Referências.....	126
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	130
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....	131
ANEXOS.....	132

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Ilustração 1. Ciclo bioquímico do Nitrogênio.....	22
Ilustração 2. Esquematização dos alvos celulares dos radicais livres.....	22
Ilustração 3. Formação dos terpenos baseado nas unidades isoprênicas.....	24
Ilustração 4. Síntese de terpenos e classificação de acordo com as unidades isopreno.	25
Ilustração 5. Estrutura química do 3-metil-2-buten-1-ol ou prenol.....	28
Ilustração 6. Vegetais encontrados no Brasil que possuem o prenol como componente.	29
CAPÍTULO II	
Ilustração 1. Estrutura química do prenol (3-metil-2-buten-1-ol).....	62
Ilustração 2. Equipamentos campo aberto (A) e barra giratória (B).....	65
CAPÍTULO III	
Ilustração 1. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método OH•.....	90
Ilustração 2. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método NO•.....	91
Ilustração 3. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método TBARS•....	92
Ilustração 4. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método DPPH•....	93
Ilustração 5. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método ABTS•.....	94
Ilustração 6. Esquematização da reação de Fenton.....	100
Ilustração 7. Mecanismo de reação usada no método de Griess.....	101
Ilustração 8. Representação esquemática da provável reação entre a molécula do prenol e um radical livre (R^{\bullet}).....	102
Ilustração 9. Mecanismo da reação da peroxidação lipídica por reação entre o malonaldeído e o ácido tiobarbitúrico.....	103
Ilustração 10. Representação esquemática da provável reação entre a molécula do prenol e um radical lipídico (L^{\bullet}), durante a peroxidação lipídica.....	104
Ilustração 11. Provável mecanismo do prenol na inibição do DPPH•.....	105
Ilustração 12. Provável mecanismo do prenol na inibição do ABTS• ⁺	106
Ilustração 13. Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico frente aos radicais livres.	107
CAPÍTULO IV	
Ilustração 1. Modelo de placa de 96 poços para método de microdiluição seriada em caldo BHI para determinação de atividade antimicrobiana (MICs) do prenol e das associações de prenol e antibióticos.....	119
Ilustração 2. Estrutura química do 3-metil-2-buten-1-ol ou prenol.....	119
Ilustração 3. Esquematização da bomba de efluxo NorA na parede celular bacteriana....	125

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Redução do oxigênio a espécies reativas encontradas no organismo.....	19
--	-----------

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultado do número de artigos encontrados e utilizados na prospecção científica de hemiterpenos com propriedades biológicas com base nos bancos de dados consultados.....	40
---	-----------

Tabela 2. Publicações nas bases de dados dos hemiterpenóides em espécies vegetais e suas atividades biológicas (<i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>).....	42
--	-----------

Tabela 3. Número de patentes depositadas nas bases de dados INPI, USPTO, EPO e WIPO, compreendendo os termos utilizados.....	52
---	-----------

Tabela 4. Patentes relacionadas às aplicações tecnológicas dos hemiterpenos depositadas nas bases de dados EPO, USPTO e WIPO.....	53
--	-----------

CAPÍTULO II

Tabela 1. Contagem de <i>Artemias salinas</i> mortas após 24 h de exposição ao hemiterpeno prenol.....	67
---	-----------

Tabela 2. Valor da CL ₅₀ do hemiterpeno 3MB, com o intervalo de confiança de 95%	68
--	-----------

Tabela 3. Efeitos da administração aguda por via oral do prenol em camundongos durante 14 dias de observação.....	69
--	-----------

Tabela 4. Variação de peso corporal em camundongos durante 14 dias de observação após administração aguda por via oral do prenol.....	70
--	-----------

Tabela 5. Efeitos do prenol em camundongos no tempo de permanência no teste de barra giratória após administração oral única, e período de observação de 7 e 14 dias.	76
--	-----------

Tabela 6. Efeitos do prenol em camundongos no número de quedas no teste de barra giratória após administração oral única, e período de observação de 7 e 14 dias.....	76
--	-----------

Tabela 7. Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com prenol por via oral.....	78
--	-----------

Tabela 8. Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com prenol por via oral.....	79
--	-----------

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Concentração Inibitória mínima (CIM) do hemiterpenóide prenol contra cepas de micro-organismos selecionados.....	120
---	------------

Tabela 2. Concentração Inibitória mínima (CIM) do hemiterpenóide prenol contra cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> SA-1199B.....	121
--	------------

Tabela 3. Efeitos <i>in vitro</i> do prenol sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	122
---	------------

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

- Gráfico 1.** Nº de artigos científicos citando hemiterpenos com propriedades biológicas e os países originários das pesquisas..... 41
- Gráfico 2.** Países de origem dos depósitos de patentes nas bases de dados dos bancos de patentes EPO, USPTO e WIPO..... 55

CAPÍTULO II

- Gráfico 1.** Viabilidade dos náuplios de *Artemia salina* nas concentrações do hemiterpeno prenol..... 68
- Gráfico 2.** Perfil do consumo de água em camundongos após administração aguda do prenol.. 71
- Gráfico 3.** Perfil do consumo de ração em camundongos após administração aguda do prenol..... 71
- Gráfico 4.** Produção de excretas em camundongos após administração aguda do prenol..... 72
- Gráfico 5.** Número de cruzamentos realizados por camundongos após administração oral única do prenol, e período de observação de 14 dias..... 73
- Gráfico 6.** Número de levantamentos realizados por camundongos após administração oral única do prenol, e período de observação de 14 dias..... 74
- Gráfico 7.** Número de movimentos de auto-limpeza realizados por camundongos após administração oral única do prenol, e período de observação de 14 dias..... 75

CAPÍTULO III

- Gráfico 1.** Efeitos do hemiterpeno prenol na redução do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$)..... 95
- Gráfico 2.** Efeitos do Hemiterpeno prenol na redução do radical livre nitrito ($\text{NO}_2\bullet$).... 96
- Gráfico 3.** Efeitos do Hemiterpeno prenol contra a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... 97
- Gráfico 4.** Efeitos do Hemiterpeno prenol na redução do radical DPPH \bullet 98
- Gráfico 5.** Efeitos do Hemiterpeno prenol na redução do radical ABTS \bullet^+ 99

CAPÍTULO IV

- Gráfico 1.** Média Geométrica das CIMs dos antibióticos Ciprofloxacino e Norfloxacino na presença e ausência do hemiterpeno prenol..... 122

Bioprospecção do hemiterpenóide prenol: contribuição científico-tecnológica e perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento. ALEXANDRE XAVIER DE LIRA DA SILVA. Orientador: Maria das Graças Freire de Medeiros. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2016.

RESUMO

A busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas presentes nas plantas é uma área de interesse crescente. O hemiterpenóide prenol, utilizado como intermediário na indústria química para a síntese de fármacos e substâncias químicas aromáticas, ocorre naturalmente em frutas cítricas e espécies vegetais da região Nordeste, como *Malpighia sp.* (acerola), *Spondias tuberosa L.* (umbu), *Theobroma grandiflorum Schum* (cupuaçu), *Morinda Citrifolia* (noni), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Passiflora incarnata* (maracujá). Em virtude da escassa literatura sobre os efeitos biológicos do prenol, e ressaltando-se a importância dos terpenóides como fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, estudos toxicológicos e farmacológicos foram realizados a fim de contribuir com o desenvolvimento de novos fármacos. Foi realizada uma prospecção científica e tecnológica sobre as propriedades biológicas dos hemiterpenos, por meio da busca de artigos científicos e nos pedidos de depósitos de patentes em bancos nacionais e mundiais, onde foi observado que maior parte dos trabalhos é de origem asiática e nenhum de origem brasileira. No Brasil também não há registro de hemiterpenos protegidos. Resultados da citotoxicidade frente à *A.salina* indicam altas médias de sobrevivência das larvas, com CL_{50} estimada em 2944,14 $\mu\text{g/mL}$ (32,58 mM). Durante o tratamento, nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/kg^{-1} , permitindo estimar uma faixa de DL_{50} entre 2000 e 5000 mg/kg . O prenol também não alterou a massa corpórea dos animais. Os resultados mostram que a administração via oral, do prenol, de forma geral, não produz efeitos tóxicos que levem a morte do animal, embora module os parâmetros analisados no teste de campo aberto, inferindo uma possível atividade no sistema nervoso central, sem influir no sistema motor. Não houve toxicidade aguda do sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos, fisiológicos em camundongos. A atividade antioxidante *in vitro* do hemiterpeno prenol foi avaliada via inibição dos radicais hidroxila, nitrito, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) em concentrações de 0,1 a 2,2 mM. O prenol exibiu potencial antioxidante *in vitro* em todas as metodologias. Foi sugerido um mecanismo em que o prenol doa hidrogênios, convertendo os radicais em espécies menos reativas. O prenol foi avaliado ainda com relação às atividades esquistosomicida, antimicrobiana e de interferência na atividade de antibióticos. Os ensaios indicaram que o prenol não apresentou atividade significativa do ponto de vista clínico ($CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$) frente às linhagens analisadas; entretanto, exibiu atividade moduladora das quinolonas ciprofloxacino e norfloxacino (redução de 75% e 50%, respectivamente, do valor da CIM frente ao *Staphylococcus aureus* SA1199B). Também não apresentou atividade esquistosomicida, apresentando um efeito contrário, o aumento da motilidade e contração dos vermes. Os presentes resultados enriquecem a literatura sobre este hemiterpenóide e trazem perspectivas para a realização de novos testes que permitam o uso do prenol como fitomedicamento ou produto biotecnológico.

Palavras-chave: 3-metil-2-buten-1-ol; Hemiterpeno; Produtos Naturais; Bioprospecção.

Bioprospecting of the prenol hemiterpenoid: scientific and technological contribution and prospects for the development of a medicament. ALEXANDRE XAVIER DE LIRA DA SILVA. Advisor: Maria das Graças Freire de Medeiros. Master's qualification. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2016.

ABSTRACT

The search for new molecules with pharmacological properties present in plants is an area of growing interest. The prenol hemiterpenoid, used as an intermediate in the chemical industry for the synthesis of drugs and aromatic chemicals, naturally occurring in citrus fruits and plant species in the Northeast region, as *Malpighia sp.* (acerola fruit), *Spondias tuberosa* L. (umbu tree), *Theobroma Grandiflorum* Schum (cupuaçu), *Morinda citrifolia* (noni fruit), *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Passiflora incarnata* (passion fruit). Due to the limited literature on the biological effects of prenol, and emphasizing the importance of terpenoids as sources for the development of new drugs, toxicological and pharmacological studies were conducted in order to contribute to the development of new drugs. Primarily a scientific and technological prospecting on the biological properties of Hemiterpenes was carried out through the search of scientific articles and patent applications filed in national and global databases, where it was observed that most of the work is of Asian origin and none from Brazil. In Brazil there is also no record of protected Hemiterpenes, showing a gap in this area of research. The assessment of acute toxicity of prenol on biochemical parameters, hematological, physiological and behavioral in mice and the cytotoxicity forward microcrustacean *Artemia salina* were performed with the intention of subsidize the following steps. During the toxicity test, no deaths were recorded at doses of 300 and 2000 mg/kg⁻¹, which allows to estimate a LD50 range between 2000 and 5000 mg/kg⁻¹. The prenol did not alter body weight of the animals, water consumption, feed and excreta volume during the 14 days of observation. The signs and symptoms of toxicity were observed only at the highest dose. Hematological and biochemical parameters were presented, mostly within the reference range, observing small changes in the values of segmented neutrophils, glucose and uric acid. Prenol the cytotoxicity results on *Artemia salina* showed low toxicity with LC50 estimated at approximately 2944,14 µg/mL (32,58 mM). The antioxidant activity in vitro of hemiterpene prenol was evaluated by inhibiting the hydroxyl radical, nitrite, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid (ABTS). The prenol exhibited antioxidant potential in vitro against the hydroxyl radical, significantly higher than standard ascorbic acid (AA) was similar to that facing the radical nitrite and TBARS and lower forward to synthetic radical DPPH and ABTS. It could be suggested that the prenol can form a complex with free radicals by donating hydrogen atoms, converting them into less reactive species. The prenol was further assessed regarding the antimicrobial activities and its interference with antibiotic activity. Preliminary in vitro tests indicate that the prenol no significant activity from the clinical point of view (MIC ≥ 1024 mg / mL) compared to the analyzed strains; however, showed modulating activity of the quinolone ciprofloxacin and norfloxacin (reduction of 75% and 50%, respectively, of the MIC value against the *Staphylococcus aureus* SA1199B). The present results enrich the literature on this hemiterpenóide and bring prospects to conduct new tests that allow the use of prenol as phytomedicine or biotech product.

Keywords: 3-methyl-2-buten-1-ol; hemiterpene; Natural products; Bioprospection.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos efetivos no tratamento de algumas patologias ainda sem tratamento adequado ou que possam substituir os existentes sem muitos ônus ou dotados com menos efeitos colaterais têm impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. Os produtos naturais ainda desempenham um papel significativo na descoberta de novas drogas e no desenvolvimento desta área (CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2013).

A identificação de componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação vêm sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia. A busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças é um área de interesse crescente de diversos grupos de pesquisa. (BRAZ FILHO, 2010).

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas indústrias farmacêuticas nos últimos anos. A pesquisa com plantas tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Várias substâncias extraídas dos vegetais são responsáveis por sua aplicabilidade em áreas como alimentação e saúde, o que tem servido de estímulo ao desenvolvimento do estudo químico de muitas plantas; os compostos resultantes do metabolismo podem ser classificados em metabólitos primários que são os glicídios, proteínas e lipídios, estudados principalmente no âmbito da bioquímica, e metabólitos secundário, que são os compostos terpênicos, alcalóides, flavonóides, taninos, glicosídeos e vários outros estudados dentro do que se convencionou denominar química de produtos naturais (SILVA, 2010).

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas, além de servir como protótipo para sintetizar outras drogas, permite o isolamento de muitas substâncias que são utilizadas clinicamente. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas (BESSA et al, 2013).

A biodiversidade brasileira oferece inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de pesquisas que propiciem, simultaneamente, sua preservação, com base em seu conhecimento mais detalhado, e inovação, por meio da descoberta de substâncias com potencial aplicação nas indústrias química e farmacêutica. (OLIVEIRA, PUPO e VIEIRA, 2013).

O processo de trazer à comercialização um novo medicamento é iniciado com a descoberta de uma nova molécula com efeito terapêutico, conhecida como NEQ – nova entidade química (ou NCE, de *New Chemical Entity*). O processo de pesquisa compreende as fases de screening, desenho molecular, estudos farmacológicos e toxicológicos, clínicos de eficácia e segurança até o patenteamento do fármaco a partir de uma molécula promissora que tem grande potencial de interação com o alvo, e que será objeto do desenvolvimento futuro (GONÇALVES, 2013).

Conforme o exposto acima e sabendo da existência da necessidade de novos medicamentos eficazes, seguros e acessíveis para controle e tratamento de doenças, uma das principais justificativas para a realização desse trabalho consiste na identificação de possíveis efeitos de um hemiterpenóide, direcionados futuramente ao tratamento de doenças antimicrobianas e/ou ações no sistema nervoso central. Dessa forma, o presente estudo denominado **“BIOPROSPECÇÃO DO HEMITERPENÓIDE PRENOL: CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICO-TECNOLÓGICA E PERSPECTIVAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM MEDICAMENTO”** visa enriquecer a literatura acerca deste terpenóide e caso as propriedades a serem pesquisadas sejam confirmadas, permitir o delineamento de uma nova alternativa segura e eficaz como fitomedicamento ou produto biotecnológico.

O trabalho foi dividido em 04 capítulos. No capítulo I foi realizada uma prospecção científica e tecnológica sobre as propriedades biológicas dos hemiterpenos, por meio do levantamento de artigos científicos e nos depósitos de patentes em bancos nacionais e mundiais. O capítulo II teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do hemiterpenóide prenol frente ao microcrustáceo *Artemia salina* bem como a toxicidade aguda sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos, fisiológicos e comportamentais em camundongos *mus musculus* (*swiss*). No capítulo III avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* via inibição dos radicais hidroxila, nitrito, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^o) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{o+}). O capítulo IV teve como objetivo avaliar as atividades esquistossomicida, antimicrobiana e investigar a interferência do prenol na atividade de antibióticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar as possíveis atividades toxicológicas e farmacológicas do hemiterpenóide prenol e explorar seu possível potencial antioxidante por meio da modulação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo *in vitro*, efeitos anti-helmínticos sobre *Schistosoma mansoni* e antimicrobianos sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica em relação aos hemiterpenos e suas propriedades biológicas em bases de dados eletrônicas e bancos de patentes.
- Avaliar a toxicidade aguda do hemiterpenóide prenol nas doses de 300 e 2000 mg/kg por via oral, sobre os parâmetros comportamentais, fisiológicos, bioquímicos e hematológicos em camundongos fêmeas (*mus musculus*) linhagem *swiss*;
- Estimar a dose letal 50% (DL₅₀) do prenol baseado no Guia 423 da OECD (2001)
- Avaliar a citotoxicidade preliminar, determinando a Concentração letal média (CL₅₀) frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* do prenol por meio da determinação dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito e radical hidroxila bem como esclarecer o seu potencial mecanismo de ação;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do prenol contra os radicais sintéticos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•⁺);
- Determinar a atividade antimicrobiana do prenol e a concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* bem como a modulação com fluorquinolonas;
- Avaliar a atividade esquistossomicida do prenol em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e avaliar o seu efeito sobre a motilidade, integridade do tegumento e taxa de mortalidade.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Inovação Farmacêutica e Tecnológica

O conceito de inovação tecnológica está ligado à introdução de um novo produto ou novo processo industrial e, sobretudo, à ideia de sua introdução no mercado, sem o que não há inovação. Se uma invenção não é desenvolvida para fins de apropriação comercial, ela termina caindo no esquecimento e não melhora a qualidade de vida das pessoas. Ou seja, uma invenção deve ser apropriada comercialmente para obter valor de uso e se tornar uma inovação. No caso da indústria farmacêutica, inovar significa disponibilizar comercialmente para o consumo humano um novo medicamento para o tratamento de doenças. (YAMAGUISHI, 2014).

A indústria farmacêutica é intensiva em conhecimento e tem características singulares. Sua estrutura de mercado é concentrada, com significativas barreiras à entrada e visíveis assimetrias de informação. O lançamento de novas drogas ou procedimentos médicos mais eficazes, ao mesmo tempo em que amplia a competitividade das empresas, pode propiciar qualidade de vida para a população, caracterizando-se como alvo de políticas públicas. Assim, a ampliação de investimentos nessa indústria pode atender simultaneamente a dois objetivos caros a qualquer governo: o social e o econômico (PALMEIRA FILHO et al., 2012).

Descobrir um novo princípio ativo, ou uma nova molécula, é uma invenção de uma nova entidade química, mas somente será uma inovação quando tiver sua eficácia comprovada no combate a uma doença, e seu consumo for viabilizado por meio de um novo medicamento colocado no mercado. A origem de uma nova droga geralmente é traçada pelos esforços colaborativos e decisões tomadas entre financiadores, executivos e cientistas, dentre outros profissionais do corpo diretivo de uma empresa ou de um aglomerado de empresas. As idéias para uma nova droga medicinal são o resultado direto da avaliação das necessidades e oportunidades de mercado, em uma dada área terapêutica (GONÇALVES, 2013).

Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna. A área de P&D de fármacos vem crescendo de forma acentuada no Brasil. Essa tendência deve ser ampliada cada vez mais, mediante investimentos em infraestrutura, qualificação de pessoal e em pesquisa, incentivando um desenvolvimento regional mais equilibrado e a consolidação de parcerias entre universidade, governo e indústria (MCTI, 2012).

O compromisso comum é integrar ações, participar e contribuir da melhor maneira possível para o avanço do conhecimento científico e do domínio tecnológico. É essencial somar esforços de forma organizada, articular estratégias de captação de recursos financeiros, materiais e humanos, consolidar ideias e encontrar novas soluções para que se possa evoluir, nas próximas décadas, de uma nação emergente para uma potência mundial na área de fármacos e medicamentos (GUIDO, ANDRICOPULO e OLIVA, 2010).

3.2 Estresse oxidativo.

É de conhecimento que a molécula de oxigênio, além de atuar como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial pode ainda originar espécies químicas capazes de reagir com as demais biomoléculas, principalmente proteínas e fosfolipídeos, inativando-as e, assim, prejudicando o metabolismo intracelular. Essas substâncias originadas a partir do oxigênio são chamadas de radicais livres (VOET et al, 2013). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica.

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isso permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Alguns exemplos são: OH^\bullet (íon hidroxila), HOH^\bullet (íon peroxil), O_2^\bullet (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e O_2 (oxigênio molecular singleto), além do peróxido de hidrogênio, que não é um radical livre propriamente dito, mas é um forte agente oxidante. Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor (MARTELLI e NUNES, 2014).

Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), respectivamente, além de outras espécies reativas, que são partes integrantes do metabolismo humano. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. (NOGUEIRA NETO, SOUSA e FREITAS, 2013).

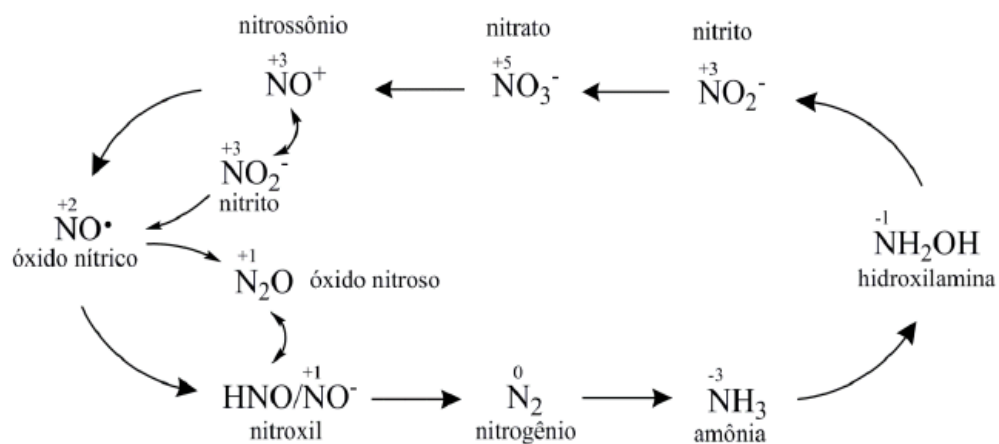
Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente. A célula, unidade da vida, é uma verdadeira usina de pró e antioxidantes (GIACOMINI, HAHN e SIQUEIRA, 2013).

Tabela 1. Redução do oxigênio a espécies reativas encontradas no organismo.

$\text{O}_2 + 1\text{e}^- \rightarrow \bullet\text{O}_2^-$ (radical ânion superóxido)
$\bullet\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \bullet\text{HO}_2^-$ (radical hidroperoxila)
$\bullet\text{HO}_2^- + 1\text{e}^- + \text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ (peróxido de hidrogênio)
$\text{H}_2\text{O}_2 + 1\text{e}^- \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ (radical hidroxila)

Adaptado de MARTELLI e NUNES, 2014.

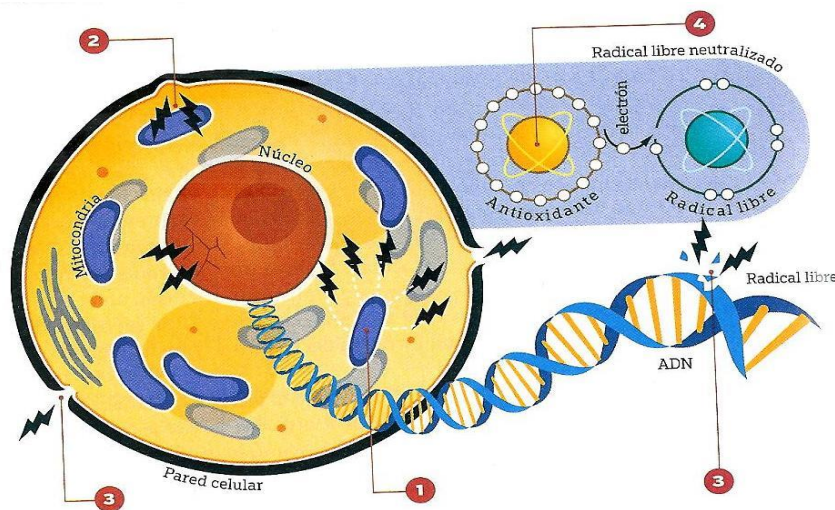
A molécula de óxido nítrico sempre foi reconhecida como uma parte importante do ciclo redox de moléculas nitrogenadas na natureza (Ilustração 1). Evolutivamente desencadeado pela fixação da molécula de N_2 por bactérias, plantas e fungos que posteriormente originam espécies como amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-), o ciclo do nitrogênio é responsável por prover nitrogênio para muitas das estruturas vitais aos seres vivos, como o DNA. Entretanto, considerando o nível molecular, os processos de óxido-redução envolvidos nestas transformações são catalisados por um grande número de metaloenzimas que tem na formação de espécies intermediárias altamente reativas, como $\text{NO}\bullet$, HNO/NO^- e NH_2OH , notadamente moléculas instáveis que geram outras espécies reativas e que podem desencadear processos deletérios nas células (SOUZA, 2014).

Ilustração 1. Ciclo bioquímico do Nitrogênio.

Fonte: Souza, 2014.

Há na literatura fortes evidências de que o estresse oxidativo tem extrema importância nos processos de transformação, morte celular e envelhecimento em processos patológicos, como indução do câncer e falha no controle e propagação do vírus HIV+ em pacientes soropositivos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), e na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças autoimunes, como espondilite anquilosante e artrite reumatóide (MAEN e COCK, 2015), cardiopatias (ALFADDA e SALLAM, 2012), câncer (RÍOS-ARRABAL et al. 2013), intoxicação por xenobióticos e outras (XINYUAN et al, 2013); Entre seus efeitos deletérios está a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e ao próprio DNA (NOGUEIRA NETO et al, 2013) vide ilustração 2.

Ilustração 2. Esquematização dos alvos celulares dos radicais livres.



- 1 - Estimulando mitocôndrias a produzir mais EROs e ERNs.
- 2 - Lesando diretamente as mitocôndrias.
- 3 - Lesando o DNA celular ou oxidando proteínas.
- 4 - Lesando a parede celular ou peroxidando lipídeos.

Fonte: Pixabay, 2016.

Atualmente existe um grande interesse no estudo com agentes antioxidantes especialmente devido às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Dessa forma, justifica-se a importância do trabalho, em identificar o potencial antioxidante de terpeno, no caso o prenol, uma vez que muitos produtos de origem natural apresentam a capacidade de neutralizar estes radicais livres.

3.3 Doenças Infecciosas

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou a forma de tratar essas infecções, ocasionando a drástica redução da mortalidade por doenças microbianas. Entretanto, a disseminação do uso de antibióticos fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas a estes agentes, com consequente aparecimento de resistência (AZEVEDO e SILVA, 2012). A resistência microbiana pode ser definida como uma resposta do micro-organismo, o qual cria estratégias para driblar os diversos mecanismos medicamentosos (BOLIVAR et al., 2011).

Diante desse contexto, o uso excessivo e irracional dos antimicrobianos se tornou motivo de preocupação mundial, já que o surgimento dessas cepas microbianas cada vez menos sensíveis aumenta a chance de falha na terapia medicamentosa, esgotando as possibilidades de tratamento e até mesmo elevando o índice de mortalidade (ARIAS e CARRILHO, 2012). O agravamento desse quadro incentivou a investigação de produtos naturais com tal atividade, uma vez que diversas substâncias com potencial antimicrobiano são produzidas pelas plantas (DAS, TIWARI e SHRIVASTAVA, 2010).

Na maioria dos casos, a drástica redução da população bacteriana obtida pelo agente quimioterápico permite que as defesas naturais do hospedeiro possam lidar efetivamente com os patógenos invasores. Entretanto, isso não ocorrerá se a infecção for causada por uma população de bactérias inteiramente resistentes ao fármaco ou se as defesas humanas estiverem momentaneamente deficientes (DIAS e MONTEIRO, 2010; KAPLAN et al, 2013).

Outros microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza são os fungos. O problema do tratamento das infecções fúngicas pode ser justificado pelo limitado arsenal de drogas antifúngicas comparadas com as drogas antibacterianas, pelo aparecimento de vários efeitos colaterais à terapia com medicamentos convencionais e pela seleção de cepas resistentes aos fármacos utilizados (MAGALHÃES, 2009).

O arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, sendo clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Muitas dessas drogas pertencem ao mesmo grupo de ação farmacológica (mesmo mecanismo de ação); contudo, os fungos respondem de forma significativamente diferente quanto à susceptibilidade a elas (FREIRES et al, 2011).

Tendo em vista a crescente importância clínica e epidemiológica dispensada às infecções microbianas e a necessidade de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos para os indivíduos acometidos, numerosas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na expectativa de se obter novos produtos (FIGUEREDO et al, 2013). Vários trabalhos vêm demonstrando a

importância do estudo de produtos naturais como fonte alternativa para novos antimicrobianos ou que venham potencializar os já existentes (MENEZES e LIMA, 2013).

A esquistossomose, típica de locais de baixo desenvolvimento e como uma das doenças negligenciadas mais prevalentes, também apresenta as mesmas complicações em relação a arsenal terapêutico limitado e presença de resistência de muitos vermes de *S.mansoni* principalmente ao praziquantel.

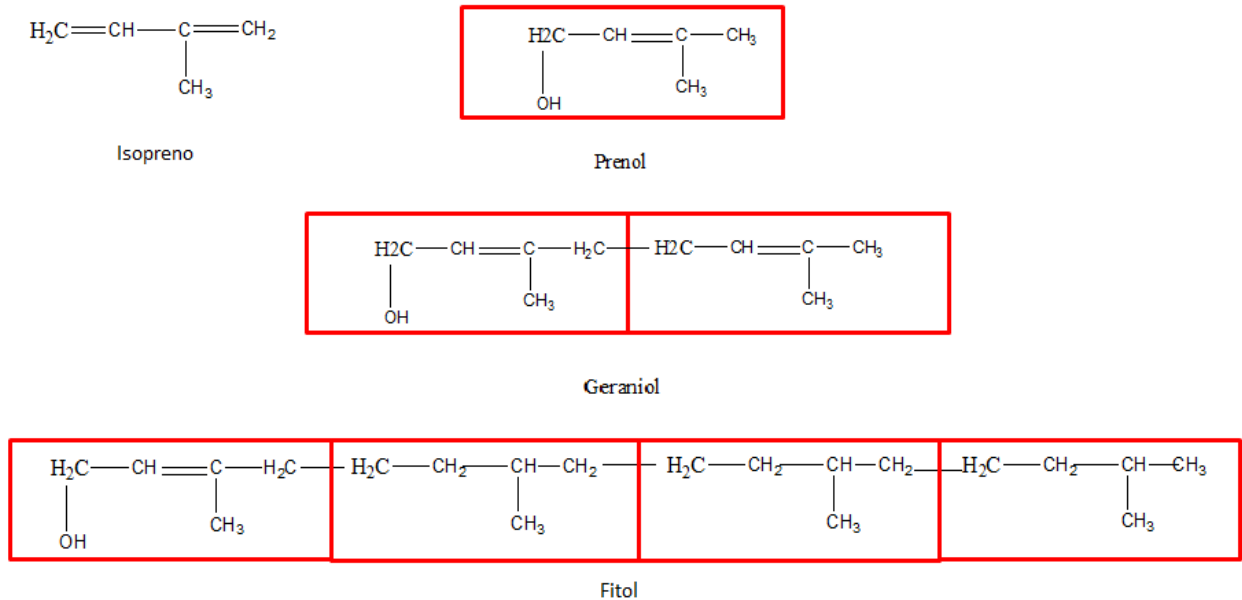
Dessa forma, é mais um enfoque do trabalho investigar os efeitos do prenil a cepas de bactérias e fungos a fim de determinar se o mesmo possui alguma ação frente a estes microorganismos.

3.4 Terpenos e Terpenóides

A relação do isopreno com os terpenos, durante muito tempo foi considerada meramente formal, já que, o isopreno nunca tinha sido isolado nos vegetais. Contudo, após seu isolamento de algumas espécies vegetais descobriu-se que sua relação com estes não ocorre ao acaso (FRANZ, 2010). O conhecimento das unidades isoprênicas, como componente da estrutura dos terpenos, tem sido de fundamental importância na elucidação de suas estruturas. Os isoprenóides são um vasto grupo de biomoléculas que contém unidades estruturais repetidas de cinco carbonos conhecidas como unidades de isopreno (ilustração 3). São subdivididos em terpenos (e seus derivados oxigenados, os terpenóides) e esteróides. (COLOMA et al, 2011).

Os terpenos são um enorme grupo de substâncias encontradas em óleos essenciais de plantas e são classificados de acordo com o número de resíduos de isopreno que contém. (SANTOS, 2010). Têm como origem biossintética a rota do ácido mevalônico (ilustração 4) e (com algumas exceções), tem um esqueleto com um número de átomos múltiplo de 5 classificados como: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}); diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), esteróides (C_{18} a C_{30}) e tetraterpenos carotenóides (C_{40}) (YADAVA, YADAVA e GOYALB, 2014).

Ilustração 3. Esquematização da formação dos terpenos baseado nas unidades isoprênicas.

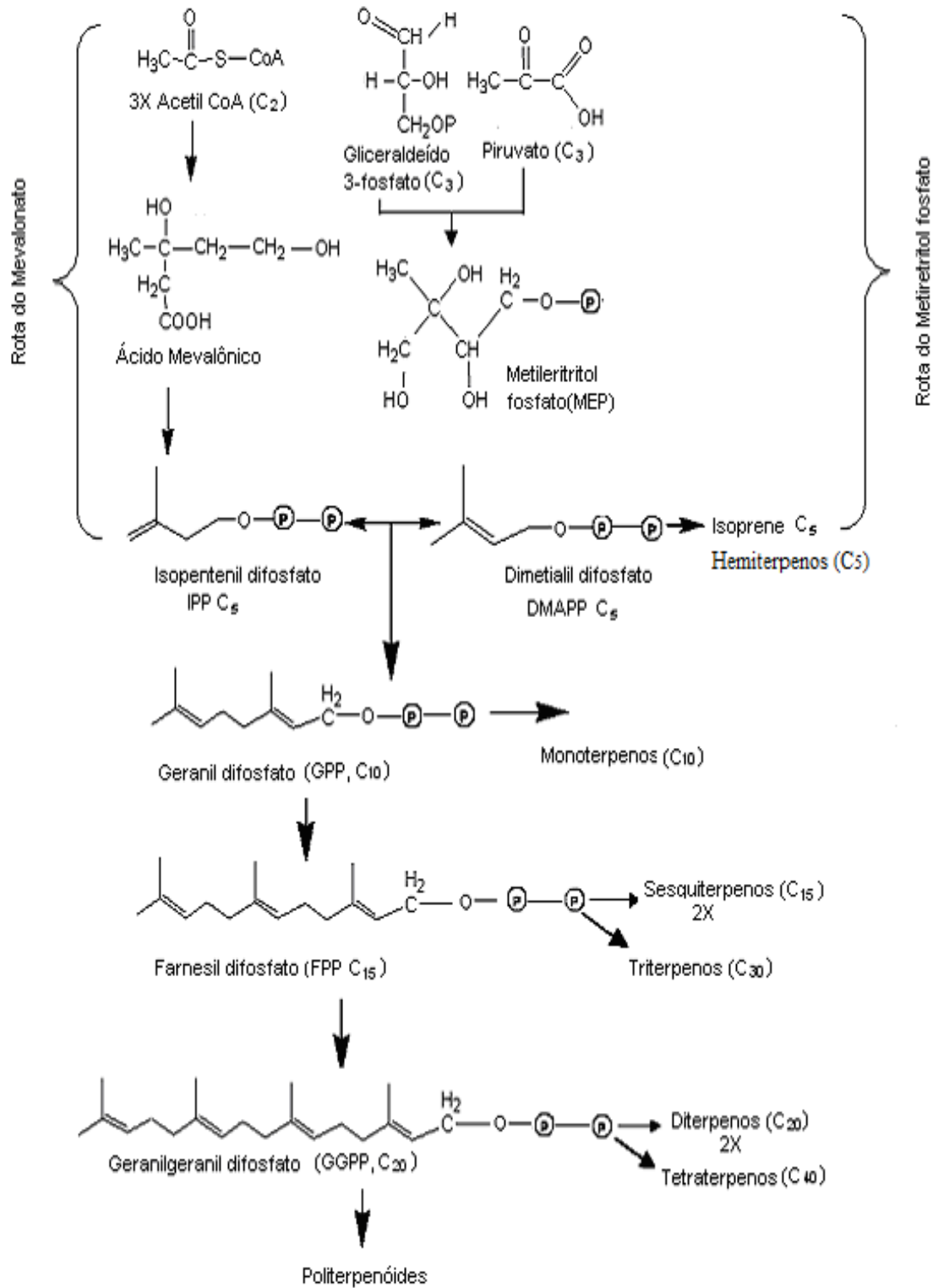


Legenda: Na figura, o prenol representa um hemiterpeno, o geraniol um monoterpeno e o fitol um diterpeno. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2016.

A unidade básica de todo isoprenóide é uma molécula de cinco carbonos de fórmula C₅H₈, o isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Ilustração 4). Assim, todo composto isoprênico possui um esqueleto carbônico básico com fórmula (C₅H₈)_n. Dependendo da classe de composto isoprênico, essa fórmula pode apresentar variações pela adição de hidroxilas, ciclização da molécula ou outras modificações. Os carotenóides são importantes isoprenóides simples que funcionam como antioxidantes e como precursores de vitamina A (SUSSMANN, 2010).

Essas moléculas, com extensa variedade nas plantas, apresentam diversas propriedades biológicas já relatadas na literatura, entre elas antimicrobianas, antifúngicas, citotóxicas (SHARIFI-RAD et al, 2015), esquitossomicidas (DONG et al, 2014), antidepressivas, ansiolíticas (CEREMUGA et al, 2015), antioxidantes (COSTA et al, 2012), antinociceptivas, anti-inflamatórias (JIANG et al, 2015), entre outras. Hemi, mono e sesquiterpenos são compostos importantes na criação de aromas.

Ilustração 4. Esquema da síntese de terpenos e sua classificação de acordo com as unidades de isopreno.



Fonte: Garcia e Carril, 2009.

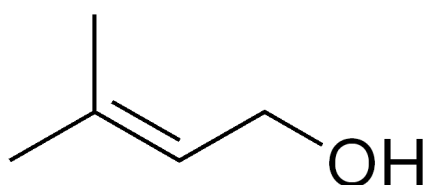
3.4.1 Prenol (3-metil-2-buten-1-ol).

O isopreno, teoricamente seria considerado o único hemiterpeno, haja vista ser o esqueleto fundamental dos terpenos e a única molécula com cinco carbonos a seguir à regra da fórmula $(C_5H_8)_n$; entretanto, há inúmeros derivados do isopreno com outros elementos ligados à estrutura molecular; um exemplo são aqueles que contêm oxigênio, como o prenol ou o ácido isovalérico, denominados de hemiterpenóides; como já relatado, terpenóide é todo aquele composto terpênico que apresenta O_2 na sua estrutura (ZEPKA, 2011).

O Hemiterpenóide prenol (3-metil-2-buten-1-ol, também conhecido como álcool prenílico) é um líquido incolor à temperatura ambiente e com odor característico; Sua fórmula molecular é $C_5H_{10}O$ e massa molecular de 86,1. Apresenta ponto de fusão a $-59.3^\circ C$ e ponto de ebulição a $140^\circ C$; densidade de 0.85 g/cm^3 ; Solubilidade em água de 170 g/L a $20^\circ C$ (elevada); Pressão de vapor (Pa a $20^\circ C$) de 140 (NIOSH, 2010).

O prenol é utilizado principalmente como intermediário na indústria química, para a síntese de ingredientes ativos (fármacos) e químicos aromáticos. Uma fração menor (estima-se um máximo de 50 toneladas) é utilizada como agente aromatizante e em cosmética a um nível máximo de 0,1%. O álcool prenílico é um intermediário na fabricação de citral, especialidade química utilizada nas indústrias de aromas e fragrâncias, bem como na fabricação de vitaminas A e E, drogas antiacne e vários carotenóides utilizados, incluindo o betacaroteno (MCGINTY et al, 2010).

Ilustração 5. Estrutura química do 3-metil-2-buten-1-ol ou prenol.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

O prenol utilizado neste trabalho é de origem sintética; foi sintetizado no laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, pelo professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, e cedido em forma de colaboração aos professores Dr.(es) Rivelilson Mendes de Freitas e Maria das Graças Freire de Medeiros, orientadores desta pesquisa.

O prenol, entretanto, ocorre naturalmente em diversas frutas cítricas como amora preta (*Rubus* spp.), mirtilo (*Vaccinium myrtilus*), groselha (*Ribes uva-crispa*), maracujá (*Passiflora incarnata*), uva (*Vitis* sp.), framboesa (*Rubus idaeus*), no tomate (*Solanum lycopersicum*), café verde (*Coffea arabica* L.) e lúpulo (*Humulus lupulus*) (OECD/SIDS, 2005). Também foi relatada sua presença em frutos típicos da região nordeste como bacuri (*Platonia insignis*) (FRANCO e JANZANTTI, 2005), noni (*Morinda Citrifolia*) (PINO et al 2010), acerola (*Malpighia* sp.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), umbu (*Spondias tuberosa* L.) e cacau (*Theobroma cacao* L.) (DUARTE et al, 2010; BICAS et al, 2011).

Ilustração 6. Vegetais encontrados no Brasil que possuem o prenol como componente.



Acerola



Amora-Preta



Bacuri



Cacau



Café



Cupuaçu



Framboesa



Groselha



Lúpulo



Maracujá



Mirtilo



Noni



Tomate



Umbu



Uva

Fonte: Mosaico elaborado com imagens disponíveis em <https://pixabay.com/pt/>, 2016.

O hemiterpeno 3-metil-2-buten-1-ol é um “bloco de construção” na fabricação de vários outros terpenos (como farnesol e geraniol) e é encontrado em frutas como em lichia (*Litchi chinensis* Sonn) e ervilha doce (*Lathyrus odoratus* L.), além de produtos de origem animal, como queijo hispânico, e leite de ovelhas. Seu aroma verde frutado sugere o uso em sucos de fruta e flavor floral (LABUDA, 2009).

O prenol é a unidade estrutural dos alcoóis isoprenóides, variando o número de unidades de repetição C_5H_8 (isopreno). O mais simples dos alcoóis isoprenóides é o geraniol (com 2 unidades de repetição C_5H_8), seguido do farnesol (com 3) e de geranilgeraniol (com 4). O prenol é polimerizado por meio de reações de desidratação; quando há, pelo menos, cinco unidades de isopreno, o polímero é chamado um poliprenol. Poliprenóis podem conter até mais de 100 unidades de isopreno ($n = 100$). Eles são importantes para a acilação de proteínas, carotenóides e vitaminas solúveis em gordura A, E e K (CIEPICHAL et al, 2011).

Os prenóis e poliprenóis constituem assim, a mais diversa família de compostos naturais, estando presente em todos os organismos vivos. Até o momento, são conhecidos mais de 30.000 compostos isoprênicos na natureza, sendo metabólitos essenciais para diversas funções celulares, incluindo as ubiquinonas, menaquinonas e plastoquinonas (envolvidas no transporte de elétrons) dolicois (envolvidos na glicosilação de proteínas e pontos de ancoragem de proteínas via âncoras isoprênicas compostos isoprênicos), ligantes de proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais, sendo extremamente necessários para organismos fotossintéticos (SUSSMANN, 2010).

Em relação ao prenol, a literatura é escassa em relação aos seus efeitos biológicos. Até a presente data, não existem estudos sobre a atividade do prenol no sistema nervoso central, investigação de atividade contra bactérias, fungos, nem depósitos nos bancos mundiais de patentes (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Organização Mundial de Propriedade Intelectual - OMPI, Banco Europeu de Patentes - EPO e no Banco Americano de Marcas e Patentes - USPTO) relacionando esses termos. Uma vez que os terpenóides constituem uma importante fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos, este estudo pretende enriquecer a literatura sobre o prenol e mediante resultados satisfatórios, contribuir para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- ALFADDA, A.A.; SALLAM, R.M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, n.1, p.1-14, 2012.
- ARAÚJO, A.C.; LOTUFO NETO, F. A. Nova Classificação Americana Para os Transtornos Mentais – o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v.16, n.1, p.67-82, 2014.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.
- AZEVEDO, C.P.; SILVA, J.O. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v.4, n.7, p.2-17, 2012.
- BANDELOW, B.; SHER, L.; BUNEVICIUS, R. HOLLANDER, E.; KASPER, S.; ZOHAR, J.; MÖLLER, H.J. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive – compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v.16, p.77–84, 2012.
- BESSA, N.G.F.de; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.692-707, 2013.
- BICAS, J.L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**, v.44, n.7, p.1843–1855, 2011.
- BOLIVAR, P.; CRUZ-PAREDES, C.; HERNÁNDEZ, L. R.; JUÁREZ, Z. N.; SÁNCHEZ-ARREOLA, E.; AV-GAY, Y.; BACH, H. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p. 141-147, 2011.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.
- CEREMUGA, T.E.; VALDIVIESO, D.; KENNER, C.; LUCIA, A.; LATHROP, K.; STAILEY, O.; BAILEY, H.; CRISS, J.; LINTON, J.; FRIED, J.; TAYLOR, A.; PADRON, G.; JOHNSON, A.D. Evaluation of the anxiolytic and antidepressant effects of asiatic acid, a compound from *Gotu kola* or *Centella asiatica*, in the male Sprague Dawley rat. **Journal of the American Association of Nurse Anesthetists**, v.83, n.2, p.91-8, 2015.

CIEPICHAL, E.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; HERTEL, J.; SWIEZEWSKA, E.; STRZALKA, K. Configuration of polyisoprenoids affects the permeability and thermotropic properties of phospholipid/polyisoprenoid model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.164, n.4, p.300-306, 2011.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n.2, p. 245-260, 2011.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Básica e Aplicada Farmacêuticas**, v.33, n.4, p.567-75, 2012.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DIAS, M.; MONTEIRO, M.S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, Investigação e Inovação**, v.1, n.1, p.1-10, 2010.

DONG, L.; DUAN, W.; CHEN, J.; SUN, H.; QIAO, C.; XIA, C.M. An artemisinin derivative of praziquantel as an orally active antischistosomal agent. **Plos One**, v.9, n.11, p.112163, 2014.

DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, v.43, n.10, p.1564-1572, 2010.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.32, n.4, p.429-436, 2010.

FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, n.4, p.358-371, 2005.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

FIGUEREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F.F.; TORRES, C.M.G.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v.2013, n.2013, p.1-5, 2013.

FREIRES, I.A.; ALVES, L.A.; JOVITO, V.C.; CASTRO, R.D. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil-Central**, v.20, n.52, p.41-45, 2011.

GARCIA, A.A; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário das plantas. **Reduca (Biologia)**, série fisiologia vegetal. Uruguai, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GIACOMINI, M.M.; HAHN, S.; SIQUEIRA, L.O. Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.2, p.251-255, 2013.

GONÇALVES, J.A. O Circuito do Medicamento: Da Molécula à Farmácia. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

GOULART, F.A.A. Doenças crônicas não transmissíveis: estratégias de controle e desafios e para os sistemas de saúde. Organização Pan-americana da Saúde (PAHO); 96 p. Brasília 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.

JIANG, J.; SHEN, Y.Y.; LI, J.; LIN, Y.H.; LUO, C.X.; ZHU, D.Y. (+)-Borneol alleviates mechanical hyperalgesia in models of chronic inflammatory and neuropathic pain in mice., **European Journal of Pharmacology**, v.15, n.757, p.53-58, 2015.

KAPLAN, W. WIRTZ, V.J.; MANTEL-TEEuwISSE, A.; DUTHEY, B.; LAING, R. Priority Medicines for Europe and the World 2013. 245p. WHO - World Health Organization; Geneva, 2013.

KESSLER, R.C.; BIRNBAUM, H.G.; SHAHLY, V. Age differences in the prevalence and co-morbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. **Depression and Anxiety**, v.27, n.4, p.351-364, 2010.

LABUDA, I. Flavor compounds. In: Encyclopedia of Microbiology. Moselio Schaechter, Oxford: Elsevier, v.1, p.315-320, 2009.

MAEN, A. COCK, I.E. Inhibitory activity of Australian culinary herb extracts against the bacterial triggers of selected autoimmune diseases. **Pharmacognosy Communications**, v.5, n.2, p.130-139, 2015.

MAGALHÃES, D. V. Atividade antifúngica de derivados sintéticos do Eugenol e timol frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis*. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66, n.3, p.54-57, 2014 .

MCGINTY, D.; JONES, L.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on 3-methyl-2-buten-1-ol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.3, p.64–69, 2010.

MCTI. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação. Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2012 – 2015: balanço das atividades estruturantes 2011. Brasília:

edição e organização Secretaria Executiva do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2012.

MENEZES, C.P.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Cladosporium carrionii*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, n.1, p.49-53, 2013.

MORAES, J.; CARVALHO, A.A.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.; MARQUES, T.H.; 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, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NIOSH, National Institute for Occupational. **Safety and Health**. International Chemical Safety Cards. n.1760, p.1-135, 2010.

NOGUEIRA NETO, J.D.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.1, p.125-130, 2013.

NOGUEIRA NETO, J.D.; Almeida, A.A.C.; Oliveira, J.S.; Santos, P.S.; Sousa, D.P.; Freitas, R.M. Antioxidant Effects of Nerolidol in Mice Hippocampus After Open Field Test. **Neurochemical Research**, v.38, n.9, p.1861-70, 2013.

OECD/SIDS (Organization for Economic Co-operation and Development/Screening Information Datasets). High Production Volume Chemicals 3-Methylbut-2-en-1-ol (Cas No: 556-82-1). 2005. 85p. United Nations Environmental Program, (UNEP) Chemicals, Paris, 2005.

OLIVEIRA, L.G.; PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v.36, n.10, p.1577-1586, 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório sobre a saúde no mundo 2001: Saúde mental – Nova concepção, nova esperança. 1ª ed, 206 p. Genebra; 2002.

PALMEIRA FILHO, P.L.; PIERONI, J.P.; ANTUNES, A.M.S.; MARTINS, J.V.B. O desafio do financiamento à inovação farmacêutica no Brasil: a experiência do BNDES-Profarma. **Revista do BNDES**, n. 37, p. 67-90, 2012.

PINO, J.A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C.E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.183-187, 2010.

REIS, L.; PEREIRA, S.; CARDOSO, L.; GHERARDI-DONATO, E. Transtornos mentais orgânicos em um ambulatório de saúde mental brasileiro. **Revista Portuguesa de Enfermagem de Saúde Mental**, n. 9, p. 48-53, 2013.

RÍOS-ARRABAL, S.; ARTACHO-CORDÓN, F.; LEÓN, J.; ROMÁN-MARINETTO, E.; SALINAS-ASENSIO, M.M., CALVENTE, I.; NÚÑEZ, M.I. Involvement of free radicals in breast cancer. **SpringerPlus**, v.2, n.404, p.1-12, 2013.

SANTOS, R.A.F.; Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do β -sitosterol e triterpenos. 2010. 106 p. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2010.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v.377, n.9781, p.1949-61, 2011.

SHARIFI-RAD, J.; SHARIFI-RAD, M.; HOSEINI-ALFATEMI, S.M.; IRITI, M.; SHARIFI-RAD, M.; SHARIFI-RAD, M. Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Satureja intermedia* C.A.Mey Essential Oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.8, p.17812-17825, 2015.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-16, 2010.

SILVA, T.M.; AGUIAR, O.B.; FONSECA, M.J.M. Associação entre sobrepeso, obesidade e transtornos mentais comuns em nutricionistas. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.64, n.1, p.24-31, 2015.

SOUZA, M.L. A reatividade e as propriedades dos ligantes NO e H₂O em tetraaminas de rutênio. Reações com glutatona e cisteína. 2014. 178 p. Dissertação (Doutorado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, SP, 2014.

SUSSMANN, R.A.C. Biossíntese de Vitamina E nos estágios intraeritrocitários de *Plasmodium falciparum*. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th Edition, 1200p. 2013.

XINYUAN, L.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E.T.; WANG, H. YANG, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**, v.6, n.19, p.1-19, 2013.

YADAVA, N.; YADAVA, R.; GOYAL, A. Chemistry of Terpenoids. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. v.27, n.45, p.272-278, 2014.

YAMAGUISHI, S.H. Gestão da inovação na indústria farmacêutica no Brasil: estudo de múltiplos casos. 2014. 220 p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia Nuclear – Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2014.

ZEPKA, A.P.S. Emissão de isopreno por plantações de eucalipto e sua influencia na formação de ozônio troposférico. 2011. 203 p. Tese (Doutorado em Geofísica Espacial/Ciências Atmosféricas) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2011.



CAPÍTULO I - Propriedades biológicas dos hemiterpenos: uma prospecção científica e tecnológica.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS HEMITERPENOS: UMA PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

Alexandre Xavier de Lira da Silva¹; Brenda Nayranne Gomes dos Santos²; Oskar Almeida Silva²; Rivelilson Mendes de Freitas²; Maria das Graças Freire de Medeiros²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

Resumo: Terpenos e terpenóides são uma grande classe de metabólitos vegetais naturais advindos do isopreno como sua unidade estrutural; incluem os hemiterpenos, monoterpenos sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos. Possuem diversas propriedades biológicas já relatadas na literatura e podem ser utilizados como medicamentos, especiarias e matérias-primas para a indústria. O objetivo do trabalho é realizar uma prospecção científica e tecnológica referente aos os hemiterpenos e suas propriedades biológicas, por meio do levantamento de artigos científicos em bases de dados especializadas (LILACS, IBECs, MEDLINE, SciELO, Biblioteca Cochrane, *Springer Link*, *Science Direct*) e com base nos depósitos de patentes no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO), Banco Europeu de Patentes (EPO) e no Banco Americano de Marcas e Patentes (USPTO), respectivamente. Associando-se os termos “*Hemiterpene/Hemiterpeno*” e *biological activities/atividades biológicas* foram encontrados 98 artigos científicos na base de dados *ScienceDirect*, 56 artigos na base *Springer Link*, 32 artigos na base *Medline/PubMed*, 31 artigos na base da *Biblioteca Cochrane*, 1 artigo na *Lilacs* e nenhum nas bases *Scielo* e *IBECs*, sendo a maior parte dessa literatura de origem asiática e europeia. No total são citados 34, 19 e 14 depósitos envolvendo hemiterpenos nas bases americana (USPTO), europeia (EPO) e mundial (WIPO), respectivamente. Não há relato de nenhum depósito de patente na base brasileira (INPI). Excluindo-se os casos de duplicidade nas bases de dados (principalmente EPO e WIPO), o total de hemiterpenos que apresentem alguma alegação biológica e que foram protegidos não passa de oito, sendo também a maior parte de países asiáticos. Conclui-se que poucos há poucos estudos acerca das propriedades biológicas de hemiterpenos, evidenciando uma lacuna nesta área de pesquisa, especialmente no caso de países ricos em biodiversidade, como é o caso do nosso país.

Palavras-chave: Hemiterpenos; Propriedades biológicas; Plantas.

INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas indústrias farmacêuticas nos últimos anos. A pesquisa com plantas tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Várias substâncias extraídas dos vegetais são responsáveis por sua aplicabilidade em áreas como alimentação e saúde, o que tem servido de estímulo ao desenvolvimento do estudo químico de muitas plantas; (SILVA, 2010). Terpenos e terpenóides são uma grande classe de metabólitos vegetais naturais advindos do isopreno como sua unidade estrutural; incluem os hemiterpenos (formados por uma unidade isoprênica; ex. ácido angélico), monoterpenos (duas unidades de isopreno; ex. limoneno), sesquiterpeno (três unidades de isopreno; ex. artemisinina), diterpenos (quatro unidades isopreno; ex. giberelinas), os sesterterpenos (cinco unidades isoprênicas), os triterpenos (seis unidades de isopreno; ex. esteróis vegetais) e os tetraterpenos (contendo oito unidades de isopreno; ex. carotenóides). (ZHAO et al, 2014).

Os hemiterpenos são os mais simples de todos os terpenos. Eles acumulam-se em tecidos de plantas e podem ser encontrados em associação com outros compostos (alcalóides, cumarinas, e/ou flavonóides). Alguns terpenóides são necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas, ao passo que outras desempenham papéis importantes em interações destas com o meio ambiente. Além disso, terpenóides podem ser utilizados como medicamentos, especiarias e matérias-primas para a indústria (SINGH e SHARMA, 2015).

O objetivo do trabalho foi realizar uma prospecção científica referente aos hemiterpenos e suas propriedades biológicas *in vitro* ou *in vivo* e uma prospecção tecnológica referente à proteção patentária dessa classe de moléculas.

METODOLOGIA

A prospecção científica foi realizada mediante levantamento de artigos científicos em bases de dados especializadas: Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde (LILACS), Índice Bibliográfico Espanhol de Ciências da Saúde (IBECS), Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* ou MEDLINE/PubMed), *Biblioteca Científica Eletrônica em Linha (Scientific Electronic Library Online* ou SciELO) e Biblioteca Cochrane, integradas à Biblioteca Virtual em Saúde (BVS)

do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME); bases de dados *Springer Link*, da Editora Springer e *Science Direct* de textos completos revisados por pares da editora *Elsevier*.

O período de coleta dos dados ocorreu entre os meses de junho a agosto de 2015. Como descritores foram utilizadas as palavras “hemiterpeno” e “atividades biológicas” e seus correspondentes na língua inglesa (*hemiterpene/biological activities*); Como critério de inclusão foram analisados todos os artigos que traziam estes termos, independente do ano. Critérios de exclusão englobaram os trabalhos em duplicidade em mais de uma base e aqueles que não se enquadraram no objetivo da pesquisa. Após a análise prévia dos artigos, seguiu-se a leitura em profundidade para identificação do hemiterpeno, sua espécie vegetal correspondente e as atividades biológicas relatadas.

A prospecção tecnológica foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO), Banco Europeu de Patentes (EPO) e no Banco Americano de Marcas e Patentes (USPTO). Foram utilizados como palavras-chave os termos gerais empregados na prospecção científica: *hemiterpeno/hemiterpene* e *atividades biológicas/biological activities*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

■ Prospecção Científica

Associando-se os termos “*Hemiterpene/Hemiterpeno*” e *biological activities/atividades biológicas* foram encontrados 98 artigos científicos na base *ScienceDirect*, 56 artigos na base *Springer Link*, 32 artigos na base de dados Medline/PubMed, 31 artigos na biblioteca Cochrane, um artigo na Lilacs, e nenhum nas bases Scielo e IBECS. Após a análise prévia de todos os artigos, foram selecionadas as pesquisas que se enquadraram nos objetivos. Por critérios de exclusão, após análise minuciosa, foram desconsiderados todos os artigos em duplicidade ou que não se enquadravam no objetivo do trabalho.

Na **tabela 1** são apresentados o número de artigos nas bases de dados pesquisadas, o período de publicação, o número de artigos descartados segundo os critérios de exclusão e o total de artigos utilizados. São poucos estudos envolvendo a descoberta ou propriedades biológicas dos hemiterpenos em modelos *in vivo* ou *in vitro*.

Tabela 1 - Resultado do número de artigos encontrados e utilizados na prospecção científica de hemiterpenos com propriedades biológicas com base nos bancos de dados consultados.

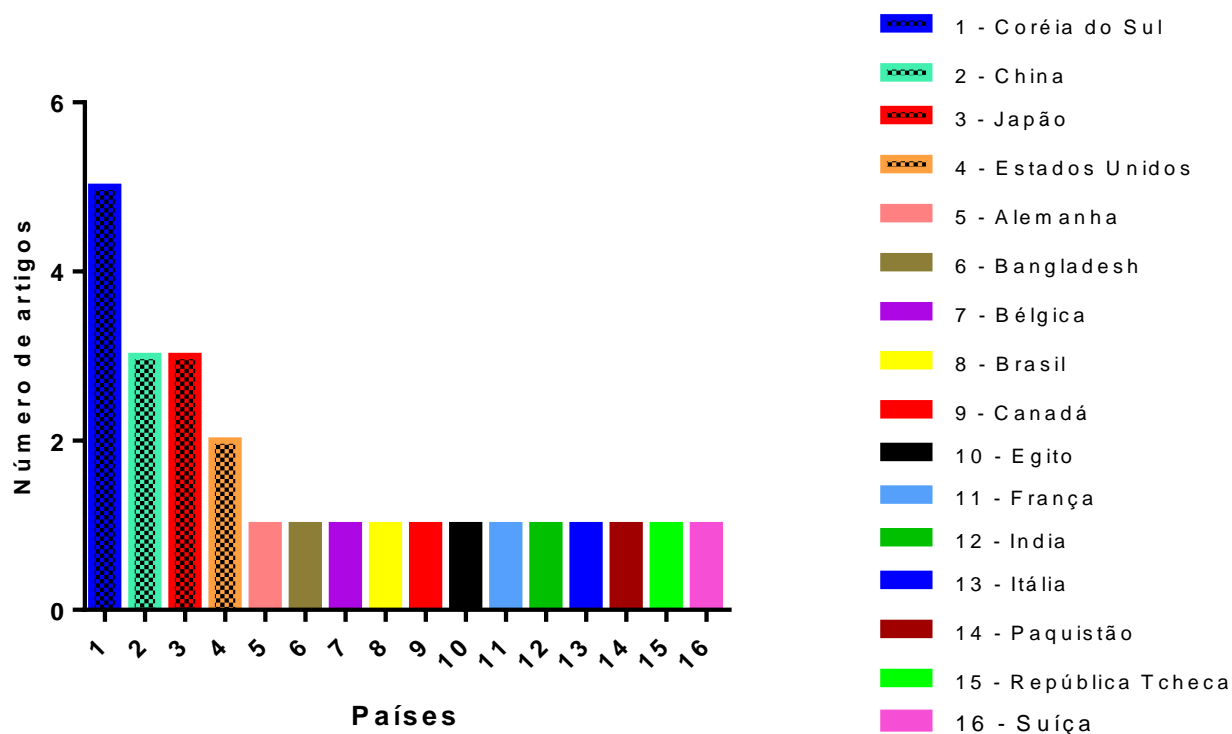
Banco de dados	Artigos citados na busca	Período de publicação	Artigos descartados*	Artigos utilizados
Science Direct	98	1963-2015	78	20
Springer Link	56	1914-2015	53	3
MEDLINE	32	1953-2015	30	2
Biblioteca Cochrane	31	1992-2015	31	0
LILACS	1	1981-2015	1	0
SciELO	0	1909-2015	-	-
IBECS	0	1978-2015	-	-

* Trabalhos que não obedeceram aos critérios de inclusão.

Ao se analisar os países de origem destas produções, observa-se que a maior parte é de origem asiática (Coreia do Sul, China, Japão, Índia, Paquistão e Bangladesh), que corresponde a 56% dos artigos encontrados, seguido da União Europeia com 24% (Alemanha, Bélgica, França, Itália, República Tcheca e Suíça), e América do Norte com 16% (Estados Unidos e Canadá). O Brasil, único representante da América Latina citado na busca, possui um artigo elencado, o que no universo amostral pesquisado representa 4%. (**Gráfico 1**).

O Brasil detém um dos maiores estoques da biodiversidade do planeta. Os recursos naturais existentes em suas regiões tornam-se gradativamente conhecidos, à medida que as pesquisas científicas se intensificam e os resultados apresentam-se disponíveis para a sociedade. Embora, o Brasil detenha um dos maiores bancos de germoplasma *in-situ*, constata-se por parte daqueles que habitam os diferentes biomas uma elevada demanda de conhecimentos sobre o aproveitamento sustentável da biodiversidade. Nesses biomas, a falta de domesticação dos recursos naturais (plantas medicinais, aromáticas e detentoras de metabólitos secundários com propriedades biodefensivas) tem levado à subutilização e extinção de inúmeras espécies vegetais, impondo limitações socioeconômicas e ambientais (CGEE, 2010).

Gráfico 1. Nº de artigos científicos citando hemiterpenos com propriedades biológicas e os países originários das pesquisas.

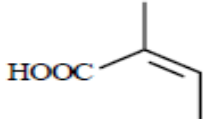
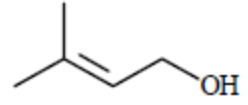
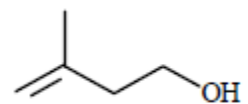
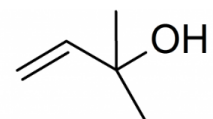
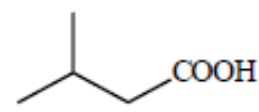
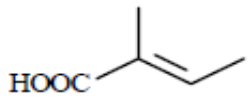
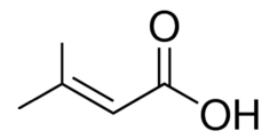


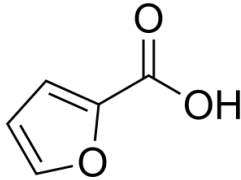
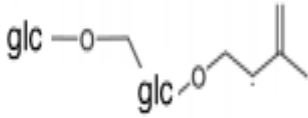
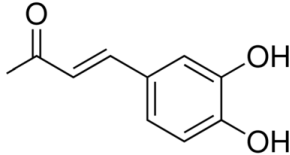
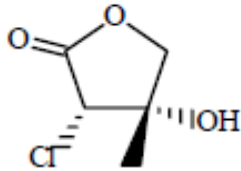
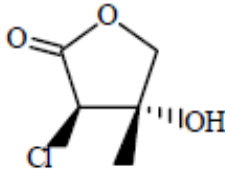
Fonte: Graphpad Prism, versão 6.0. Pesquisa direta, 2015.

Na **tabela 2** são detalhados estes hemiterpenos. Dentro da subdivisão dos terpenóides, os hemiterpenos correspondem a menor classe de compostos; são poucos estudos envolvendo a descoberta ou propriedades biológicas destas substâncias em modelos *in vitro* ou *in vivo*.

Em comparação com outros terpenos, apenas alguns hemiterpenos verdadeiros são encontrados na natureza, e mais de 90 destes ocorrem como glicosídeos (incorporados a açúcares). O próprio isopreno é um hemiterpeno volátil liberado por muitas árvores. Outros Hemiterpenos naturais incluem o prenol (3-metil-2-buten-1-ol), encontrado em flores de *Cananga Odorata* e lúpulo (*Humulus lupulus*). O seu isômero, (S)-(-)-3-metil-3-buten-2-ol é um constituinte dos óleos essenciais de toranja e laranja. Outro hemiterpenóide, o 4-metoxi-2-metil-2-butanediol, é responsável pelo sabor característico da groselha (*Ribes nigrum*). (GUNATILAKA, 2012).


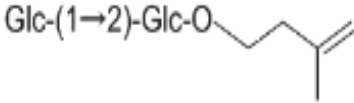
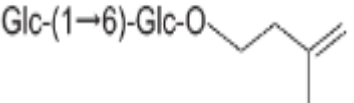
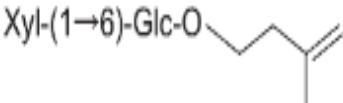
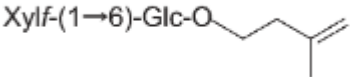
Tabela 2 – Publicações nas bases de dados dos hemiterpenóides em espécies vegetais e suas atividades biológicas (*in vivo* ou *in vitro*).

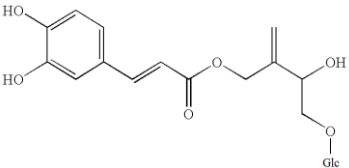
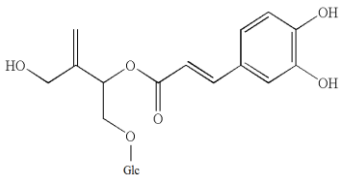
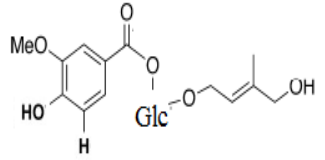
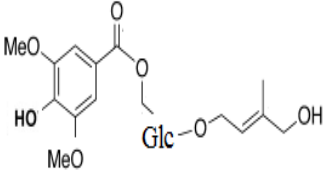
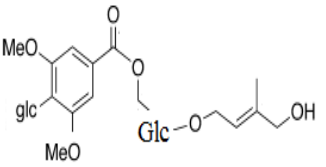
AUTOR / ANO	PERIÓDICO	TERPENÓIDE	ESTRUTURA QUÍMICA	PROPRIEDADE	ESPÉCIE VEGETAL
Wink (2015)	Medicines	Ácido angélico		Antioxidante	<i>Angelica archangelica</i> L.
Joseph et al (2010)	Journal of Advanced Biotechnology	Prenol		Antimicrobiano	<i>Psidium Guajava</i> L.
Hockelmann, Moens e Juttner (2004)	<i>Limnology and Oceanography: Methods</i>	Isoprenol		Quimioatraente de nematódeos	<i>Quercus Ilex</i> L.
Zhang, Schlyter e Birgersson (2012)	Psyche: A Journal of Entomology	2-metil-3-buten-2-ol		Sedativa Hipnótica	<i>Populus tremula</i> L.
Wohlfart, Hansel e Schmidt (1983)	Planta medica				<i>Betula pendula</i> Roth
Ribeiro et al (2007)	Cellular and Molecular Neurobiology	Ácido isovalérico		Inibidor da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	<i>Valeriana Officinalis</i> L.
Chakravarty et al (1997)	Journal of Plant Diseases and Protection	Ácido tíglico		Antifúngico	<i>Schoenocaulon officinale</i> Schlecht.
		Ácido senecióico		Antifúngico	<i>Senecio Mikanioides</i>

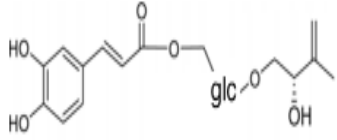
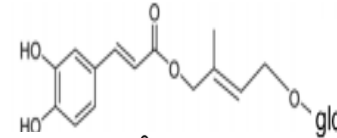
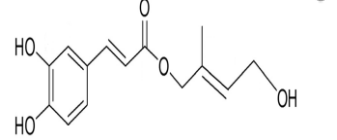
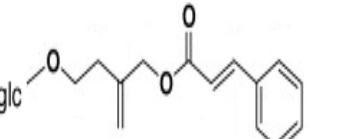
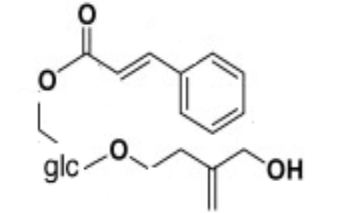
Chai et al (2013)	International Journal of Biological Macromolecules	Ácido 2-furóico		Antimicrobiano Inibidor enzimático Hipolipemiante	<i>Padina pavonica</i> Thivy.
Hall et al (1993)	Journal: Arch Pharm (Weinheim)				
Ono et al (2014)	Natural products research	2-metilbutan-1-ol-β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosideo		Antioxidante	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
Park et al (2013)	Phytochemistry	Derivados do Cafeoil*		Antioxidante Anti-inflamatório	<i>Spiraea prunifolia</i> Siebold & Zuce
XU et al, 2007	Journal of Asian Natural Products Research	Epiutililactona		<i>Imunossupressor</i>	<i>Prinsepia utilis</i> Royle.
		Utililactona		<i>Imunossupressor</i>	<i>Prinsepia utilis</i> Royle.

Akihisa et al (2010)

Journal of oleo science

3-Metill-but-3-enil β -D-glucopiranosideo		Inibidor da melatogênese	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.
Noniosídeo K		Inibidor da melatogênese	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.
Noniosídeo A		Inibidor da melatogênese	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.
Noniosídeo L		Inibidor da melatogênese	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.
Noniosídeo M		Inibidor da melatogênese	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.

Jiang et al (2005)	Journal of Natural Products.	Pubescenosídeo A		Antiplaquetário	<i>Ilex pubescens</i> Hook et Arn.
		Pubescenosídeo B		Antiplaquetário	<i>Ilex pubescens</i> Hook et Arn.
Muhit et al (2015)	Phytochemistry	Potobanosídeo A		Inibidor da hialuronidase	<i>Pothos scandens</i> L.
		Potobanosídeo B		Antitumoral Inibidor da liberação de histamina	<i>Pothos scandens</i> L.
		Potobanosídeo C		Antitumoral Inibidor da liberação de histamina	<i>Pothos scandens</i> L.

		Rotundarpenosídeo A		Antioxidante	<i>Ilex Rotunda</i> Thunb.
Kim et al (2012)	Archives of Pharmacal Research	Rotundarpenosídeo B		Antioxidante	<i>Ilex Rotunda</i> Thunb.
Lee et al (2014)	*European Journal of Pharmacology	Rotundarpeno		Antioxidante Anti-inflamatório Inibidor da apoptose	<i>Ilex Rotunda</i> Thunb.
Kim et al (2014)	*Naunyn Schmiedeberg Archives Pharmacology				
Lee et al (2015)	*International Immunopharmacology				
		2-(trans-cinamoil-oxi-metil)-1-butene-4-O-b-D-glucopiranosídeo		Antioxidante	<i>Spiraea canescens</i> D.Don.
Choudhary et al (2009)	Phytochemistry	4-(6-O-trans-cinamoil)-(2-hidroximetil-4-hidroxi-butenil-b-D-glucopiranosídeo		Antioxidante	<i>Spiraea canescens</i> D.Don.

O ácido angélico é um ácido orgânico monocarboxílico insaturado, encontrado principalmente nas plantas da família *Apiaceae*. Foi isolado pelo farmacêutico alemão Ludwig Andreas Buchner, em 1842, a partir das raízes da planta herbácea angélica (*Angelica archangelica*), que deu origem ao seu nome (WINK, 2015). Ácido angélico, seus sais e ésteres de ácido, chamados angelatos, são componentes ativos de medicamentos à base de plantas utilizada contra vários distúrbios, incluindo dores, febre e pirose (ZNATI et al, 2014).

Um estudo com o isoprenol (3-metil-3-buten-1-ol) com o objetivo de conhecer melhor os fenômenos de atração e repelência, revelou que o mesmo possui a capacidade de atrair por quimiotaxia, nematódeos de água doce (*Bursilla monhystera*) e terrestre (*Caenorhabditis elegans*). Independentemente do tempo de exposição, ambos os vermes foram atraídos pelo hemiterpeno, provando que esta molécula é capaz de ativar receptores de odor destes organismos invertebrados (HOCKELMANN, MOENS E JUTTNER, 2004).

O hemiterpenóide 2-metil-3-buten-2-ol, encontrando no choupo (*Populus tremula*) e em duas espécies de bétula (*Betula pendula* Roth e *Betula pubescens* Ehrh), plantas típicas das florestas temperadas, além de ser um ingrediente de perfumaria usado em cosméticos, produtos de higiene pessoal e produtos de limpeza tem propriedades sedativas e hipnóticas. É formado a partir da Humulona e lupulona (derivadas do ácido α -lupúlico) por reação com radicais OH, seja na presença de oxigênio atmosférico ou radicais OH *in vivo* (ZHANG, SCHLYTER E BIRGERSSON, 2012; WOHLFART, HANSEL E SCHMIDT 1983).

Ao se examinar a composição do óleo essencial extraído de folhas de *Pisidium guajava* L. (goiaba), comprovou-se que o mesmo possui atividade antibacteriana contra micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*), Gram-negativos (*Azotobactor species*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Enterobactor aerogenes*, *Glucanobactor oxidans* e *Pseudomonas fluorescens*) e atividade citotóxica direcionada a linhagem de células tumorais de câncer cervical humano (HeLa). Os compostos majoritários no óleo são o hemiterpeno prenol (3-metil-2-buten-1-ol) e os alcalóides criptonina e benzofenatridina. (JOSEPH et al, 2010).

O ácido isovalérico, encontrado em plantas como *Valeriana officinalis* inibe uma enzima crucial na manutenção do potencial de membrana basal necessária para uma neurotransmissão normal, a Na^+K^+ -ATPase, sendo possível que a inibição dessa enzima esteja relacionada a fenômenos ligados à encefalopatia, especialmente durante as crises de descompensação metabólica, quando os metabólitos tóxicos acumulados aumentam dramaticamente suas concentrações teciduais (RIBEIRO et al, 2007).

Os ácidos seneciólico e tíglico bem como os seus derivados inibiram parcial ou completamente a colonização dos fungos fitopatogênicos *Phellinus tremulae*, *Ophiostoma crassivaginatatum* e *Ophiostoma piliferum*, em concentrações variáveis de 1 a 1000 µg/ml, mostrando-se promissores no tratamento da grafiose ou doença holandesa do *ulmeiro*, típica de plantas do gênero *Ulmus* L (CHAKRAVARTY et al, 1997).

O ácido 2-furóico foi eficaz na redução dos níveis de colesterol e de triglicerídios em ratos (dose de 20mg/kg/dia) além de uma elevação do nível de colesterol HDL. A atividade do receptor de LDL foi reduzida em hepatócitos, células espumosas da aorta, células do epitélio intestinal e fibroblastos. A atividade do receptor de HDL foi elevada nos hepatócitos e células do intestino delgado. Também houve a inibição da atividade da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), enzima presente no fígado que catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir de colesterol (HALL et al, 1993). Este hemiterpeno já foi relatado em *Padina pavonica* (SHOUBAKY e SALEM, 2014).

O ácido furóico também é um inibidor não competitivo e reversível enzima tirosinase, indicando que os grupos funcionais no anel furano desempenham um papel crucial na inibição. Além disso, constatou-se também este hemiterpeno pode inibir a proliferação de bactérias *Salmonella* e *Bacillus subtilis*. Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) do ácido 2-furóico contra *B. subtilis* e *Salmonella* foram de 0,027 e 0,029, µM, respectivamente (CHAI et al, 2013).

Foi identificado no fruto do tomate (*Lycopersicon esculentum*) um novo hemiterpeno, chamado 2-metilbutan-1-ol-β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo. A atividade antioxidante, avaliada pelo método do radical sintético livre DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) foi positiva, com um índice de 76,0% de atividade de eliminação (*scavenging*) do radical, numa concentração de 0,5mM. (ONO et al, 2014).

Foram identificados na planta *Spiraea prunifolia* uma família de hemiterpenos derivados do cafeoil, denominados de: 4'-(6-O-cafeoil-β-D-glucopiranosil)-2'-metil ácido butírico, 1-O-cafeoil-6-O-(4'-hidróxi-2'-metileno-butirol)-β-D-glucopiranosídeo, 1,2-O-dicafeoil-6-O-(4'-hidróxi-2'-metileno-butirol)-β-D-glucopiranosídeo, 1-O-cafeoil-6-O-(4'-cafeoil-2'-metileno-butirol)-β-D-glucopiranosídeo e 1-O-cafeoil-6-O-(4'-cafeoil-3'-hidróxi-2'-metileno-butirol)-β-D-glucopiranosídeo. Todos exibiram atividade antioxidante frente ao radical superóxido (O₂•) e radical livre sintético DPPH•. A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi confirmada frente à inibição da produção de óxido nítrico por linhagens celulares de macrófagos estimuladas por fator LPS. (PARK et al, 2013).

Na *Ilex rotunda*, árvore originária do Japão, foi relatada a presença de dois hemiterpenóides com propriedades antioxidantes: o Rotundarpenosídeo A e Rotundarpenosídeo B, que também demonstraram capacidade sequestradora do radical superóxido ($O_2\bullet$) e radical livre sintético DPPH \bullet . (KIM et al, 2012).

Foram identificaram no fruto noni (*Morinda citrifolia*), cinco hemiterpenóides: o 3-Metil-but-3-enil- β -D-glucopiranosídeo e quatro chamados genericamente de noniosídeos: Noniosídeo A, noniosídeo K, noniosídeo L, noniosídeo M. Todos apresentaram efeitos inibitórios hormonais na melanogênese de células de melanoma induzidas, com redução de 34-49% do conteúdo de melanina numa concentração de 100 mM, com nenhuma ou quase nenhuma toxicidade para as células (91-116% de viabilidade celular) (AKIHISA et al, 2010)

Foi relatada na *Ilex pubescens*, a presença de hemiterpenóides com propriedades antiplaquetárias: o pubescenosídeo A e pubescenosídeo B. A atividade foi mais potente do que a do ácido salvianólico B e do ácido acetilsalicílico, podendo no caso, serem utilizados em composições farmacêuticas com o objetivo de inibir a agregação plaquetária, a formação de trombos, melhorar a microcirculação, reduzir a pressão arterial, a excitação do sistema de condução cardiovascular e os riscos de isquemia cardíaca. (JIANG et al, 2005).

Investigações farmacológicas indicam que o extrato de *Prinsepia utilis* Royle, uma planta arbustiva que cresce em grandes altitudes no sul da China e da Índia tem atividade antioxidante, além de ser rica em compostos bioativos, como os hemiterpenos epiutililactona e utililactona, que através de bioensaios imunossupressores, demonstraram efeito inibidor sobre a transformação de linfócitos, proporcionando ferramentas para elucidar os mecanismos que envolvem as respostas imunológicas e efeito imunomodulador (XU et al, 2007).

Da planta *Spiraea canescens* foram isolados dois hemiterpenos glicosídicos denominados de 2-(trans-cinamoil-oxi-metil)-1-butene-4-O- β -D-glucopiranosídeo e 4-(6-O-trans-cinamoil)-(2-hidroximetil-4-hidroxi-butenil- β -D-glucopiranosídeo). As duas moléculas demonstraram capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH e superóxido e pelo potencial de reduzir o ferro (característica de muitos antioxidantes), quando testados à uma concentração de 500 μ M (CHOUDHARY et al, 2009).

Da planta *Pothos scandens* L. foram isolados três hemiterpenos glicosídicos: potobanosídeo A, potobanosídeo B e potobanosídeo C. Enquanto potobanosídeo A exibiu uma atividade inibitória sobre a hialuronidase (que produz uma resposta angiogênica implicada na capacidade de invasão e metástase tumoral, podendo ser um valioso composto anti-tumor), potobanosídeo B e potobanosídeo C exibiram uma atividade inibitória e antiestrogênica forte contra linhas celulares de câncer da mama humano estrógeno-

dependentes. Eles também têm atividade inibitória sobre a liberação de histamina por células basófilas. (MUHIT et al, 2015).

Lee et al (2015) isolaram do extrato de das cascas de *Ilex Rotunda* T. o hemiterpeno rotundarpeno (4-cafeoil-3-metil-but-2-eno-1,4-diol), que demonstrou efeitos antioxidantes frente à morte de células neuronais por produtos de oxidação de colesterol. Rotundarpeno atenuou a oxidação do colesterol, ao inibir a formação de espécies de oxigênio reativas e esgotamento de GSH, e impediu alterações nos níveis de proteínas apoptóticas, por supressão da ativação da via mitocondrial e da caspase-8. (LEE et al, 2015).

O rotundarpeno também bloqueou alterações induzidas por receptores do ligante indutor de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral (TRAIL), espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e danos nucleares em queratinócitos. Estes resultados sugerem que rotundarpeno pode reduzir a apoptose induzida por TRAIL, sendo eficaz na prevenção de doenças da pele ou autoimune (LEE et al, 2014). Também inibiu a produção de mediadores inflamatórios em queratinócitos por supressão da ativação das vias Akt e NF-kB por *toll like receptors* (TLR-2) (KIM et al, 2014).

De todas as espécies vegetais citadas na tabela 2, poucas são as originárias da América, sendo que mesmo aquelas com intensa distribuição no Brasil, como é o caso da *Morinda Citrifolia* (noni) e *Psidium Guajava* (goiaba), tiveram estudos desenvolvidos em outros países, como Coréia do Sul, China, Japão e Índia; há poucos estudos identificando a presença de hemiterpenóides com propriedades biológicas no Brasil.

Com uma das maiores diversidades biológicas do mundo, os países asiáticos abrigam uma imensa variedade de plantas superiores e espécies endêmicas, além de possuir quase todos os tipos de ecossistemas. Vale destacar ainda que são países com largo conhecimento na medicina tradicional, e que tem articulado de maneira intensa suas atividades de P&D com o patenteamento massivo no setor de fitoterápicos e pesquisa de novos fármacos de origem vegetal; já o Brasil não tem conseguido aproveitar o enorme potencial de sua biodiversidade para a geração de conhecimentos neste setor.

Segundo o Panorama da Química Verde no Brasil: 2010 a 2030, entre os principais fatores que contribuem para esses problemas estão a falta de investimentos em P, D & I voltados para a fitoquímica. Hoje predominam pesquisas relacionadas à fase de caracterização química e botânica. Faz-se necessário a realização de estudos ligando instituições de pesquisas, setor produtivo e o mercado consumidor. As pesquisas fitoquímicas devem ser realizadas em conjunto com as indústrias consumidoras de substâncias bioativas, que avaliarão as matérias-primas e produtos com potencial de mercado. Com base nas

informações geradas, desenvolvem-se novas formas de obtenção ecologicamente correta dos metabólitos secundários de interesse, que serão repassadas ao setor produtivo. Essa interatividade promoverá a valorização da biodiversidade e a conservação de espécies em fase de extinção, fomentadas pelo desenvolvimento de novos sistemas de produção. (CGEE, 2010).

■ **Prospecção Tecnológica**

O termo prospecção tecnológica designa atividades centradas nas mudanças tecnológicas, em mudanças na capacidade funcional ou no tempo e significado de uma inovação. Visa incorporar informação ao processo de gestão tecnológica, tentando prever possíveis estados futuros da tecnologia ou condições que afetam sua contribuição para metas definidas. (FREITAS, 2013). Os métodos de Prospecção Tecnológica são usados há várias décadas em diversos países, como uma ferramenta para orientar os esforços empreendidos para a pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I) (AMPARO et al, 2012).

Por meio da Busca de Anterioridade é possível avaliar se a tecnologia em questão já foi desenvolvida, se já foi apropriada, ou se já está sendo utilizada pela sociedade. Através da Prospecção Tecnológica são levantadas todas as tecnologias existentes, identificando o estágio de maturidade da tecnologia em questão e como ela se insere na sociedade, assim como aspectos de tecnologias concorrentes e lacunas a serem preenchidas, sendo possível uma determinada tecnologia e suas variações serem competitivas (QUINTELLA et al, 2011).

Os estudos de prospecção, que necessitam da informação tecnológica, podem ser encontrados nos bancos de dados de patentes, um recurso valioso e confiável. Existem muitas vantagens no uso dessa fonte de informação tecnológica, dentre elas, destaca-se a facilidade de acesso às bases de dados disponibilizadas gratuitamente na internet (FERNÁNDEZ e COMBA, 2012).

Desta forma, a revisão tecnológica foi realizada em bases de dados especializadas incluindo patentes depositadas no período compreendido entre o ano em que se iniciaram a listagem dos depósitos em cada banco até junho de 2015 nas bases do EPO, USPTO, WIPO e INPI, como listado na metodologia. Os resultados podem ser observados na tabela 3. No total são citados 34, 19 e 14 depósitos envolvendo hemiterpenos nas bases americana (USPTO), europeia (EPO) e mundial (WIPO), respectivamente. Não há relato de nenhum depósito de patente depositado na base brasileira (INPI).

Tabela 3. Número de patentes depositadas nas bases de dados INPI, USPTO, EPO e WIPO, compreendendo os termos utilizados.

<i>Palavras-chave</i>	INPI	USPTO	EPO	WIPO
Atividade biológica ou <i>biological activities</i>	422	1455	2847	2895
Hemiterpeno ou <i>hemiterpene</i>	0	34	19	14
Atividade biológica e Hemiterpeno ou <i>biological activities and hemiterpene</i>	0	1	5	2

Fonte: Pesquisa Direta, 2015.

Além do número pequeno de estudos com hemiterpenos, como relatado na prospecção científica, poucas pesquisas chegaram a ser protegidas e disponibilizadas à sociedade em forma de produto. Excluindo-se os casos de duplicidade nas bases de dados (principalmente EPO e WIPO), o total de hemiterpenos com propriedades biológicas e que foram protegidos não passam de 8 (**tabela 2**). No Brasil não há registro de nenhum hemiterpeno protegido. Na **tabela 3** são explicitados esses oito depósitos de patentes, alguns provenientes de pesquisas relacionadas na prospecção tecnológica.

Cinquenta por cento (50%) das patentes encontradas são provenientes de pesquisas citadas na prospecção científica. São elas: hemiterpenos glicosídeos isolados de folhas de *Spiraea prunifolia*, hemiterpenos glicosídeos isolados do extrato de folhas de *Ilex rotunda*, hemiterpenos glicosídeos isolados da raiz de *Ilex pubescens* e uma composição antifúngica que compreende pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste em: ácido tíglico, ácido seneciólico e derivados. As outras não constam nos artigos científicos elencados. Com exceção de 1 patente anterior à 1997, todas as outras foram depositadas após o ano de 2005 (um percentual de 87,5%), mostrando que o interesse por essas moléculas teve um aumento a partir dos anos 2000.

Tabela 4. Patentes relacionadas às aplicações tecnológicas dos hemiterpenos depositadas nas bases de dados EPO, USPTO e WIPO.

Patente (nº/Ano)	Inventores /Depositantes	Título do depósito	Inovação
KR20140043258 (A) / 2012	LEE, M.W. PARK, S. H.	<i>Novel hemiterpene glucoside compounds isolated from the leaves of spiraea prunifolia and anti-oxidative and anti-inflammatory use thereof</i>	A invenção refere-se a novos hemiterpenos glicosídeos isolados de folhas de <i>Spiraea prunifolia</i> , com atividade antioxidante/anti-inflamatória, podendo ser utilizados como componentes ativos de medicamentos, cosméticos e alimentos funcionais.
KR20120135448 (A) / 2011	LEE, M.W. KIM, M.H.	<i>New compounds purified from the leaves of Ilex rotunda and anti-oxidative effect thereof</i>	A invenção refere-se a dois novos hemiterpenos glicosídeos isolados do extrato de folhas de <i>Ilex rotunda</i> com atividade antioxidante, para serem utilizados em composições cosméticas/alimento funcional.
CN1951378 (A) / 2007	LI, X. ZHAO, Y HUANG, K LI, R.	<i>Medical usage of 2beta-hydroxyilicicacid in inhibiting hepatitis B</i>	A invenção refere-se ao hemiterpeno 2-β-hidroxi-5-α-eudesmano-11-alil-12-ácido que pode ser usados em medicamentos para tratar a hepatite B; capacidade de conter o HBsAg superior ao difuradin.
US20060154877 / 2006	LIANG, L. ZHIHONG, J. MIN, L. JINGRONG, W. ZONGQIO, L.	<i>Hemiterpene glycosides with anti-platelet aggregation activities from Ilex pubescens</i>	A invenção refere-se a dois novos hemiterpenos glicosídeos (Pubescenosídeo A e B) isolados da raiz de <i>Ilex pubescens</i> , com atividade anti-agregação de plaquetas mais potente que ácido salvianólico B e Ácido acetilsalicílico, e podem ser utilizados em composições farmacêuticas em seres humanos e mamíferos.

CN20051002559 6.1 / 2006	XU, S.	<i>Use of setooquen</i>	A presente invenção refere-se a uma aplicação médica do composto hemiterpeno que tem a atividade inibitória da proteína tirosina fosfatase 1B, podendo ser utilizado na preparação de medicamentos usados no tratamento da diabetes, a obesidade e as suas complicações.
CN20061003560 3.0 / 2006	YONGHONG, L. ZHIXIN, Z. SI, Z.	<i>Degradeable furan sesterterpenes keratinous spongistatin, and its preparing method and use</i>	Esta invenção refere-se à degradação de sesterterpenos em um hemiterpeno bi-furano com aplicação no câncer humano, especialmente câncer do pulmão, cólon do útero, sistema nervoso central, pele e intestino. A toxicidade celular neste composto e seu valor IC ₅₀ é de cerca de 10 µg/mL, boa relação para restringir o crescimento de células tumorais.
CN1948256 (A) - 2007-04-18 / 2005	CAO, H. L.	<i>New compound possessing insecticidal bactericidal activity</i>	A presente invenção refere-se a um novo composto, eupatoria-C (8- α -hidroxi-1-isopropil-4,7-dimetil-1,3,4,8-tetralil- α -2,6-dicetona, um hemiterpeno que pode ser utilizado como fungicida de alta eficácia, pesticida e repelente.
WO1997048279 A1 / 1997	AYER, W.A. CHAKRAVARTY, P. HIRATSUKA, Y. TRIFONOV L.S	<i>Agents with antifungal activity and methods of use thereof</i>	A presente invenção refere-se a uma composição antifúngica que compreende pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste em: ácido tíglico, ácido senecióico, derivados, na forma de sal ou não, alcalino ou ácido. Os métodos de reduzir ou inibir o crescimento de fungos são também descritos.

Como já relatado, a maior parte dos depósitos de patentes é de origem asiática, sendo quatro depósitos de origem chinesa, dois sul-coreanos, um canadense e um norte-americano corroborando os dados descritos na prospecção científica (gráfico 2), uma vez que a maior parte dos estudos foi desenvolvida em países orientais (especialmente a China e Coreia do Sul), (gráfico 1). São países com certa tradição na proteção patentária de suas pesquisas. O Brasil, como se previu na prospecção científica, pouco produziu literatura sobre os hemiterpenos e conseqüentemente não protegeu pesquisas relacionadas na área, inviabilizando a disponibilização à sociedade de novos produtos e a comunidade científica de novos conhecimentos.

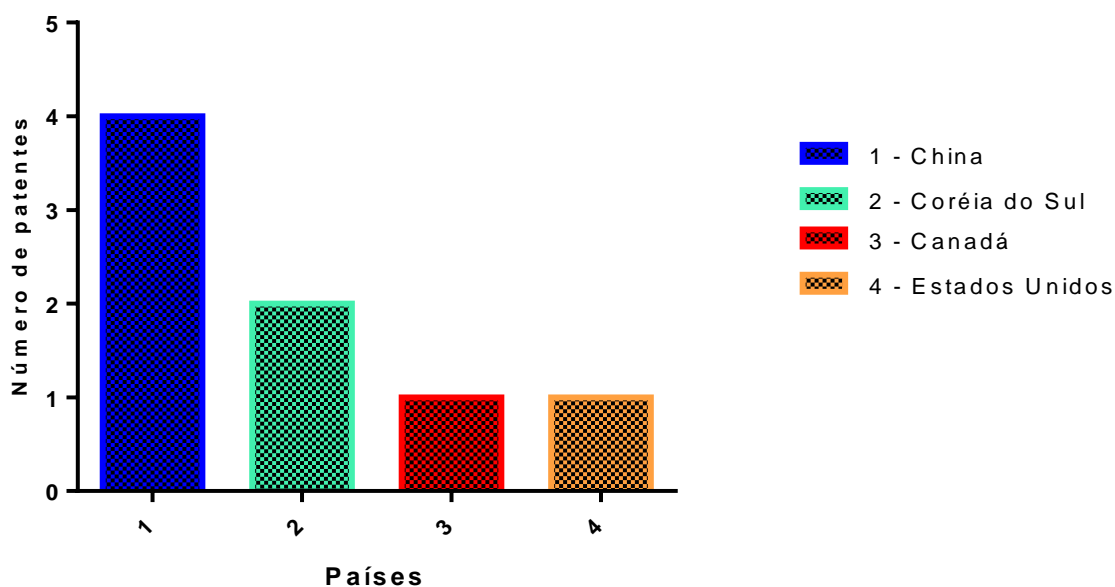


Gráfico2. Países de origem dos depósitos de patentes nas bases de dados dos bancos de patentes EPO, USPTO e WIPO. Pesquisa Direta, 2015.

A área de P&D de fármacos vem crescendo de forma acentuada no Brasil. Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna (GUIDO et al, 2010)

Estimulada pelas políticas públicas, a indústria farmacêutica nacional foi capaz de aproveitar as oportunidades abertas pelo crescimento expressivo do mercado brasileiro na

última década. No entanto, esse movimento não promoveu o desenvolvimento da indústria farmoquímica no país, principal insumo da cadeia produtiva. Em paralelo, a ascensão dos países asiáticos como grandes ofertantes desses insumos vem impondo desafios à competitividade industrial brasileira, assim como dos demais países (MIDITIERI et al, 2015).

Essa tendência deve ser ampliada cada vez mais, mediante investimentos em infraestrutura, qualificação de pessoal e em pesquisa, incentivando um desenvolvimento regional mais equilibrado e a consolidação de parcerias entre universidade, governo e indústria. O compromisso comum é integrar ações, participar e contribuir da melhor maneira possível para o avanço do conhecimento científico e do domínio tecnológico (PIMENTEL et al, 2013). É essencial somar esforços de forma organizada, articular estratégias de captação de recursos financeiros, materiais e humanos, consolidar ideias e encontrar novas soluções para que se possa evoluir, nas próximas décadas, de uma nação emergente para uma potência mundial na área de fármacos e medicamentos (GUIDO et al, 2010).

CONCLUSÃO

Considerando o levantamento de dados, conclui-se que há poucos estudos sobre as propriedades biológicas de hemiterpenos. As pesquisas existentes foram desenvolvidas em sua maior parte em países asiáticos e da Europa, evidenciando uma lacuna em nosso país no que se refere esta área da pesquisa. Tendo em vista a busca mundial pela descoberta de novos tratamentos para diversas doenças, há uma grande necessidade de desenvolver pesquisas e transferir tecnologia, especialmente no caso de países ricos em biodiversidade, como o Brasil; são necessários nesse caso uma maior aparelhagem entre as instituições de pesquisa, universidades e iniciativa privada, formação de recursos humanos e estrutura adequada, junto de maiores investimentos no setor de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

REFERÊNCIAS

AMPARO, K.K.S.; RIBEIRO, M.C.O.; GUARIEIRO, L.L.N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em ciência da informação**, v. 17, n.4, p.195-209, 2012.

AKIHISA, T.; SEINO, K.; KANEKO, E.; WATANABE, K.; TOCHIZAWA, S.; MAKOTO, F.; BANNO, N.; Melanogenesis Inhibitory Activities of Iridoid-, Hemiterpene-, and Fatty Acid-glycosides from the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of oleo science**, v.59, n.1 p.49-57, 2010.

CHAI, W.M.; LIU, X.; HU, Y.H.; FENG, H.L.; JIA, Y.L.; GUO, Y.J.; ZHOU, H.T.; CHEN, Q.X. Antityrosinase and antimicrobial activities of furfuryl alcohol, furfural and furoic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 57, n.4, p.151-5, 2013.

CHAKRAVARTY, P.; HIRATSUKA, Y.; TRIFONOV, L.S.; AYER, W.A. Antifungal activity of derivatives of tiglic and senecioic acid against three aspen pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.104, n.3, p.254-259, 1997.

GUNATILAKA, A.L. Plant natural products. In Natural products in chemical biology (Natanya Civjan, Ed). p.1-31, John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2012.

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.

HALL, I.H. WONG, O.T.; REYNOLDS, D.J.; CHANG, J.J. The hypolipidemic effects of 2-furoic acid in Sprague-Dawley rats. **Journal: Arch Pharm (Weinheim)**. v.326, n.1, p.15-23, 1993.

HOCKELMANN, C.; MOENS, T.; JUTTNER, F. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. **Limnology and Oceanography: Methods**. v.49, n.5, p.1809-1819, 2004.

JOSEPH, B.; MINI PRIYA, R.; HELEN, P.A.M.; SUJATHA, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* (L.) Leaf. **Journal of Advanced Biotechnology**. v.9, n.1, p.10-14, 2010.

KIM, M.H.; PARK, K.H.; OH, M.H.; KIM, H.H.; CHOE, K.I.; PARK, S.H.; LEE, M.W. Two new hemiterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda*. Thunb. **Archives of Pharmacal Research**. v.35, n.10, p.1779-84, 2012.

LORETO, F.; CICCIOLO, P.; BRANCALEONI, E.; CECINATO, A.; FRATTONI, M.; SHARKEY, T.D. Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.93, n.18, p.9966–9969, 1996.

ONO, M.; YASUDA, S.; SHIONO, Y.; FURUSAWA, C.; INABA, S.; TANAKA, T.; IKEDA, T.; NOHARA, T. A new hemiterpene glycoside from the ripe tomatoes. **Natural products research**, v.29, n.3, p.262-267, 2014.

PARK, S. H.; PARK, K.H.; OH, M.H.; KIM, H.H.; CHOE, K.I.; KIM, S.R.; PARK, K.J.; LEE, M. W. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of caffeoyl hemiterpene glycosides from *Spiraea prunifolia*. **Phytochemistry**, v.96, p.430-436, 2013.

PATOČKAL, J.; JAKL, J. Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana officinalis*. **Journal of Applied Biomedicine**. v.8, n.1, p.11–18, 2010.

QUINTELLA, C.M.; MEIRA, M.; GUIMARÃES, A.K.; TANAJURA, A.S.; DA SILVA, H. R.G. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**. v.3, n.5, p.406-415, 2011.

RIBEIRO, C.A.; BALESTRO, F.; GRANDO, V.; WAJNER, M. Isovaleric acid reduces Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**. v.27, n.4, p.529-540, 2007.

SHOUBAKY, G.A.E; SALEM, E.A. Terpenes and Sterols Composition of Marine Brown Algae *Padina pavonica* (Dictyotales) and *Hormophysa triquetra* (Fucales). **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**. v.6, n.4, p.894-900, 2014.

SONG, F.L.; GAN, R.Y.; ZHANG, Y.; XIAO, Q.; KUANG, L.; LI, H.B. TOTAL Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. **International Journal of Molecular Sciences**. v.11, p.2362-2372, 2010.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-16, 2010.

XU, Y.Q.; YAO, Z.; HU, J.Y.; TENG, J.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H.Q. Immunosuppressive terpenes from *Prinsepia utilis*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v.9, n.6, p.637-42, 2007.

ZHANG, Q.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. 2-methyl-3-buten-2-ol: A Pheromone Component of Conifer Bark Beetles Found in the Bark of Nonhost Deciduous Trees. **Psyche: A Journal of Entomology**, v.2012, p.1-7, 2012.

ZNATI, M.; JANNET, H.B.; CAZAUX, S.; SOUCHARD, J.P.; SKHIRI, F.H.; BOUAJILA, J. Antioxidant, 5-Lipoxygenase Inhibitory and Cytotoxic Activities of Compounds Isolated from the *Ferula lutea* Flowers. **Molecules**, v.19, n.10, p.16959-16975, 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v.75, n.3, p.311–335, 2012.

ZHAO, Y.J.; CHENG, Q.Q.; SU, P.; CHEN, X.; WANG, X.J. GAO, W.; HUANG, L.Q. Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.98, p.2371–2383, 2014.

SINGH, B.; SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v.5, n.2, p-129–151, 2015.

CHOUDHARY, M.I.; NAHEED, N.; ABBASKHAN, A.; ALI, S.; RAHMAN, A. Hemiterpene glucosides and other constituents from *Spiraea canescens*. **Phytochemistry**, v.70, n., p.1467–1473, 2009.

MUHIT, M. A. IZUMIKAWA, M.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. **Phytochemistry**. v.121, p.30–37, 2015.

LEE, H.; NAM, Y.J.; LEE, M.S.; SOHN, D.S.; LEE, C.S. Rotundarpene attenuates cholesterol oxidation product-induced apoptosis by suppressing the mitochondrial pathway

and the caspase-8- and bid-dependent pathways. **European Journal of Pharmacology**. v.15, n.749, p.39-48, 2015.

LEE, H.; NAM, Y.J.; LEE, M.S.; SOHN, D.S.; LEE, C.S. Rotundarpene prevents TRAIL-induced apoptosis in human keratinocytes by suppressing the caspase-8- and Bid-pathways and the mitochondrial pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. v.387, n.12, p.1209-19, 2014.

KIM, Y.J.; JUNG, E.B.; LEE, M.S.; SEO, S.J.; KIM, M.H.; LEE, M.W.; LEE, C.S. Rotundarpene inhibits toll-like receptor 2 activation-induced production of inflammatory mediators in keratinocytes by suppressing the Akt and NF- κ B pathways. **International Immunopharmacology**. v.18, n.2, p.325-32, 2014.

CGEE; Química Verde no Brasil: 2010-2030. Ed. rev. e atual. 438 p. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**. v.2, n.3, p.251-286, 2015.

JIANG, Z.H.; WANG, J.R.; LI, M.; LIU, Z.Q.; CHAU, K.Y.; ZHAO, C.; LIU, L. Hemiterpene glucosides with anti-platelet aggregation activities from *Ilex pubescens*. **Journal of Natural Products**. v.68, n.3, p.397-9, 2005.

WOHLFART, R.; HANSEL, R.; SCHMIDT, H. Sedative hypnotic principles in hops. Part 4. Pharmacology of the hop constituent 2-methyl-3-buten-2-ol. **Planta Medica**. v.48, n.2, p. 120-123, 1983.

FERNÁNDEZ, V. R.; COMBA, D. A. “Estado e Inovação na Periferia: ¿por qué y cómo (re)pensar el rol del Estado y las políticas de ciencia, tecnología e innovación en América Latina?”. **Revista Desenvolvimento em Questão**. v.10, n.19, p. 25-32, 2012.

MITIDIARI, T.; PIMENTEL, V. P.; BRAGA, C.; PIERONI, J. P. Há espaços competitivos para a indústria farmoquímica brasileira? Reflexões e propostas para políticas públicas. **BNDES Setorial**. v.41, p. 43-78, 2015.

FREITAS, F.L. Gestão da inovação: teoria e prática para implantação. São Paulo, Atlas: 2013.

PIMENTEL, V.; GOMES, R.; LANDIM, A.; MACIEL, M. PIERONI, J.P. O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. **BNDES Setorial**. v.38, p. 173-212, 2013.

PATENTES

AYER, W.A.; CHAKRAVARTY, P.; HIRATSUKA, Y.; TRIFONOV, L.S. Inventors; University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá. Agents with antifungal activity and methods of use thereof. Canadá. Patent WO1997048279 A1, 1997.

CAO HE, L.; Inventors; Inst Plant Protection IPP CAAS, Beijing, [CN], New compound possessing insecticidal bactericidal activity. China. Patent CN1948256 (A) - 2007-04-18, 2005.

LEE, M.W. KIM, M.H. Inventors; Chung-Ang University, Korea (KR). New compounds purified from the leaves of *Ilex rotunda* and anti-oxidative effect thereof. Korea. Patent KR20120135448 (A), 2011.

LEE, M.W.; PARK, S. H. Inventors; Chung-Ang University, Korea (KR). Novel hemiterpene glucoside compounds isolated from the leaves of *spiraea prunifolia* and anti-oxidative and anti-inflammatory use thereof. Korea. Patent KR20140043258 (A), 2012.

LIANG, L.; ZHIHONG, J.; MIN, L.; JINGRONG, W.; ZONGQIO, L. Inventors; Hong Kong Baptist University, Hong Kong (HK). Hemiterpene glycosides with anti-plaquelet aggregation activities from *Ilex pubescens*. China. Patent US2006/0154877 A1, 2006.

LI, X.; ZHAO, Y.; HUANG, K.; LI, R. Inventors; Wenzhou Medical College, Zhejiang [CN]. Medical usage of 2beta-hydroxyilicicacid in inhibiting hepatitis B. China. Patent CN1951378 (A), 2007.

XU, S. Inventors; Shanghai Pharmaceutical Inst., Chinese Academy of Sciences. Use of setooquen. China. Patent CN200510025596.1, 2006.

YONGHONG, L.; ZHIXIN, Z. SI, Z. Inventors; Nanhai Ocean Inst., Chinese Academy of Sciences. Degradable furan sesterterpenes keratinous spongistatin, and its preparing method and use. China. Patent CN200610035603.0, 2006.



CAPÍTULO II – Estudos não clínicos com o hemiterpeno prenil: citotoxicidade em *Artemia salina* e toxicidade aguda em *Mus musculus*

ESTUDOS NÃO CLÍNICOS COM O HEMITERPENO PRENOL: CITOTOXICIDADE EM *Artemia salina* E TOXICIDADE AGUDA EM *Mus musculus*

Alexandre Xavier de Lira da Silva¹; Brenda Nayranne Gomes dos Santos¹; Damiano Pergentino de Sousa³; Rivelilson Mendes de Freitas²; Maria das Graças Freire de Medeiros¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

³Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS), Sergipe, Brasil.

Resumo: O hemiterpenóide prenol (3-metil-2-buten-1-ol) é um dos compostos terpênicos mais simples. É utilizado principalmente como intermediário na indústria química, para a síntese de ingredientes ativos e químicos aromáticos; ocorre naturalmente em frutas cítricas de extensa distribuição no Brasil. A literatura pouco relata sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo prenol em ensaios não clínicos. Diante disto, este estudo teve como objetivo estimar a dose letal mediana 50% (DL₅₀) baseado no guia 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001), avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos, fisiológicos e comportamentais em camundongos *swiss* fêmeas, bem como avaliar a citotoxicidade preliminar, determinando a Concentração letal média (CL₅₀) frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Resultados da citotoxicidade preliminar frente à *A.salina* das concentrações do prenol indicam altas médias de sobrevivência das larvas para as concentrações testadas; a CL₅₀ foi estimada em 2944,14 µg/mL (32,58 mM). Durante o tratamento, nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/kg⁻¹, o que permite estimar uma faixa de DL₅₀ entre 2000 e 5000 mg/kg. O prenol não alterou a massa corpórea dos animais. Os resultados mostram que a administração via oral, do prenol, de forma geral, não produz efeitos tóxicos que levem a morte do animal, embora module os parâmetros analisados no teste de campo aberto, inferindo uma possível atividade no sistema nervoso central, sem influir no sistema motor. Não houve alteração significativa no consumo de água, ração e volume de excretas dos animais durante o período de 14 dias de observação. Todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos estavam dentro da faixa de referência, observando-se pequenas alterações no valor dos neutrófilos segmentados, glicose e ácido úrico. O estudo toxicológico não clínico com o prenol revelou que este terpeno possui baixa toxicidade aguda por via oral e em microcrustáceos, sendo que os dados coletados contribuem de forma satisfatória com a literatura do composto. Porém, é válido destacar a necessidade de pesquisas futuras que contribuam ainda mais com os dados toxicológicos, como a toxicidade por doses repetidas e estudos genotóxico e histopatológicos a fim de permitir o uso seguro deste hemiterpeno.

Palavras-chave: 3-metil-2-buten-1-ol; Toxicidade Aguda; Camundongo; Artêmias.

1. INTRODUÇÃO

O hemiterpenóide prenol (3-metil-2-buten-1-ol ou álcool prenílico) é um dos compostos terpênicos mais simples; Líquido à temperatura ambiente, e com odor característico, sua fórmula molecular é $C_5H_{10}O$ e massa molar de 86,1 g/mol. Apresenta ponto de fusão a $-59.3^{\circ}C$, ponto de ebulição a $140^{\circ}C$, densidade de 0.85 g/cm^3 e elevada solubilidade em água (170g/L a $20^{\circ}C$) (NIOSH, 2010).

É um hemiterpeno que ocorre naturalmente em diversas frutas cítricas como amora preta (*Rubus* spp.), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), groselha (*Ribes uva-crispa*), maracujá (*Passiflora incarnata*), uva (*Vitis* sp.), framboesa (*Rubus idaeus*), no tomate (*Solanum lycopersicum*), café verde (*Coffea arabica* L.) e lúpulo (*Humulus lupulus*) (OECD/SIDS, 2005). Também foi relatada sua presença em frutos típicos da região nordeste como bacuri (*Platonia insignis*) (FRANCO e JANZANTTI, 2005), noni (*Morinda Citrifolia*) (PINO et al 2010), acerola (*Malpighia* sp.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), umbu (*Spondias tuberosa* L.) e cacau (*Theobroma cacao* L.) (DUARTE et al, 2010; BICAS et al, 2011).

O prenol é utilizado principalmente como intermediário na indústria química, para a síntese de fármacos e químicos aromáticos. Uma fração menor, estimada em cerca de 50 toneladas) é utilizada como agente aromatizante e em cosmética a um nível máximo de 0,1%. O álcool prenílico é um intermediário na fabricação de citral, especialidade química utilizada nas indústrias de aromas e fragrâncias, bem como na fabricação de vitaminas A e E, drogas antiacne e vários carotenóides utilizados, incluindo o betacaroteno (BELSITO et al, 2010; MCGINTY et al, 2010).

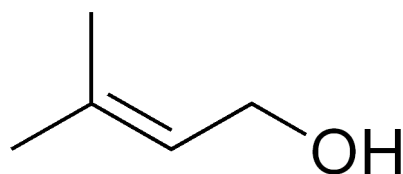


Ilustração 1. Estrutura química do 3-metil-2-buten-1-ol (prenol).

Arquivo pessoal, 2015.

O estudo toxicológico não clínico de um composto é uma etapa inicial importante para o uso seguro dessa substância na saúde humana e ambiental, pois visa à caracterização dos efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração. Além disso, os estudos toxicológicos

não clínicos têm o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ANVISA, 2013).

O teste de toxicidade tem como objetivo definir a toxicidade intrínseca da substância química, determinar as espécies mais susceptíveis à ação do composto, identificar órgãos alvos e oferecer dados sobre o modelo, além de selecionar as doses para estudos toxicológicos de longa duração (ALMEIDA, 2006). Um grande número de espécimes variando de procariotos a eucariotos (roedores, micro-organismos, células de mamíferos e plantas) vem sendo utilizados para a análise da toxicidade em amostras ambientais, compostos químicos puros ou misturas, medicamentos, etc. (MARIZ et al, 2008; CUNHA et al, 2013).

A literatura pouco relata sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo prenol em ensaios não clínicos. Diante disto, este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, determinando a Concentração letal média (CL₅₀), avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos, fisiológicos e comportamentais em camundongos *swiss* fêmeas, estimar a dose letal mediana 50% (DL₅₀) baseado no Guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico OECD 423 (OECD, 2001).

2. METODOLOGIA

2.1 Náuplios de Artêmias

2.1.1 Avaliação da citotoxicidade frente à *Artemia salina* L.

A avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* L. foi realizada segundo metodologia descrita por McLaughlin (1998). Inicialmente, foram preparados dois litros de solução de sal marinho em água mineral não clorada (30 g/L) para incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg). O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L de NaOH. Estes foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 watts) a 25 °C, com aeração constante, durante 24 horas para que houvesse a eclosão das larvas (náuplios).

Para efetuar o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina e alíquotas do prenol, nas seguintes concentrações: 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM, 2,2 mM e 5,4 mM. Grupos-controle também foram preparados, sem a presença do hemiterpeno (controle negativo) e com o dicromato de potássio (controle positivo). Após o período de 24 horas, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes.

2.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos fêmeas, albinas (*Mus musculus*), linhagem *Swiss* adultas, com 2 a 3 meses de idade, e peso variando de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico 30 x 30 cm² cm, em condições controladas (temperatura ambiente de 24-25°C e umidade de 50 a 60%), com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas (07:00 am a 07:00 pm) e sistema de exaustão, recebendo ração padrão tipo Purina e água filtrada *ad libitum*. Assepsia das caixas foi realizada 3x por semana com álcool a 70% e hipoclorito de sódio. Os experimentos propostos foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação com Animal da UFPI e aprovado conforme os aspectos de natureza ética. Número de aprovação: 095/14 (Anexos).

2.2.1 *Screening* Hipocrático, determinação da DL₅₀ e parâmetros quantitativos.

Para o *screening*, os animais foram divididos em três grupos: grupo controle negativo que recebeu Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, e 2 grupos teste, que receberam as doses de 300 e 2000 mg/kg⁻¹. O guia da OECD (2001) recomenda que os grupos sejam divididos em 4 grupos de 3 animais por etapa, e devem receber por via oral e em dose única, as doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Entretanto, quando não existem informações sobre a substância a ser testada, é recomendação do Guia usar a dose inicial de 300 mg/kg. Portanto, não foram utilizadas as doses de 5 e 50 mg/kg. O Guia também recomenda que a etapa seja feita duas vezes, então em cada dose se utilizou 6 animais (e 18 animais no total).

O Guia da OECD apresenta boa reprodutibilidade, usa poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System-GHS*), estimando a dose letal mediana (**DL₅₀**). O guia também recomenda o uso de fêmeas para esse teste; embora não costume haver diferença entre os gêneros, nos poucos casos em que esta ocorreu, as fêmeas foram mais sensíveis que os machos, e por isso, a predileção por este gênero em específico (OECD, 2001).

Os camundongos foram observados nas primeiras 24 horas e diariamente durante 14 dias para avaliar o “*screening* hipocrático”, que forneceu uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso

autônomo. Os parâmetros foram: atividade geral, frênilo vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento, força para agarrar, reflexo corneal, ataxia, tremores, convulsões, lacrimação, fenômenos de “Straub”, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração, hipnose e anestesia. Também foram mensurados o volume de água e ração consumidos e excretas produzidos durante os 14 dias, com leituras feitas a cada dois dias.

2.3 Avaliação comportamental

Após a administração via oral do prenol, nas doses de 300 e 2000 mg/kg⁻¹ e do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%), os grupos de animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto (*open field*) e barra giratória (*rota rod*); estes foram realizados três vezes durante o período de observação: dia 01, dia 07 e dia 14.

O campo aberto de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em nove quadrantes iguais (Ilustração 2). Esse aparato foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal. Após 30 minutos dos tratamentos, observaram-se os seguintes parâmetros: n° de cruzamentos com as quatro patas (*crossings*), n° de comportamento de autolimpeza (*groomings*) e o n° de levantamentos (*rearings*), sem encostar-se à parede, durante o tempo de 5 minutos. Após cada sessão de teste individual, o campo foi limpo com álcool 70% para remover qualquer vestígios (ARCHER, 1973).

O equipamento *rota rod* foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular em animais. Simultaneamente à leitura no teste de campo aberto por 5 minutos, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de três minutos. Foram registrados, o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (SHIOTSUKI et al, 2010).

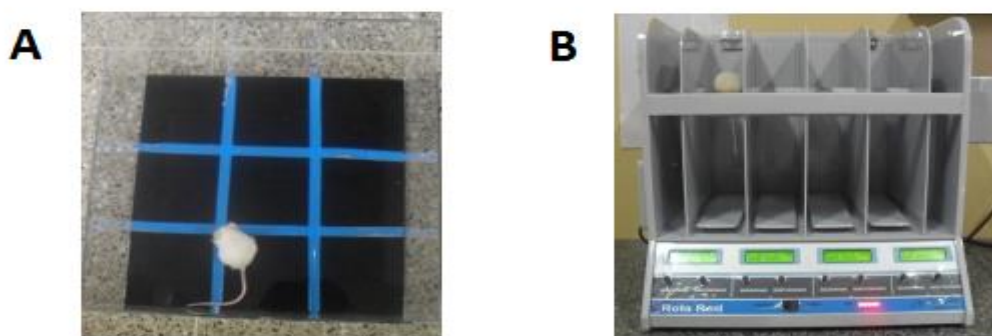


Ilustração 2. Equipamentos Campo Aberto (A) e barra giratória (B). Arquivo pessoal, 2015.

2.4. Toxicidade aguda do prenol em parâmetros bioquímicos, hematológicos e fisiológicos.

Após 14 dias de observação, os animais foram anestesiados com Xilazina e Cetamina em associação (10 mg/kg^{-1} e 50 mg/kg^{-1} , respectivamente, i.p.) e a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

O sangue foi centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos a fim de se extrair o soro para análise bioquímica; posteriormente foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST), triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest) com sistemas comerciais da Labtest®.

A análise hematológica foi feita baseada nos valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Ambas as análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí – UFPI. A análise dos parâmetros fisiológicos foi realizada de acordo com o volume de água e peso de ração que foram consumidas durante os quatorze dias de observação dos animais, assim como a quantidade de excretas produzidas.

As cobaias foram eutanasiadas de acordo com a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CRMV) que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Na seguinte resolução são listados os procedimentos aceitáveis e os inaceitáveis como métodos de eutanásia.

Entre os aceitáveis cita-se a sobredose de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis (duas a três vezes a dose anestésica) a serem administrados por via intraperitoneal, em dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal. Portanto, foi utilizada a dose de 30 mg/Kg e 150 mg/kg^{-1} de xilazina e cetamina, respectivamente.

2.5. Análises estatísticas

Os dados da citotoxicidade em *Artemia* foram analisados a fim de determinar os valores de CL₅₀ e as médias de sobrevivência para cada concentração, por regressão de Probitos por meio do software *GraphPad Prism*[®], versão 6.0, com 95 % de intervalo de confiança. Os valores obtidos em camundongos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t-*Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando p<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

■ Citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

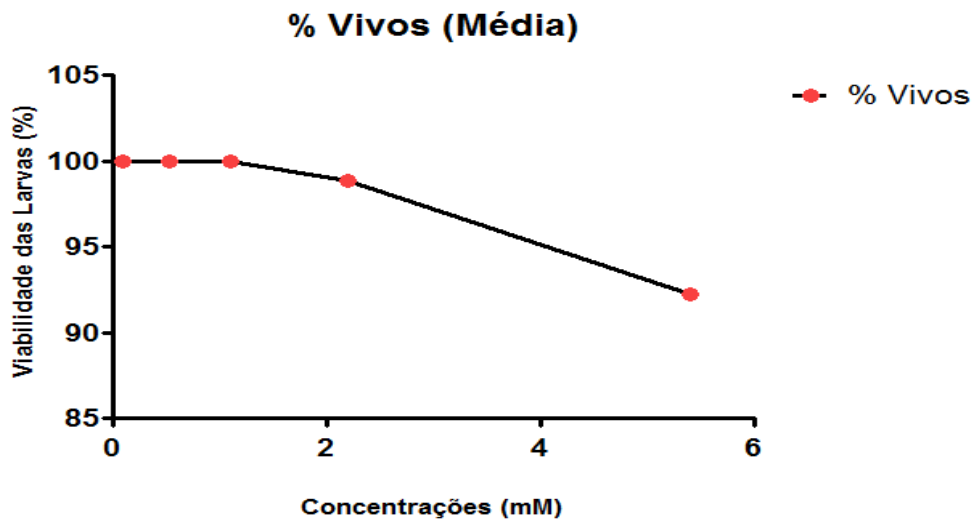
Resultados da citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina* das concentrações do hemiterpeno prenil estão descritos na **tabela 1** (quantidades de larvas expostas x mortas). No **gráfico 1**, as médias de sobrevivência/viabilidade das larvas para as concentrações 0,1 mM, 0,54 mM e 1,1 mM, 2,2 mM e 5,4 mM, foram de 100%, 100%, 100%, 98,89% e 92,22%, respectivamente. A CL₅₀ do hemiterpeno 3MB foi de 2944,14 µg/mL (32,58 mM) (**tabela 2**).

Tabela 1. Contagem de *Artemias salinas* mortas após 24 h de exposição ao hemiterpeno prenil.

Concentração das soluções (mM)	Quantidade de <i>A. salinas</i> expostas	Quantidade de <i>A. salinas</i> Mortas
0,1	30	0
0,54	30	0
1,1	30	0
2,2	30	1
5,4	30	2
CN	30	0
CP	30	30

Legenda: CN – Controle Negativo (Solução salina); CP – Controle Positivo (Dicromato de Potássio). Pesquisa Direta, 2015.

Gráfico 1. Viabilidade dos náuplios de *Artemia salina* nas concentrações do prenol.



Legenda: Os valores representam a média dos valores de sobrevivência/ viabilidade das larvas, *in vivo*, n = 5, experimentos realizados em triplicata. GraphPad Prism, 2015. Pesquisa Direta, 2015.

Tabela 2. Valor da CL₅₀ do prenol, com o intervalo de confiança de 95%

Intervalo de Confiança de 95%	
Amostra	CL ₅₀ (µg/mL)
prenol	2944,14 µg/mL (ou 32,58 mM)

Fonte: Pesquisa Direta, 2015.

O bioensaio de toxicidade com o microcrustáceo *A. salina*, é em geral simples, rápido, sensível e de baixo custo, e consiste na estimativa da concentração de uma substância por meio da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica; é atualmente aceito pela comunidade científica (GUBBELS-VAN HAL et al, 2005; ARAÚJO et al, 2010).

O estudo revelou que o prenol apresentou baixo número de mortes dentro de todas as concentrações testadas. Mesmo aquelas mais elevadas (2,2 e 5,4 mM), a média de letalidade foi pequena dentro do universo amostral; a média de sobrevivência variou de 92% a 100%, um indicativo de baixa toxicidade. Não houve morte de nenhuma *A. salina* no controle negativo, o que mostra que o solvente utilizado é inofensivo a este microcrustáceo; no controle positivo houve 100% de letalidade com o uso do dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇).

A CL_{50} é definida como a concentração de um agente que em um meio, causa a mortalidade ou inibe em cinquenta por cento (50%) a população exposta, durante um determinado período de tempo. Esse simples organismo pode ser usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, seguro e acessível. Uma vez que o ensaio permite a avaliação da toxicidade geral, é considerado um importante bioensaio da toxicologia dos produtos naturais com potencial atividade biológica (AMARANTE et al, 2011). Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia in vitro (HOCAYEN et al, 2012).

Quanto maior o valor de uma CL_{50} , menos tóxica é a substância frente a um organismo-teste; segundo os valores da CL_{50} resultante dos trabalhos de Alves e colaboradores (2000) e Araújo e colaboradores (2010), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o organismo teste *A. salina*. Como já mostrado, a CL_{50} do hemiterpeno prenol resultou em um valor de 2944,14 $\mu\text{g/mL}$, quase o triplo do valor de segurança relatado (**tabela 2**).

■ **Screening Hipocrático, determinação da DL_{50} e parâmetros quantitativos.**

Durante o tratamento, nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/kg^{-1} (**tabela 3**). O prenol não alterou a massa corpórea dos animais; não foram exibidas alterações significativas antes, durante e após a administração do prenol no período de observação (**tabela 4**). Houve, entretanto sinais e sintomas de toxicidade na maior dose, especialmente na dose 2000 mg/kg^{-1} . Foram observados a respiração aumentada, presença de frênito vocal (ruído característico da vocalização do ar), além de atividade geral diminuída, característico de atividade depressora no sistema nervoso central (SNC).

Tabela 3. Efeitos da administração aguda por via oral do prenol em camundongos durante 14 dias de observação.

Grupos	Doses mg/kg^{-1}	Nº de animais por grupo	Nº de mortes por grupo	Sinais e sintomas de toxicidade
Controle	Veículo	6	0	-
Prenol	300	6	0	Atividade geral diminuída
Prenol	2000	6	0	Respiração ofegante, atividade geral diminuída e frênito vocal.

Screening hipocrático e contagem de cobaias mortas; n = 6 por grupo. Pesquisa direta, 2015.

Tabela 4. Variação de peso corporal em camundongos durante 14 dias de observação após administração aguda por via oral do prenol.

Grupos	Doses mg/kg ⁻¹	Nº de animais por grupo	Peso por grupo dia 01 (média + EPM)	Peso por grupo dia 14 (média + EPM)
Controle	Veículo	6	26,66 ± 1,67	28,33 ± 1,67
Prenol	300	6	30 ± 0,0	31,67 ± 1,66
Prenol	2000	6	26,67 ± 1,67	26,66 ± 1,67

Resultados expressos como a média ± E.P.M. n = 6 por grupo. (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

De acordo com a OECD (2001), quando não ocorrem mortes nem mesmo na dose mais elevada (2000 mg/kg⁻¹) administrada aos roedores, a substância é enquadrada na categoria 5 (padrões da *Globally Harmonised System*). Esta categoria é destinada a produtos químicos com toxicidade aguda relativamente baixa (sob certas circunstâncias, podem representar riscos para populações vulneráveis). A DL₅₀ estimada para compostos nesta categoria varia de 2000 a 5000 mg/kg (baixa toxicidade em humanos). (ABIQUIM, 2005).

No geral, também não foram observadas alterações significativas nos parâmetros quantitativos de: consumo de água (mL), consumo de ração (g) e produção de excretas (g) durante o período de observação de 14 dias.

Os animais do grupo controle nos sete dias de observação apresentaram uma média (E.P.M) de consumo água (mL) de 137,00±1,52, 137,00±1,52, 142,00±2,30, 137,33±1,76, 137,33±2,90, 140,00±2,00 e 140,66±3,48, respectivamente. Os animais que receberam a dose de 300 mg/Kg de prenol apresentaram uma média de 144,00±1,15, 143,33±1,76, 139,33±0,66, 137,33±1,76, 136,67±2,40, 139,33±0,66 e 136,67±2,03 respectivamente. E os que receberam 2000 mg/Kg apresentaram uma média de 130,66±0,66, 139,00±0,57, 140,00±0,00, 138,67±2,90, 131,33±2,40, 134,00±2,40 e 138,67±0,88, sem diferenças significativas entre todos os dias e avaliados.

O grupo controle nos sete dias de observação apresentou uma média de consumo ração de 5,35±0,24, 6,86±0,46, 6,07±0,75, 7,45±1,49, 8,62±1,52, 7,40±1,38 e 8,24±0,23, respectivamente. Os do grupo 300 mg/Kg apresentaram uma média de 5,08±0,20, 5,72±1,52, 7,51±1,16, 9,41±0,74, 9,59±0,89, 9,70±0,43 e 10,76±0,39 respectivamente. E os que receberam 2000 mg/Kg apresentaram uma média de 6,08±0,71, 8,68±0,67, 9,12±0,59, 8,39±0,86, 10,71±1,37, 9,89±0,78 e 10,12±1,17, sem diferenças significativas entre eles.

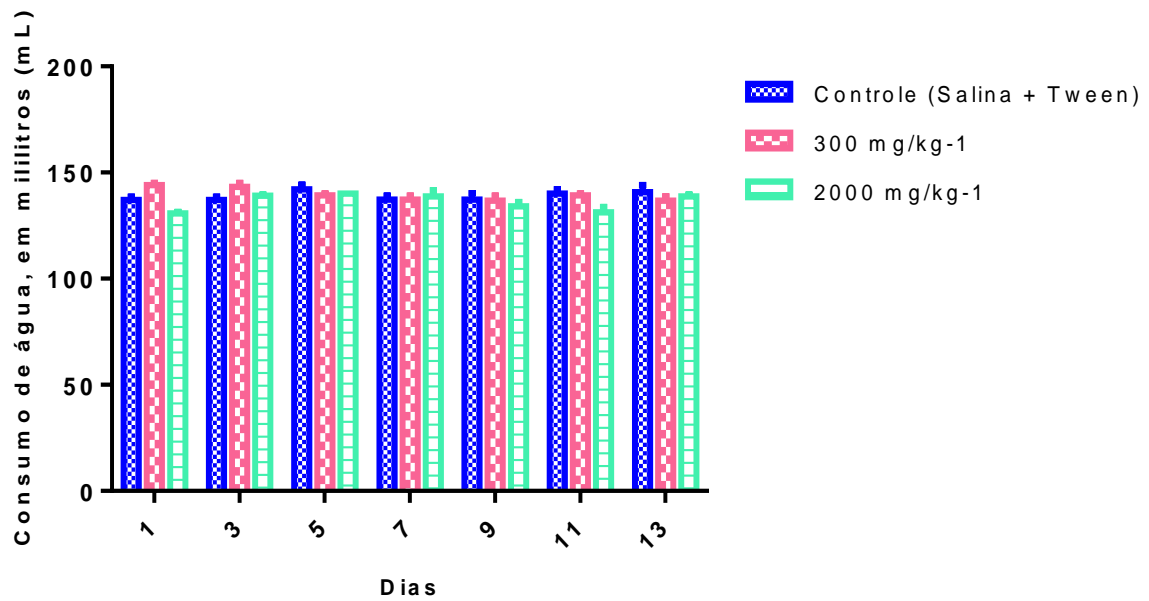


Gráfico 2. Perfil do consumo de água em camundongos após administração aguda do prenol (300 e 2000 mg/Kg). *GraphPad Prism*, 2015. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do n° de cruzamentos dos camundongos utilizados (n = 6 por grupo) (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

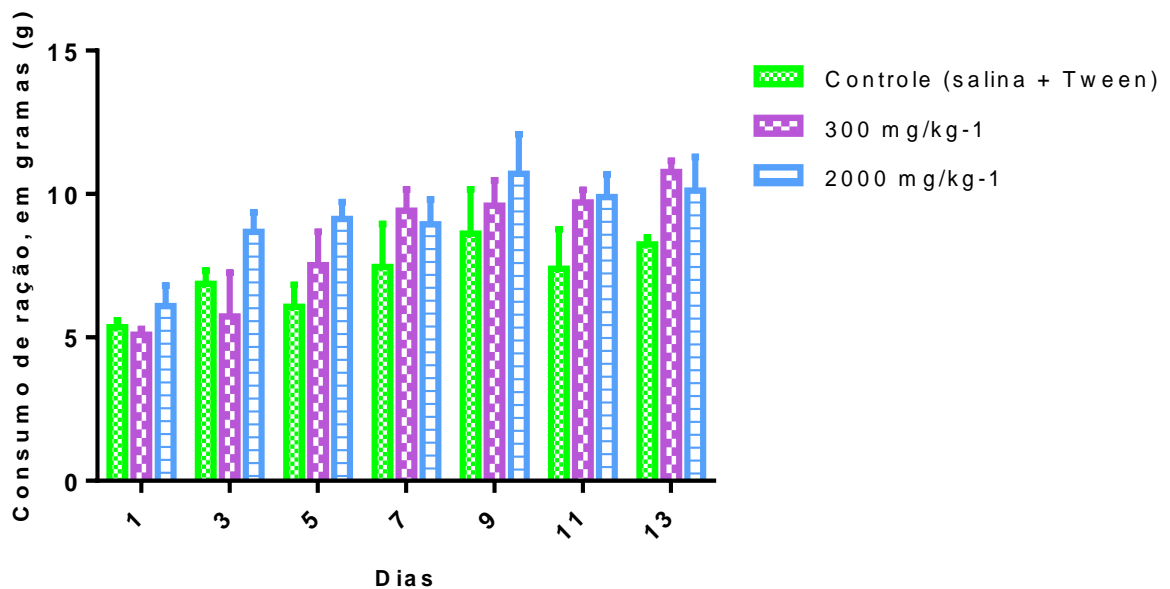


Gráfico 3. Perfil do consumo de ração em camundongos após administração aguda do prenol (300 e 2000 mg/Kg). *GraphPad Prism*, 2015. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do n° de cruzamentos dos camundongos utilizados (n = 6 por grupo) (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

Os animais do grupo controle nos sete dias de observação apresentaram uma média (E.P.M) de produção de excretas (g) de $1,97\pm 0,11$, $2,96\pm 0,13$, $1,82\pm 0,45$, $2,84\pm 0,70$, $2,75\pm 0,90$, $4,01\pm 1,47$ e $3,47\pm 0,67$, respectivamente. Os animais que receberam 300 mg/Kg apresentaram uma média de $2,27\pm 0,24$, $2,61\pm 0,76$, $2,67\pm 0,46$, $2,77\pm 0,82$, $3,24\pm 0,19$, $3,94\pm 1,29$ e $3,23\pm 1,00$ respectivamente. E os que receberam 2000 mg/Kg apresentaram uma média de $3,71\pm 1,30$, $3,61\pm 0,81$, $3,09\pm 0,90$, $2,18\pm 1,13$, $3,61\pm 0,81$, $4,81\pm 0,30$ e $5,49\pm 1,44$, sem diferenças significativas entre todos os dias e avaliados.

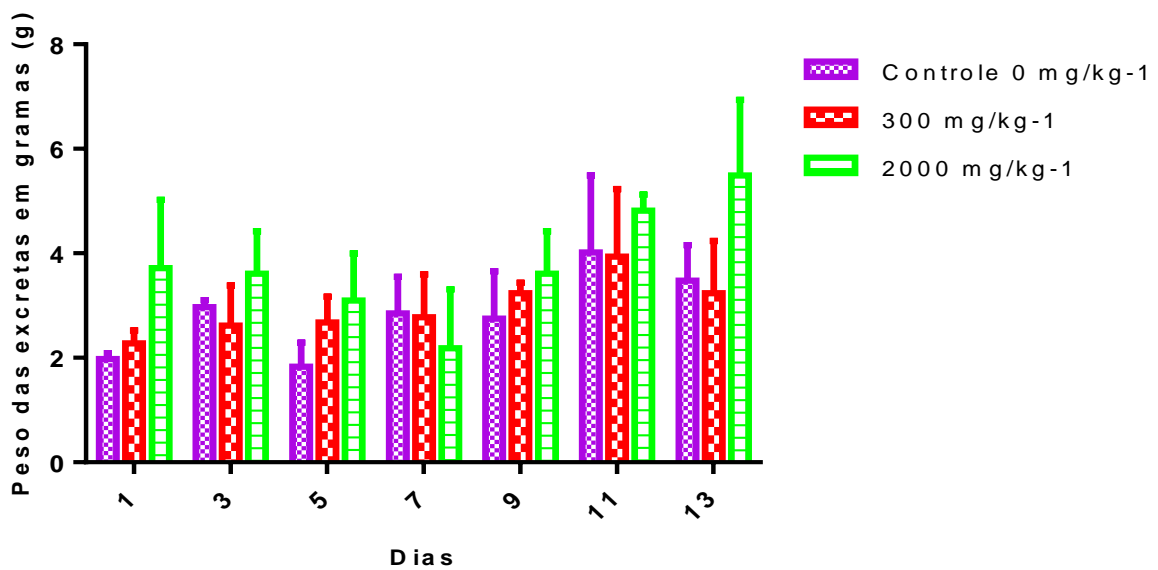


Gráfico 4. Produção de excretas em camundongos após administração aguda do prenol (300 e 2000 mg/Kg). Os resultados foram expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do n° de cruzamentos dos camundongos utilizados ($n = 6$ por grupo) (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

É importante destacar que embora os valores do grupo de 2000 mg/Kg apresentem médias superiores aos outros grupos, os erros padrões das médias são elevados; como os grupos possuem apenas três animais, elevações em um único animal tendem a superestimar os dados. No décimo terceiro dia, por exemplo, para uma média de 5,44 gramas de excretas produzidas, é apresentado um erro padrão de quase um ponto e meio entre amostras do grupo; para um universo de médias inferiores a seis gramas, tais erros invalidam qualquer significância estatística que pudesse ocorrer.

■ Avaliação comportamental

A média do número de cruzamentos do grupo controle no primeiro, sétimo e décimo quarto dia foi de $80,67 \pm 2,67$, $46,33 \pm 1,33$ e $46,00 \pm 0,0$, respectivamente. O grupo de 300 mg/Kg de prenol apresentou média de $44,67 \pm 4,17$, $39,33 \pm 2,96$ e $37,33 \pm 2,18$, respectivamente. E o grupo de 2000 mg/Kg apresentou médias de $30,33 \pm 5,48$, $26,67 \pm 7,33$ e $19,33 \pm 3,28$.

Assim, percebe-se que no primeiro dia, houve diferença significativa entre os grupos de 300 e 2000 mg/Kg do prenol e o grupo controle, com diminuição da atividade geral das cobaias, devido à diminuição do número de cruzamentos (*crossings*) (gráfico 5).

Também nota-se que mesmo com o passar do período de 14 dias, o grupo de 2000 mg/Kg, apresenta índices significativamente menores quando comparado ao controle, o que não ocorre com a dose de 300, inferindo um sinal de toxicidade no sistema nervoso central.

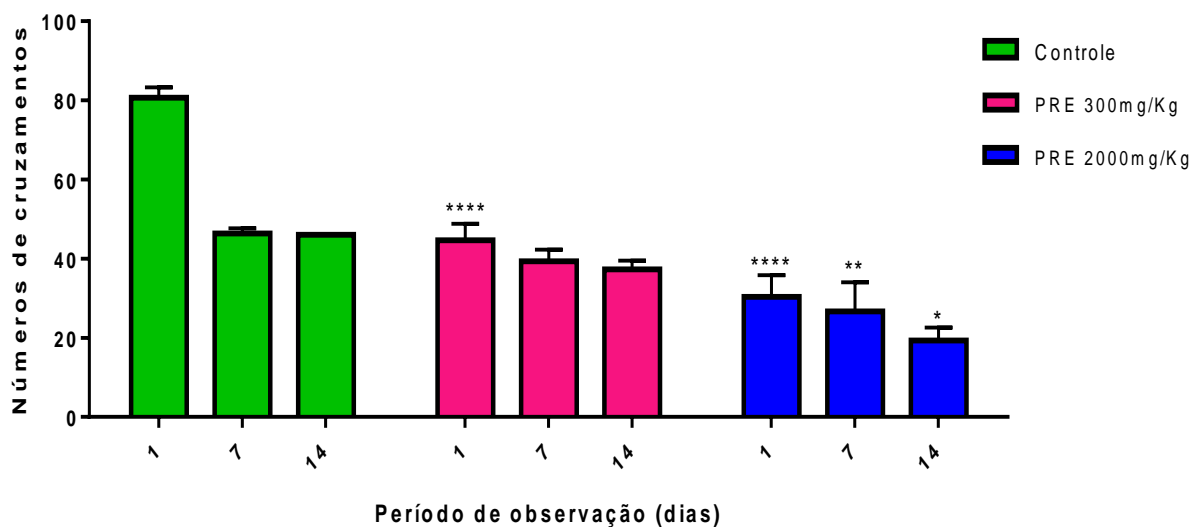


Gráfico 5. Número de cruzamentos realizados por camundongos após administração oral única do prenol, e período de observação de 14 dias. *Graphpad Prism*, 2015. Os resultados foram expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do n° de cruzamentos dos camundongos utilizados ($n = 6$ por grupo) (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

O prenol também diminuiu o número de levantamentos (*readings*) do grupo que recebeu a dose 2000 mg/kg⁻¹ em comparação ao grupo controle e ao grupo de 300 mg/kg⁻¹ (**gráfico 6**). A média do número de levantamentos do grupo controle no primeiro, sétimo e décimo quarto dia foi de 38,33±2,84, 27,67±2,66 e 23,67±5,78, respectivamente. O grupo de 300 mg/Kg de prenol apresentou média de 23,33±1,76, 22,00±1,55 e 15,67±1,20, respectivamente. E o grupo de 2000 mg/Kg apresentou médias de 19,66±2,33, 14,67±2,60 e 8,66±4,66.

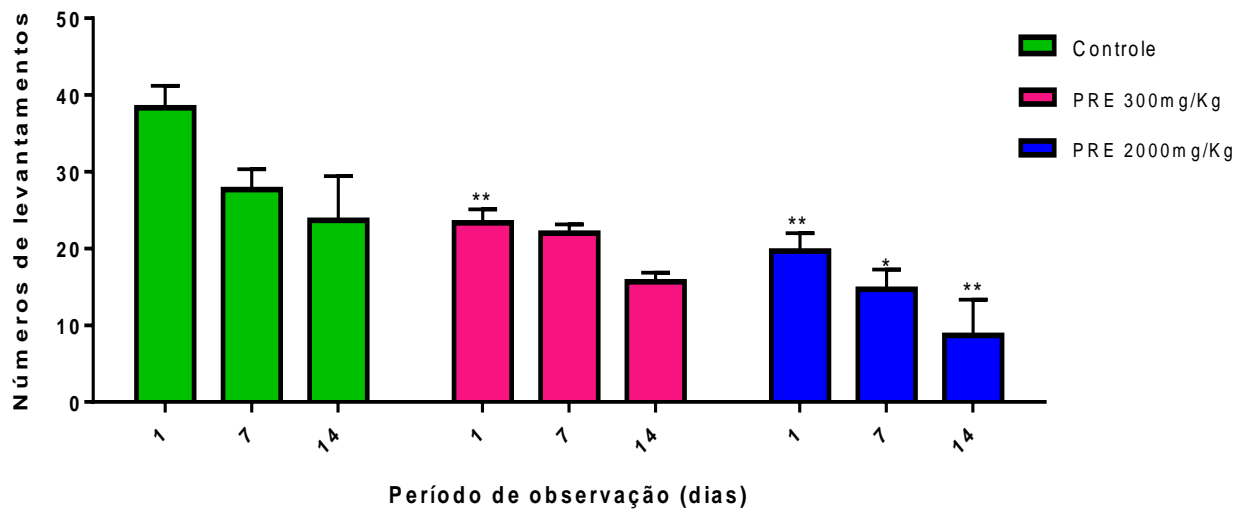


Gráfico 6. Número de levantamentos realizados por camundongos após administração oral única do prenol, e período de observação de 14 dias. *Graphpad Prism*, 2015. Os resultados foram expressos como a média ± Erro Padrão da Média (E.P.M.). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do n° de cruzamentos dos camundongos utilizados (n = 6 por grupo) (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

A média do número de movimento de auto-limpeza (*groomings*) do grupo controle no primeiro, sétimo e décimo quarto dia foi de 17,00±1,15, 23,00±1,52 e 29,00±4,50, respectivamente. O grupo de 300 mg/Kg de prenol apresentou média de 5,33±0,88, 19,33±4,00 e 15,66±4,37, respectivamente. E o grupo de 2000 mg/Kg apresentou médias de 4,67±0,66, 15,00±3,21 e 21,00±2,08. (**gráfico 7**)

Com exceção do primeiro dia, que exibiu uma diminuição dos *groomings* dos grupos de 300 e 2000 mg/Kg em relação ao grupo controle, se nota um aumento dos mesmos com o passar dos quatorze dias após a administração do prenol, embora em sua maior parte não sejam estatisticamente diferentes.

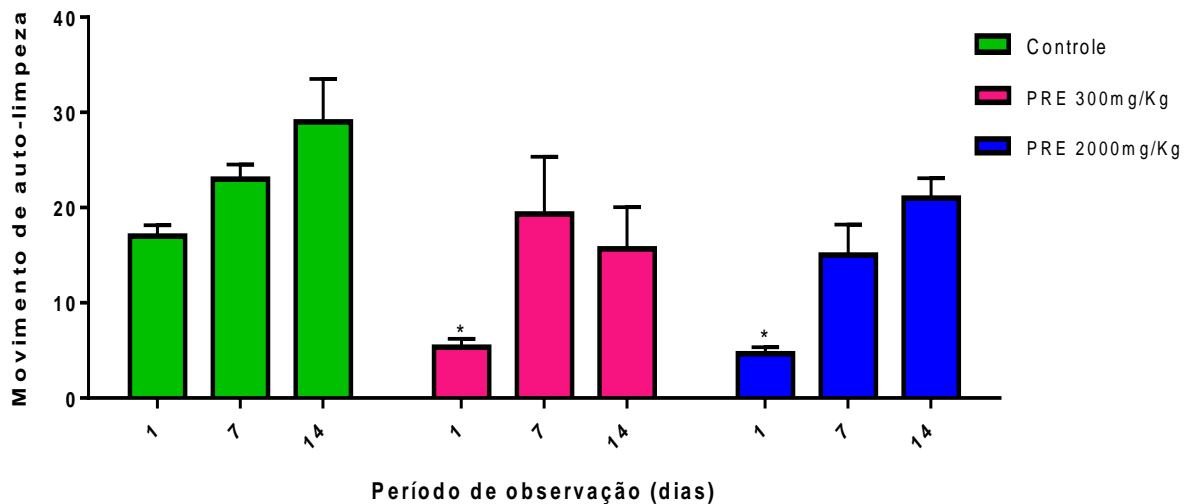


Gráfico 7. Número de movimentos de auto-limpeza realizados por camundongos após administração oral única do prenol, em período de observação de 14 dias. *Graphpad Prism*, 2015. Os resultados foram expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle do nº de cruzamentos dos camundongos utilizados ($n = 6$ por grupo) (ANOVA e *t-Student* como *post hoc* teste). Pesquisa direta, 2015.

O teste de campo aberto visa avaliar a movimentação espontânea dos animais. Ele pode fornecer respostas importantes que indicam a ação de uma droga ou planta medicinal sobre a memória, aprendizagem ou medo do animal. (MATTEI; FRANCA, 2006).

Os resultados mostraram que o prenol nas doses testadas no primeiro dia, reduziu a atividade locomotora (*crossings*), o número de levantamentos (*readings*) e os movimentos de auto-limpeza (*groomings*) sugerindo uma ação depressora sobre o comportamento. Dados na literatura demonstram que a redução na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade neuronal e esta redução pode estar relacionada à depressão do sistema nervoso central. Costa^A (2012), Costa^B (2) (2012) Almeida (2013) também relataram terpenóides e derivados com capacidade de diminuir os três parâmetros, a ciano-carvona, o fitol e o epóxi-limoneno, respectivamente.

Em relação ao movimento de auto-limpeza, embora se note redução no primeiro dia após a administração do prenol, com o passar das semanas ocorre um aumento, diferente dos outros parâmetros; a literatura classifica isto como um tipo de comportamento deslocado. A literatura apresenta relatos de trabalhos onde o *grooming* foi considerando comportamento deslocado, com a possibilidade de estar relacionado à agressividade frustrada (CHEN et al, 2010; AGUDELO et al, 2013).

Em relação ao teste de barra giratória (*rota rod*), não houve diferença significativa entre o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória nem entre o número de quedas, dos grupos testados, como pode ser observado abaixo.

Tabela 5. Efeitos do prenol em camundongos no tempo de permanência no teste de barra giratória após administração oral única, e período de observação de 7 e 14 dias.

Tempo de permanência (s)				
Grupos	Doses mg/kg ⁻¹	Dia 01	Dia 07	Dia 14
Controle	Veículo	180 ± 0,0	180 ± 0,0	177 ± 1,53
PRE	300	178,33 ± 4,00	176 ± 1,00	174 ± 3,46
PRE	2000	176 ± 2,08	176 ± 2,08	176 ± 0,57

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc. Pesquisa direta, 2015.

Tabela 6. Efeitos do prenol em camundongos no número de quedas no teste de barra giratória após administração oral única, e período de observação de 7 e 14 dias.

Número de quedas				
Grupos	Doses mg/kg ⁻¹	Dia 01	Dia 07	Dia 14
Controle	Veículo	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,67 ± 0,33
PRE	300	0,0 ± 0,0	1,33 ± 0,33	1,67 ± 0,88
PRE	2000	0,67 ± 0,33	1,33 ± 0,33	1,0 ± 0,0

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc. Pesquisa direta, 2015.

O teste da barra giratória consiste em colocar camundongos sobre uma barra que gira a uma velocidade constante e verificar a capacidade do animal equilibra-se sobre a mesma. Esse teste mede o efeito do relaxamento muscular ou de incoordenação motora produzidos pelos ansiolíticos, por exemplo, que costumam interferir diretamente no número de quedas e tempo de permanência na barra giratória. (MATTEI; FRANCA, 2006).

Em relação ao teste de *rota rod*, não houve diferença significativa entre o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória nem no número de quedas, entre os grupos, o que indica que o prenol nas doses testadas não produziu relaxamento muscular, excluindo a diminuição do número de levantamentos e cruzamentos no teste de campo aberto à este fator; portanto presume-se a possibilidade de que estes ocorreram por um efeito depressor no SNC.

Dessa forma, pode-se sugerir que o prenol apresenta um possível efeito sedativo, ao diminuir os parâmetros no teste do campo aberto; por outro lado demonstra um melhor potencial farmacológico de importância clínica, já que não altera a coordenação motora, como os benzodiazepínicos clássicos. Resultados semelhantes foram obtidos com a ciano-carvona (COSTA^A, 2012), já epóxi-limoneno e fitol, em maiores concentrações elevaram o número de quedas e diminuíram o tempo de permanência na barra.

Há na literatura o relato de um hemiterpenóide com propriedades ansiolíticas e hipnóticas, o 2-metil-3-buten-2-ol (estruturalmente semelhante ao prenol), encontrando no choupo (*Populus tremula*) e em duas espécies de bétula (*Betula pendula* Roth e *Betula pubescens* Ehrh), plantas típicas das floretas temperadas, o que serve de indício de possível atividade no sistema nervoso central do prenol (WOHLFART, HANSEL E SCHMIDT 1983; ZHANG, SCHLYTER E BIRGERSSON, 2012).

■ Toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os camundongos tratados com as doses de 300 e 2000 mg kg⁻¹ via oral do prenol apresentaram todos os parâmetros hematológicos dentro da faixa de referência, observando-se pequenas alterações no valor dos linfócitos segmentados, mas sem indicativo de repercussão clínica (p<0,05; **Tabela 7**).

Na tabela 8, são apresentados os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos aos ensaios toxicológicos pré-clínicos, por via oral; houve pequenas alterações nos parâmetros analisados sem indicativo de importância clínica. Os valores de glicose e ácido úrico diminuíram na dose de 2000 mg kg⁻¹ em relação ao veículo (p<0,05; **Tabela 8**).

Tabela 7. Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com prenol por via oral.

Parâmetros	Controle	PRE 300 mg/kg ⁻¹	PRE 2000 mg/kg ⁻¹
Hemácias	7,82 ± 0,77	7,60 ± 0,40	8,03± 0,69
Hemoglobina	9,90 ± 0,50	9,83 ± 0,44	9,23 ± 0,54
Hematócrito	36,06 ± 1,45	36,23 ± 3,37	36,23 ± 1,26
VCM	46,67± 2,33	47,00± 1,53	47,33± 2,60
CHCM	27,43 ± 0,48	27,47 ± 1,49	25,43 ± 0,71
RDW%	19,83± 0,65	19,90 ± 0,26	21,86± 0,96
Leucócitos totais	2250,0 ± 376,6	2193,3 ± 129,1	2866 ± 338,3
Linfócitos	90,67 ± 1,76	88,0 ± 3,60	76,33 ± 1,76
Segmentados	4,66 ± 0,88	4,33 ± 1,20	20,00 ± 2,51*

Parâmetros bioquímicos obtidos de camundongos *Swiss* fêmeas, tratadas de forma aguda por via oral, com veículo (Controle, n = 6) e com prenol nas doses 300 mg/kg⁻¹(PRE 300, n = 6) e 2000 mg/kg⁻¹ (PRE 2000, n = 6). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. *p<0,05 em relação ao controle. Pesquisa direta, 2015.

Os camundongos tratados com as doses de 300 e 2000 mg kg⁻¹ via oral do prenol apresentaram todos os parâmetros hematológicos (hemácias, hematócrito, hemoglobina e os índices hematimétricos, bem como contagem leucocitária) dentro da faixa de referência, observando-se pequenas alterações no valor dos neutrófilos segmentados (p<0,05; Tabela 5), mas sem repercussão clínica nos camundongos. O leucograma não exibiu aumento significativos de leucócitos totais, que podem ser causados pela elevação de neutrófilos e linfócitos, ou somente uma dessas linhagens de células (THRALL et al, 2004; STEIN et al 2010).

Entretanto, no grupo prenol 2000 mg/kg⁻¹ foi observado um significativo aumento dos neutrófilos segmentados. O quadro de neutrofilia apresenta variadas causas, desde infecções bacterianas, inflamação e necrose tecidual, distúrbios metabólicos, fármacos (como corticosteroides), até o consumo de álcool. (GONZÁLEZ e SILVA, 2008).

O consumo crônico de álcool tem sido associado com um aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares em alguns órgãos, especialmente no fígado; se admite que metabólitos do álcool sejam capazes de ativar células de *Kupffer* a produzir fatores quimiotáticos para neutrófilos, aumentando a exsudação dessas células (GAO e BATALLER, 2011; TRABUT et al, 2012). Uma vez que o prenil é um álcool simples, é uma possibilidade que a maior dose tenha provocado um aumento dos neutrófilos na circulação.

Tabela 8. Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss*, tratados com prenil por via oral.

Parâmetros	Controle	PRE 300 mg/kg ⁻¹	PRE 2000 mg/kg ⁻¹
Glicose (mg dL ⁻¹)	130,16 ± 0,38	125,83 ± 0,49	113,16 ± 0,47*
Uréia (mg dL ⁻¹)	27,43 ± 0,66	27,83 ± 0,73	26,90 ± 0,41
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,41 ± 0,36	0,45 ± 0,42	0,50 ± 0,56
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	2,45 ± 0,10	2,30 ± 0,37	1,89 ± 0,55*
AST/TGO (UI/L)	299,63 ± 28,86	225,06 ± 2,24	250,90 ± 5,77
ALT/TGP (UI/L)	60,40 ± 4,10	53,13 ± 3,97	48,56 ± 0,16
Fosfatase alcalina	196,53 ± 1,33	204,43 ± 8,55	203,23 ± 31,02
Triglicérides	70,00 ± 0,58	69,33 ± 3,84	71,66 ± 4,41
Bilirrubina total	0,31 ± 0,15	0,28 ± 0,07	0,34 ± 0,02

Parâmetros bioquímicos obtidos de camundongos *Swiss* fêmeas, tratadas de forma aguda por via oral, com veículo (Controle, n = 6) e com prenil nas doses 300 mg/kg⁻¹(PRE 300, n = 6) e 2000 mg/kg⁻¹ (PRE 2000, n = 6). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. *p<0,05 em relação ao controle. Pesquisa direta, 2015.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos nos camundongos se deu através da determinação de seus níveis séricos: uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), fosfatase alcalina, triglicérides e bilirrubina total; os mesmos não foram alterados nos animais tratados com prenil, independente da dose.

Como a elevação nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (CAUTHEN et al, 2008), e como os mesmos encontram-se dentro dos níveis de referência, infere-se que não há sobrecarga ou toxicidade renal.

Em virtude dos níveis séricos dos marcadores hepáticos alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), fosfatase alcalina e bilirrubina total não mostrarem diferenças significativas nem alterar tais parâmetros para fora dos valores de referência, presume-se que o prenol não possui a capacidade tóxica frente ao sistema hepático.

As aminotransferases aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase são enzimas hepáticas intracelulares, que são liberadas para a circulação periférica em consequência da perda de integridade celular durante injúria e morte dos hepatócitos (SOUZA et al, 2014). A presença pouco significativa da ALT em outros tecidos que não o do fígado, ao contrário da AST, faz dela um marcador mais específico da função hepática. (PINTO et al, 2012; MAHTAB et al, 2013)

Por outro lado, houve pequenas alterações nos valores de glicose e ácido úrico ($p < 0,05$) sem indicativo de importância clínica. Os mesmos encontraram-se significativamente diminuídos na dose de 2000 mg kg^{-1} em relação ao controle.

Sabe-se que a glicose é um importante substrato energético para o organismo e por isso, tem-se estudado exaustivamente o seu comportamento em várias situações fisiológicas e patológicas. Em condições fisiológicas normais a glicose é o principal substrato energético do sistema nervoso central (SNC), não sendo este capaz de sintetizar ou armazenar glicose em quantidades suficientes para subsistir além de alguns minutos quando privado da reserva orgânica. (SILVEIRA et al, 2011).

Uma vez que o estoque desse substrato é limitado no organismo, é importante descobrir de que maneira o prenol é capaz de modificar o metabolismo glicídico. Deve-se levar em conta que trata-se de uma dose extremamente elevada, e não se pode tirar conclusões sobre um possível efeito hipoglicemiante.

Muitas substâncias extraídas de plantas reduzem o nível de glicose no sangue. A grande diversidade de classes químicas indica que uma variedade de mecanismos de ação deve estar envolvida na redução do nível de glicose no sangue. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico enquanto outras podem produzir hipoglicemia como um efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (NEGRI, 2010).

Os níveis séricos de ácido úrico foram reduzidos com prenol na dose de 2000 mg kg^{-1} . A produção excessiva e/ou a baixa excreção de ácido úrico provocam um estado patológico chamado de gota. Na presença de oxigênio molecular, a enzima xantina oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina a xantina e esta a ácido úrico (TASAKI et al, 2008; BESERRA et al, 2010). De alguma forma, o prenol, no modelo de toxicidade aguda foi capaz de reduzir

significativamente os níveis de ácido úrico, o que leva a possíveis inferências de como terpeno em altas concentrações pode ser capaz de interferir no funcionamento da xantina oxidase, um indicativo de uma provável atividade antioxidante *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, concluiu-se que o hemiterpeno prenol não apresenta efeitos tóxicos frente às *A. salinas*, tampouco produz alterações hematológicas, bioquímicas e fisiológicas significativas, embora module o comportamento dos camundongos; O prenol ainda precisa ser analisado por meio de outros testes de avaliação toxicológica para a confirmação dos resultados. Devido à ausência de toxicidade aguda grave durante 14 dias de observação, novos estudos comportamentais e toxicológicos com esse hemiterpeno precisam ser realizados, a fim de esclarecer possíveis mecanismos de ação e justificar o uso do prenol de forma segura e eficaz, como um potencial agente terapêutico para o tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS

ABIQUIM - Associação Brasileira da Indústria Química. Departamento de Assuntos Técnicos. O que é o GHS? Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos. São Paulo: ABIQUIM/DETEC, 2005. 69p.

AGUDELO, J.A.B.; MV, MSC; QUADROS, S.A.F.; MV, MSC, DR.; MACHADO FILHO, L.C.P. Scratching, cleaning and social bonding: grooming and their biological meaning in ruminants. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**. v.8, n.2, p.120-131, 2013.

ALMEIDA, A.A.C. Potencial antioxidante e ansiolítico de um composto semissintético derivado do limoneno: ênfase no delineamento de um fitomedicamento. 2013. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: ALMEIDA, R.N (Org) *Psicofarmacologia. Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1ª edição, p.131-137, 2006.

AMARANTE, C.B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade

antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta amazônica**. v.41, n.3, p. 431-434, 2011.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; JÚNIOR, A.S.; ZANI, C.L. **Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants**, v.95, n.3, p.367-73, 2000.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de Medicamentos. 48p. 2º versão, Janeiro, 2013.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-35, 1973.

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Estudo fotoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.31, n.2, p.205-209, 2010.

BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; TAGAMI, H. A safety assessment of non-cyclic alcohols with unsaturated branched chain when used as fragrance ingredients: the RIFM expert panel. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, n.3, p.1-42, 2010.

BESERRA, A.M.S.; SOUZA, M.C.; COLODEL, M.; SILVA JUNIOR, I.F.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da toxicidade do ácido elágico em roedores. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 91, n.1, p.16-24, 2010.

BICAS, J.L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**. v.44, n.7, p.1843–1855, 2011.

CAUTHEN, C.; LIPINSKI, M.; ABBATE, A.; APPLETON, D.; NUSCA, A.; VARMA, A. Relation of blood urea nitrogen to long-term mortality in patients with heart failure. **American Journal of Cardiology**. v.101, n.11, p.1643-7, 2008

CHEN, S.K.; TVRDIK, P.; PEDEN, E.; CHO, S.; WU, S. Hematopoietic origin of pathological *grooming* in *Hoxb8* mutant mice. **Cell**. v.141, n.5, p.775-785, 2010.

COSTA^A, D.A. Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos: subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos. 2012. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

COSTA^B, J.P. Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos, 2012. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

CUNHA, L.C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L; SILVA, M.A.C.; CONCEICAO, E.C. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n.3, p. 357-362, 2013.

DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, v.43, n.10, p.1564-1572, 2010.

FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. *Flavour and Fragrance Journal*. v.20, n.4, p.358–371, 2005.

GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets, **Gastroenterology**. v.141, n.5, p.1572-85, 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D; SILVA, S.C. (Editores) **Patologia clínica veterinária: texto introdutório** – Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

GUBBELS-VAN HAL W.M.; BLAAUBOER B.J.; BARENTSEN H.M.; HOITINK M.A.; MEERTS I.A.; VAN DER HOEVEN J.C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 42, n. 3, p. 284-95, 2005.

HOCAYEN, P.A.S.; CAMPOS, L.A.; POCHAPSKI, M.T.; MALFATTI, C.R.M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**. n. 41, p. 23-31. 2012.

MAHTAB, M.A.; FAZLE AKBAR, S.M. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review. **Journal of Gastroenterology and Hepatology Research**.; v.2, n.3, p.439-444, 2013.

MARIZ, S.R.; ARAÚJO M.S.T.; CERQUEIRA, G.S.; DUARTE, W.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p.213-6, 2008.

MATTEI, R.; FRANCA, C.I.F. Testes Gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R.N (Org) *Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1ª edição, p.138-142, 2006.

MCGINTY, D.; JONES, L.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on 3-methyl-2-buten-1-ol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n.3, p.64–69, 2010.

MCLAUGHLIN, J.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**. v.32, n.2, p.513-24, 1998.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.2, p.121-141, 2010.

NIOSH, *National Institute for Occupational Safety and Health*. International Chemical Safety Cards. n.1760, p.1-135, 2010.

OECD - Organisation For Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.

OECD/SIDS (Organization for Economic Co-operation and Development/Screening Information Datasets). High Production Volume Chemicals 3-Methylbut-2-en-1-ol (Cas No: 556-82-1). 2005. 85p. United Nations Environmental Program, (UNEP) Chemicals, Paris, 2005.

PINO, J.A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C.E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia L.*) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.183-187, 2010.

PINTO, C.G.S.; MAREGA, M.; CARMONA, F.G.; D'ÁUREA, C.; CARVALHO, J.A.M.; FIGUEIRA JUNIOR, A. Esteatose Hepática e Estilo de Vida Ativo: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v.20, n.3, p.125-134, 2012.

SHIOTSUKI, H.; YOSHIMI K, S.Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**. v.189, n.2, p.180–185, 2010.

SILVEIRA, L.R.; PINHEIRO, C.H.J. ; ZOPPI, C.C.; HIRABARA, S.M.; VITZEL, K.F.; BASSIT, R.A.; BARBOSA, M. R.; SAMPAIO, I.H.; MELO, I. H.P.; FIAMONCINI, J.; CARNEIRO, E.M.; CURI, R. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n.5, p. 303-313, 2011.

SOUZA, A.V.; CONDESSA, L.A.; GUEDES, J.C.; CONDESSA, V.A.; MAZINE FILHO, M. L.; JESUS, R.P. Doença hepática gordurosa não alcoólica. **Revista Ciências em Saúde**, v. 4, n.1, p.1-13, 2014.

STEIN, G.G.; LACERDA, L.A.; HLAVAC, N.; STOLZ, J.F.B.; STEIN, I.V.; FREITAS, T.R.O. ; CARISSIMI A.S. Parâmetros hematológicos do roedor fossorial *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomidae) no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.8, p.670-675, 2010.

TASAKI, M.; UMEMURA, T.; MAEDA, M., et al. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n.3, p.1119-24, 2008.

THRALL, R.S.; SCHRAMM C.M.; PUDDINGTON, L.; WU, C.; GUERNSEY, L.; GHRAEE-KERNANI, M.; PHAN, S.H. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. **American Journal of Pathology**. v.164, n.1, p.295-304, 2004.

TRABUT, J.B.; THÉPOT, V.; SOGNI, P.; POL, S. Hépatite alcoolique aiguë, **La Revue de Médecine Interne**, v.33, n.6, p.311-317, 2012.

WOHLFART, R.; HANSEL, R.; SCHMIDT, H. Sedative hypnotic principles in hops. Part 4. Pharmacology of the hop constituent 2-methyl-3-buten-2-ol. **Planta Medica**. v.48, n.2, p. 120–123, 1983.

ZHANG, Q.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. 2-methyl-3-buten-2-ol: A Pheromone Component of Conifer Bark Beetles Found in the Bark of Nonhost Deciduous Trees. **Psyche: A Journal of Entomology**, v.2012, p.1-7, 2012.



CAPÍTULO III – Determinação do potencial antioxidante *in vitro* do hemiterpenóide prenil (3-metil-2-buten-1-ol)

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO HEMITERPENÓIDE PRENOL (3-METIL-2-BUTEN-1-OL)

Alexandre Xavier de Lira da Silva¹; Brenda Nayranne Gomes dos Santos²; Damião Pergentino de Sousa⁴; Rivelilson Mendes de Freitas³; Maria das Graças Freire de Medeiros³

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

²Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil

³Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil

⁴Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe, Sergipe, Brasil.

RESUMO: As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio e nitrogênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade. O estresse oxidativo é resultante de um desequilíbrio entre a formação de antioxidantes e de radicais livres produzidos pelo organismo, ocasionando danos ao DNA e proteínas, juntamente com a peroxidação de lipídeos. Eventualmente, estas mudanças levam ao surgimento de diversas doenças crônicas, como diabetes mellitus, câncer, aterosclerose, inflamação, envelhecimento precoce. Há trabalhos na literatura que citam a ocorrência em plantas medicinais de metabólitos secundários que apresentam propriedades antioxidantes os terpenos. Esses constituintes bioativos são alvos de novos estudos para a elucidação de potenciais fármacos antioxidantes. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do hemiterpeno prenol via inibição dos radicais hidroxila, nitrito, espécies reativas do TBARS, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•⁺). Foram utilizadas concentrações definidas do prenol e do ácido ascórbico como padrão antioxidante. O método por DPPH• e ABTS•⁺ baseou-se na reação direta dos radicais sintéticos com os compostos testes. O radical hidroxila foi gerado pela reação de Fenton; O óxido nítrico foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio. A capacidade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica foi baseada no método de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. O prenol exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente ao radical hidroxila, significativamente superior ao ácido ascórbico; foi semelhante a este frente ao radical nitrito e peroxidação lipídica por espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Também exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente aos radicais DPPH• e ABTS•⁺, embora de maneira inferior ao ácido ascórbico. Pode ser sugerido que o prenol, pode formar um complexo com radicais livres, ao doar hidrogênios convertendo estes radicais em espécies menos reativas. Diante dos resultados apresentados foi possível verificar o potencial antioxidante *in vitro* do prenol frente aos testes antioxidantes. Entretanto, o fato da prenol ser capaz de reduzir o dano oxidativo *in vitro* não garante que o mesmo possua as mesmas propriedades antioxidantes *in vivo*. Embora este terpenóide tenha demonstrado tal potencial, é necessária a constatação dessa característica em sistemas orgânicos.

Palavras-chave: Prenol; hemiterpeno; antioxidante; *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores avanços dos seres vivos, durante seu processo evolutivo foi a capacidade de utilização do oxigênio (O_2) nos processos de produção de energia no interior das células. Contudo, simultaneamente em que a utilização de oxigênio se tornou fundamental no desenvolvimento de organismos mais complexos, essa mesma necessidade vital trouxe consigo um indesejável efeito (ALVES et al., 2010). A molécula de O_2 além de atuar como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial pode originar espécies químicas capazes de reagir com as demais biomoléculas, principalmente proteínas e fosfolípídeos, inativando-as e prejudicando o metabolismo intracelular (BOKHARI et al., 2012).

Essas substâncias originadas a partir do oxigênio são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs's), e compõem, junto das espécies reativas de nitrogênio (ERN's), o grande grupo dos radicais livres. EROs e ERNs desempenham um papel importante na fisiologia celular podendo atuar como um mecanismo inflamatório de defesa contra micro-organismos, por exemplo (HALLIWELL, 2011; BRIEGERA et al, 2012). Apesar de serem parte importante do processo fisiológico, EROs e ERNs, por possuírem elétrons desemparelhados, são moléculas altamente reativas e interagem com componentes celulares produzindo diversos danos oxidativos, que podem culminar com o estresse oxidativo (TELES et al, 2015).

O estresse oxidativo é resultante de um desequilíbrio entre a formação de antioxidantes e de radicais livres produzidos pelo organismo, que buscam estabilidade por meio do emparelhamento de elétrons com macromoléculas biológicas ocasionando danos ao DNA, proteínas e peroxidação de lipídios das células (ZHANG et al, 2014). Eventualmente, estas mudanças levam ao surgimento de diversas doenças crônicas, como diabetes mellitus, câncer, aterosclerose e Alzheimer (CERCHIARO e HONÓRIO, 2011; ALFADDA e SALLAM, 2012; COSTA et al 2012; NOGUEIRA NETO et al, 2013, XINYUAN et al, 2013).

O corpo humano tem desenvolvido diferentes mecanismos tanto enzimáticos quanto não enzimáticos para eliminar as espécies reativas de oxigênio. No entanto, para combater o estresse oxidativo em condições severas, atenção considerável vem sendo concentrada no isolamento, caracterização e utilização de agentes antioxidantes naturais na prevenção de doenças (ALASALVAR e BOLLING, 2015).

Tipicamente as defesas antioxidantes tem origem enzimática, com destaque para a glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ou não enzimática no qual se enquadram produtos de origem exógena adquiridos por meio da dieta

como as vitaminas (tocoferóis e ascorbato), carotenoides, compostos fenólicos, quelantes e produtos sintéticos. Enquanto as enzimas impedem a produção de radicais livres, os antioxidantes não enzimáticos bloqueiam e previnem o estresse oxidativo ao sequestrar espécies reativas (CAROCHO e FERREIRA, 2013;).

Ao longo das últimas décadas, há um interesse crescente em estudos epidemiológicos indicando o papel do consumo de frutas e verduras como antioxidantes na prevenção de doenças degenerativas crônicas. Esses efeitos protetores dos frutos estão, sobretudo, relacionados com os componentes antioxidantes, ou seja, as vitaminas, flavonóides e os carotenóides. (BOKHARI et al., 2012; MARTELLI e NUNES, 2014)

Há trabalhos na literatura que citam a ocorrência em plantas medicinais de metabólitos secundários que apresentam propriedades antioxidantes. Essas substâncias pertencem aos mais variados grupos químicos, como os terpenos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos cianogênicos e fenilpropanóide. Esses bioativos são alvos de novos estudos para a elucidação de potenciais fármacos antioxidantes (COSTA et al 2012; SANTANA et al, 2013; ALMEIDA et al, 2014; MARQUES et al, 2014; NUNES et al, 2014; PIRES et al, 2014).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do hemiterpeno prenol via inibição de radicais livres sintéticos e gerados por reações químicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação antioxidante *in vitro* foi preparada uma solução estoque do hemiterpeno prenol diluído em DMSO 3% + água destilada e do Ácido ascórbico (AA), usado como padrão antioxidante. Em seguida por diluição do prenol e da vitamina C foram obtidas as concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM. Com essas concentrações-teste, foram determinados os percentuais de inibição frente aos radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), nitrito ($\text{NO}_2\cdot$), à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os radicais sintéticos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \cdot) e 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS \cdot^+).

A porcentagem de redução dos radicais livres (R%) foi determinada em função das medidas das absorvâncias por meio da seguinte equação: $R\% = 100 \times (Ac - AT) / Ac$, onde, Ac é a absorvância do controle (sistema), obtida do meio reacional sem a amostra e AT é o valor da substâncias testadas (prenol e ácido ascórbico).

Os dados obtidos foram analisados com o software *GraphPad Prism*® versão 6.0 e apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os resultados foram avaliados

por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

2.1. Capacidade antioxidante contra o radical hidroxila (OH•)

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila, o mesmo foi gerado pela reação de Fenton (Lopes et al, 1999). Resumidamente, várias concentrações da prenol e AA foram adicionadas à mistura da reação de Fenton contendo 1,5 mM de EDTA, 5 mM de Cloreto Férrico (FeCl_2), 50 mM de frutose, 100 mM de H_2O_2 e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4).

A reação foi realizada durante 30 minutos à temperatura de 50°C e estacionada pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de Ácido Tiobarbitúrico a 1% (w/v). Depois, foi aquecida durante 15 minutos a 95°C , e então arrefecida a temperatura ambiente (ilustração 1). O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorvâncias mensuradas a 532 nm foram expressas como equivalentes do MDA formados pelo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$.

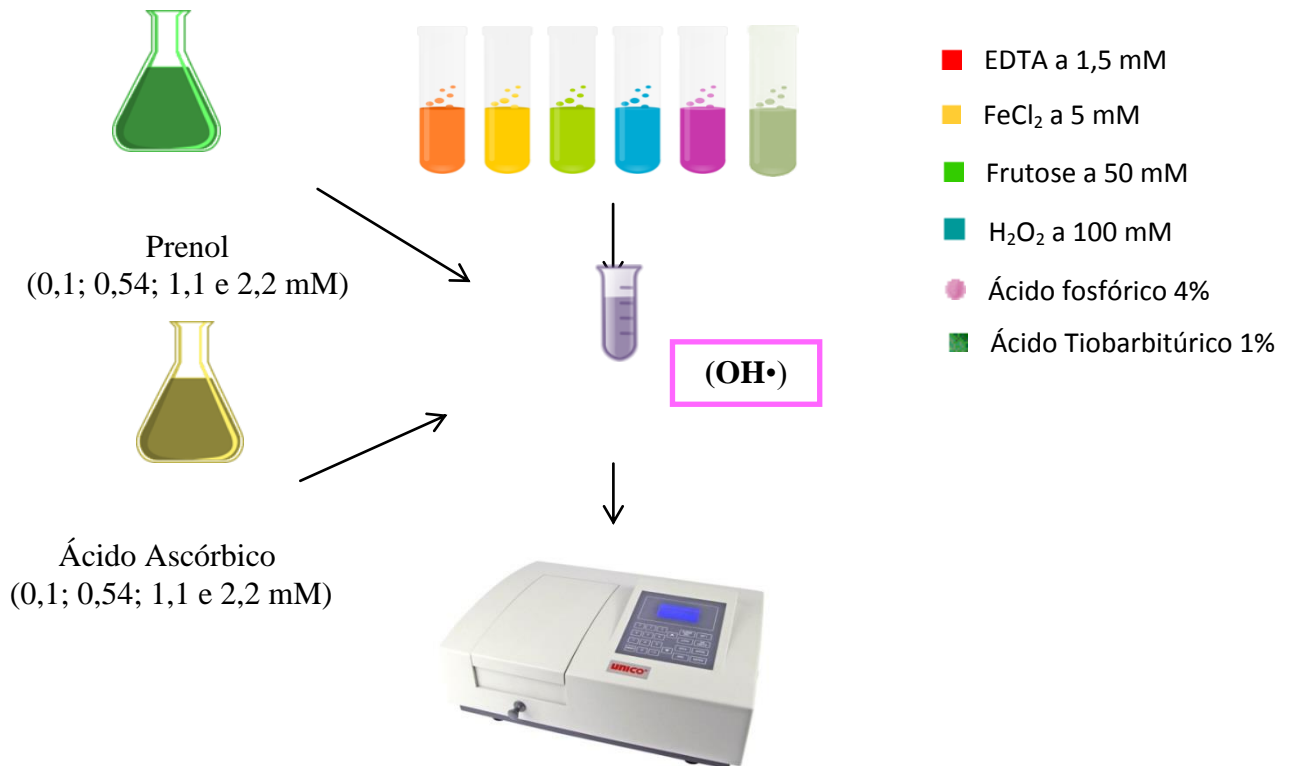


Ilustração 1. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método do radical OH•

2.2. Capacidade antioxidante contra o radical nitrato (NO_2^\cdot).

Nesta avaliação, o óxido nítrico foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com oxigênio para produzir íons nitrato, os quais foram medidos pela reação de Griess (Basu e Hazra, 2006).

A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em tampão fosfato e várias concentrações de prenol e ácido ascórbico foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess (ilustração 2). A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro e os resultados foram expressos como porcentagem de nitrato formado pelo meio reacional.

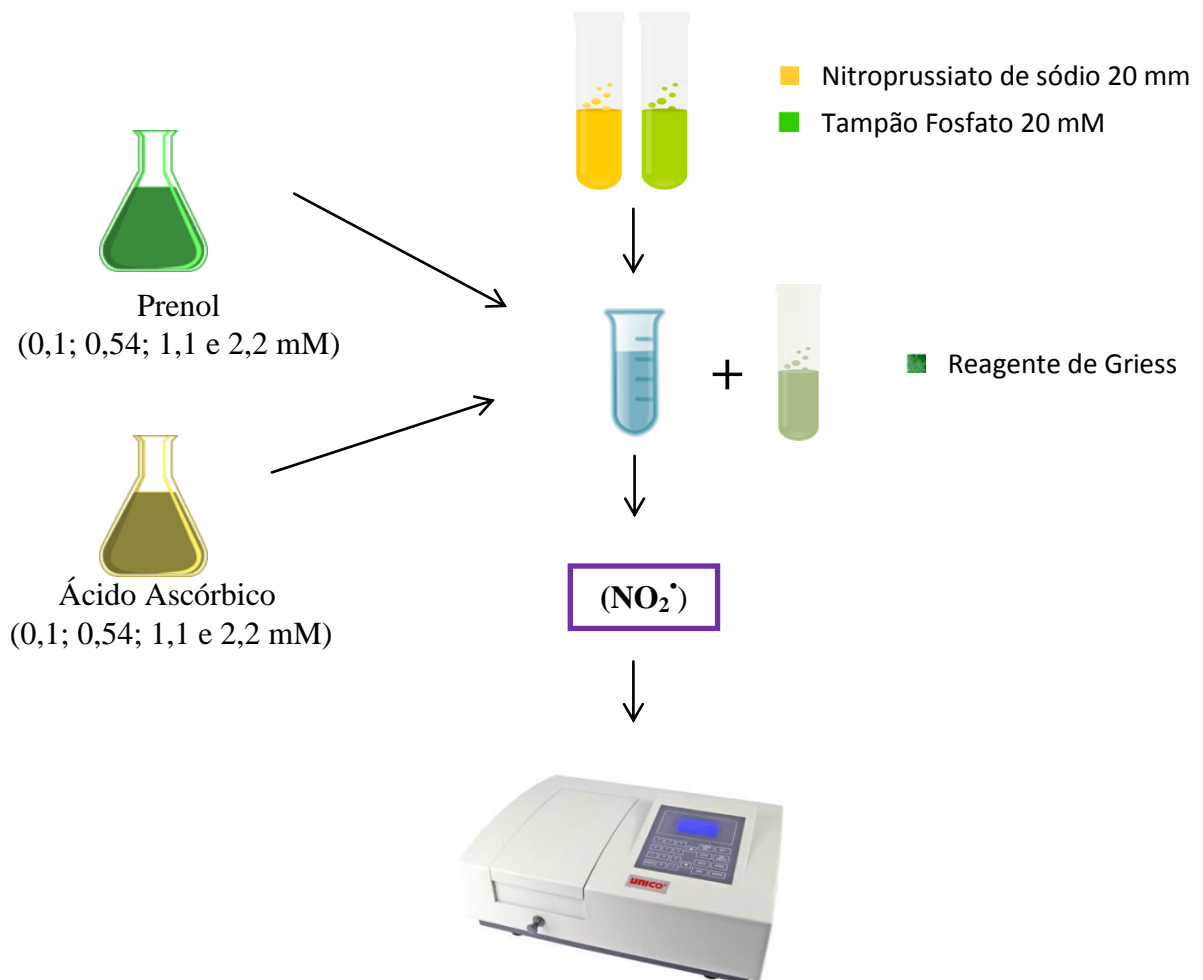


Ilustração 2. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método do radical NO_2^\cdot

2.3. Capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica (TBARS).

Para a determinação da capacidade antioxidante do prenol na inibição da peroxidação lipídica, foi utilizado o método TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico). O homogenato da gema de ovo (1% w/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) é utilizado como substrato rico em lipídios. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução do oxidante dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida (AAPH, 200 mM), ácido tricloroacético (15%) e ácido tiobarbitúrico (0,6%) (ilustração 3). O experimento foi realizado em triplicata; a leitura foi feita em espectrofotômetro a 532 nm e os resultados expressos como porcentagem de TBARS formadas a partir do AAPH (controle induzido).

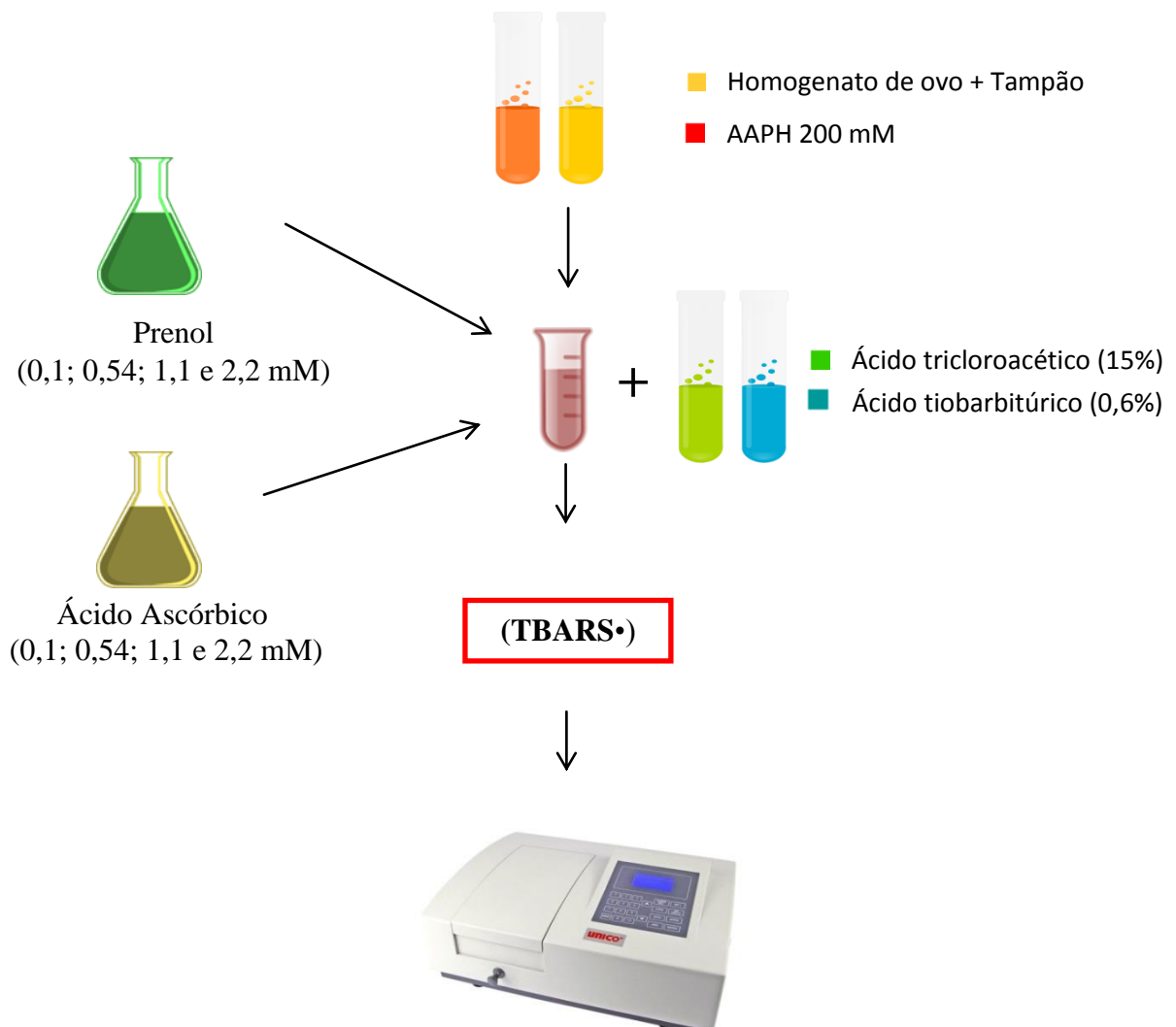


Ilustração 3. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método TBARS•

2.4. Capacidade antioxidante contra o radical DPPH• (2,2-difenil-1- picrilhidrazil)

A avaliação da capacidade antioxidante do prenol foi realizada por meio da metodologia descrita por Silva et al, (2005); preparou-se o radical DPPH• na concentração de 40µg/mL em etanol, e ajustado sua absorbância em 1,00 no espectrofotômetro.

Na ausência de luz foi transferida uma alíquota de 200 µL de várias concentrações do prenol e ácido ascórbico para tubos de ensaio contendo 2000 µL do radical **DPPH•**, em triplicata; após 30 minutos, foi feita a leitura dos valores das absorbâncias a 515 nm, e estes expressos como porcentagem de inibição da absorbância da solução de DPPH•.

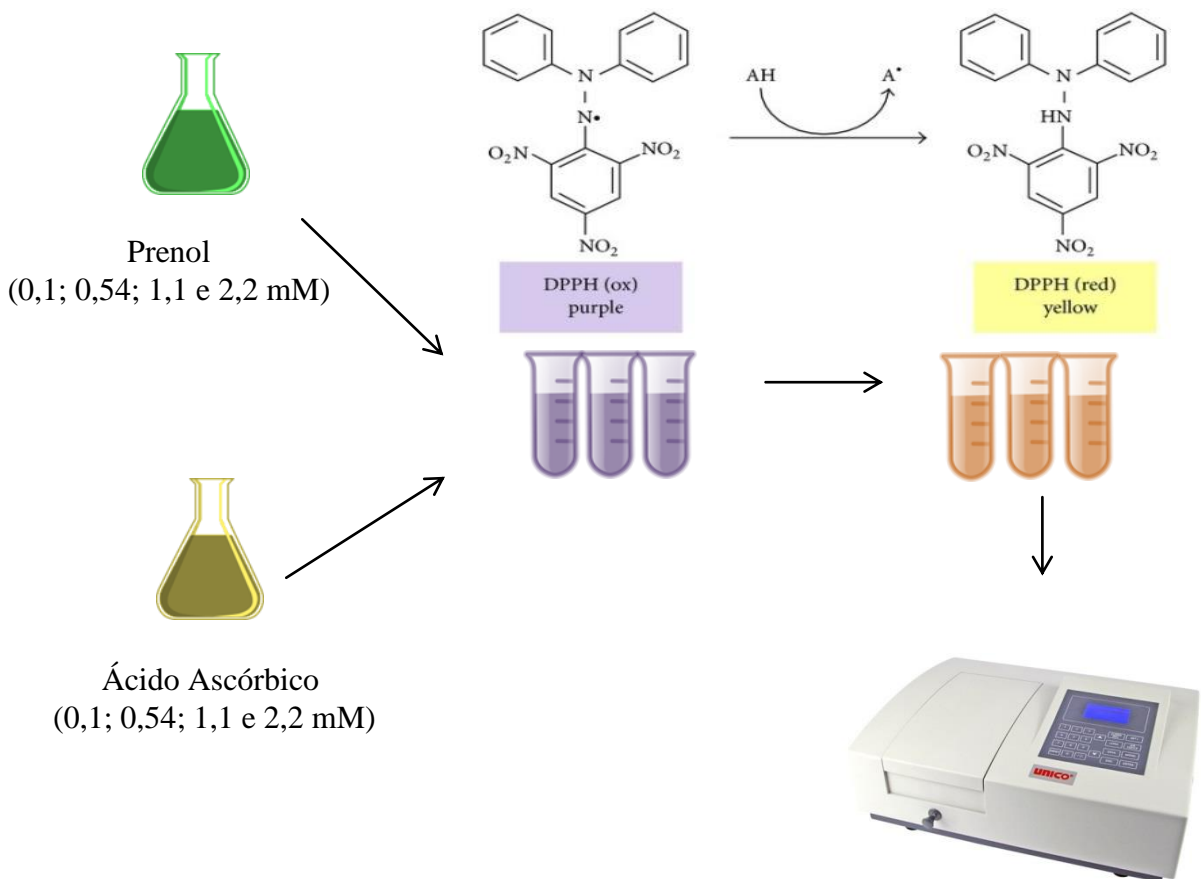


Ilustração 4. Avaliação da capacidade antioxidante do prenol pelo método DPPH•.

2.5. Capacidade antioxidante contra o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$, formou-se o cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 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 $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até obter-se uma solução com absorbância de 1,00 a 734 nm. Na ausência de luz foi transferida uma alíquota de 200 μL de várias concentrações do prenil e AA para tubos de ensaio contendo 1960 μL do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A leitura da absorbância a temperatura ambiente foi realizado no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da absorbância da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

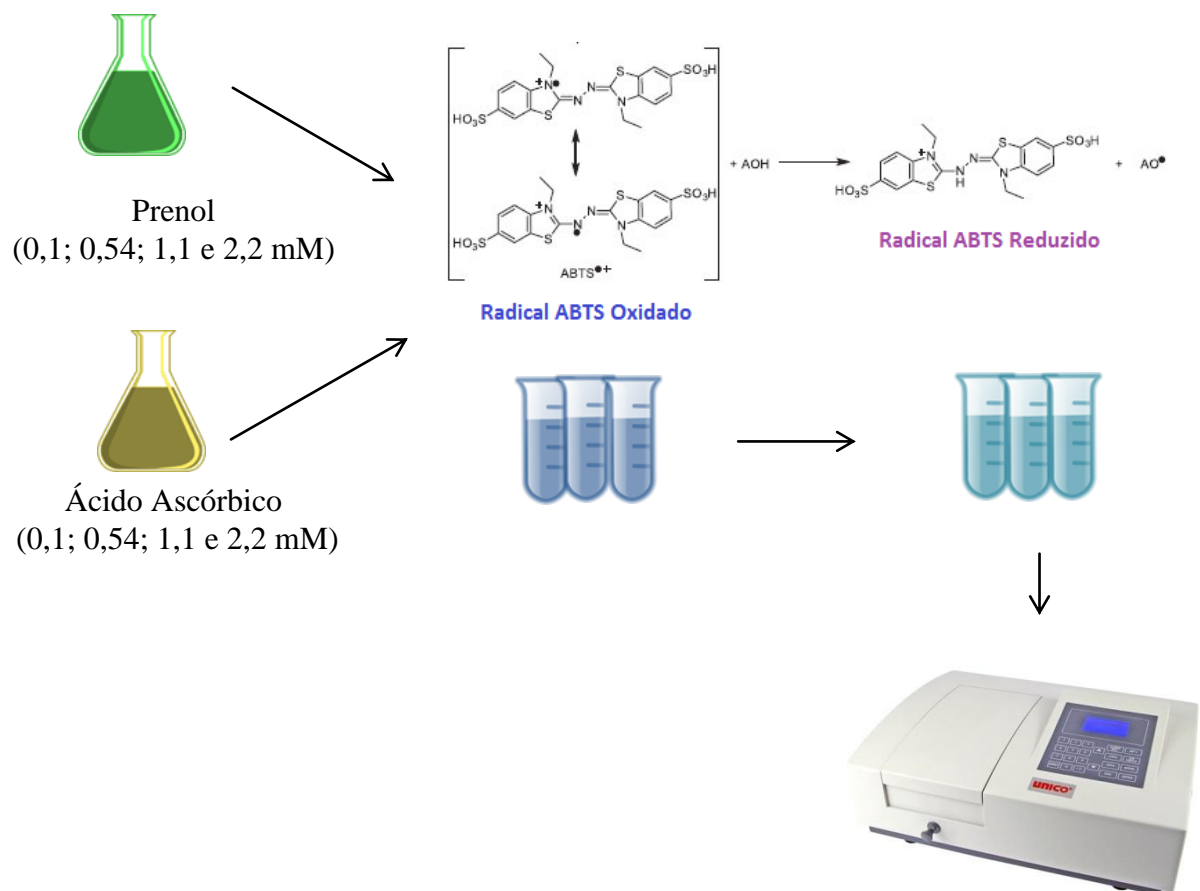


Ilustração 5. Avaliação da capacidade antioxidante do prenil pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

3. RESULTADOS

O hemiterpeno prenol nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM produziu a remoção do radical hidroxila (sistema), reduzindo seus níveis em $30,01 \pm 0,63\%$, $43,15 \pm 1,17\%$, $49,67 \pm 0,04\%$ e $51,34 \pm 0,04\%$ respectivamente.

O ácido ascórbico (AA) por outro lado, nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM reduziu os percentuais do radical hidroxila em $29,77 \pm 1,26\%$, $36,53 \pm 0,26\%$, $38,0 \pm 1,60\%$ e $43,7 \pm 0,52\%$, respectivamente. O prenol desta forma exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente ao radical hidroxila, em perfil semelhante (0,1 mM) e significativamente superior ao ácido ascórbico (0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM).

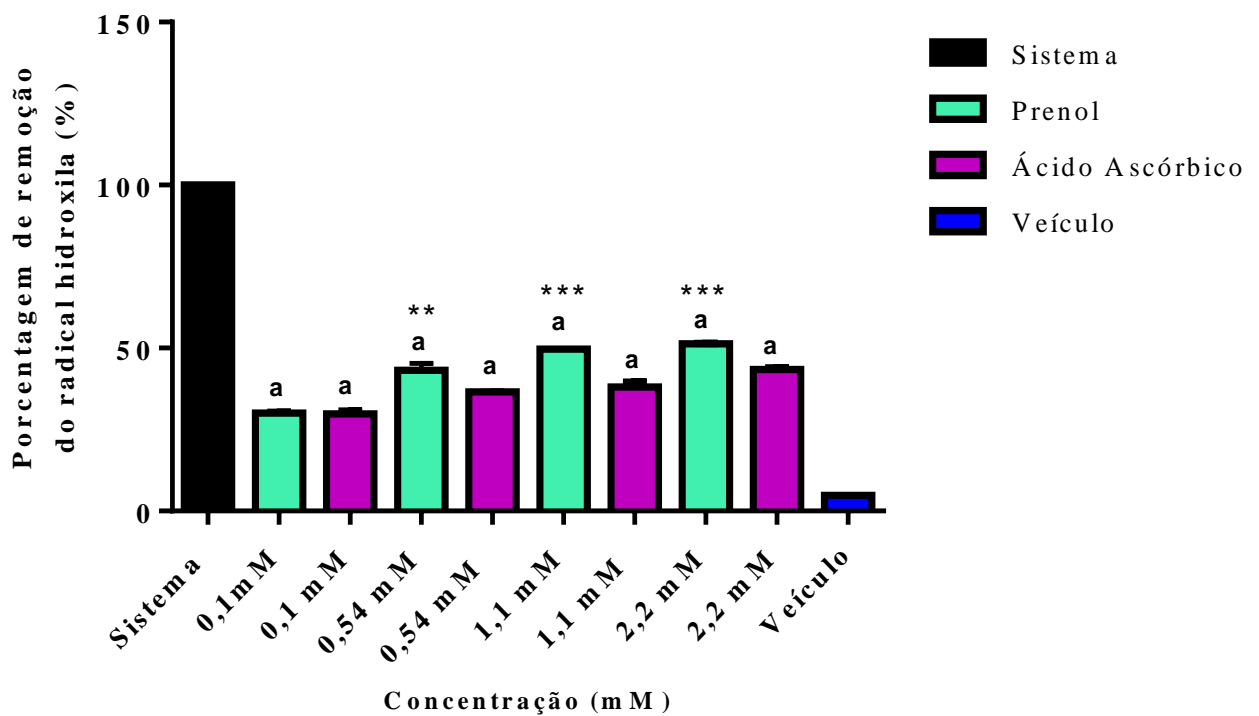


Gráfico 1. Efeitos do hemiterpeno prenol na redução do radical hidroxila (HO•). Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 4$, experimentos em triplicata. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ controles (prenol e ácido ascórbico) *versus* sistema (meio reacional). * $p < 0,05$ prenol *versus* ácido ascórbico (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

O prenol nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM produziu a remoção do radical nitrito (sistema), reduzindo seus níveis em $38,7 \pm 0,54\%$, $39,81 \pm 1,18\%$, $43,15 \pm 0,60\%$ e $48,33 \pm 1,62\%$ respectivamente.

O ácido ascórbico (AA) por outro lado, nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM reduziu os percentuais do radical nitrito em $43,56 \pm 0,45\%$, $44,02 \pm 0,21\%$, $46,39 \pm 0,37\%$ e $50,5 \pm 1,42\%$, respectivamente. O prenol desta forma exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente ao radical nitrito, em perfil semelhante ao ácido ascórbico, já que não houve diferença significativa entre as concentrações.

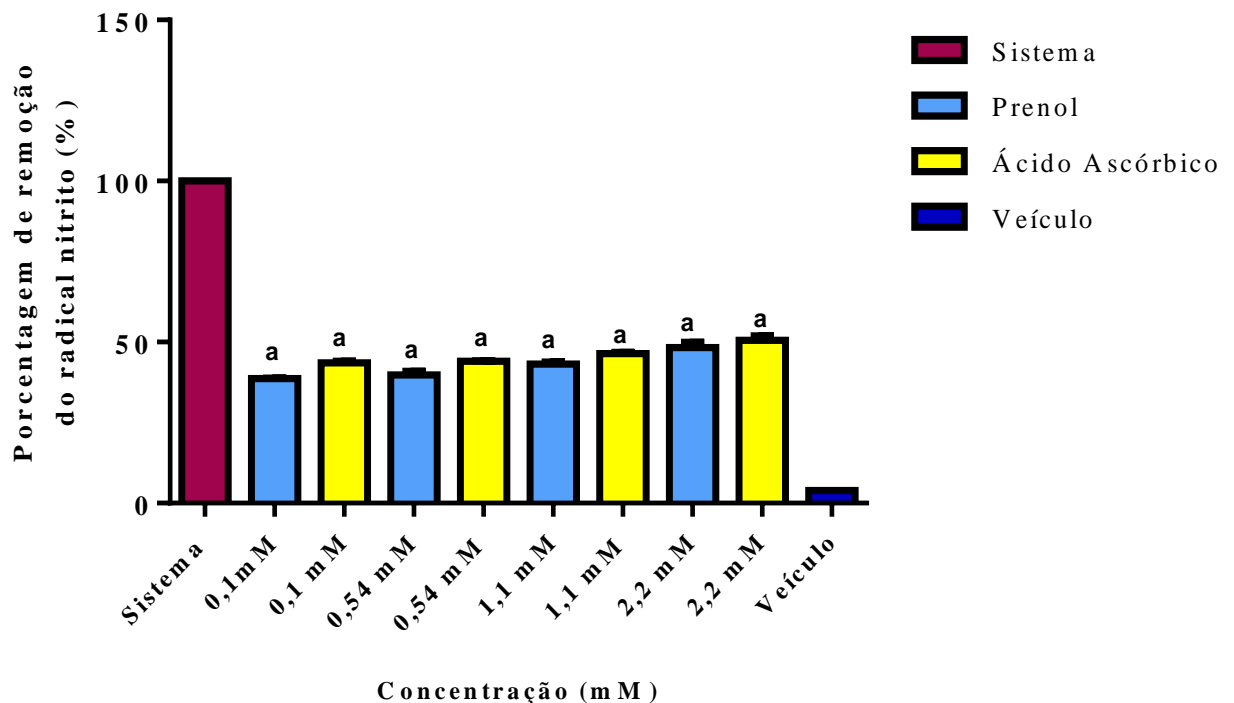


Gráfico 2. Efeitos do hemiterpeno prenol na redução do radical livre nitrito ($\text{NO}\cdot$). Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 4$, experimentos em triplicata. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ controles (prenol e ácido ascórbico) *versus* sistema (meio reacional). (ANOVA *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do método de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostram que o prenol, nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM testadas, reduziu significativamente as porcentagens de TBARS em $33,17\pm 0,92\%$, $50,00\pm 0,54\%$, $56,00\pm 0,76\%$ e $60,83\pm 1,02\%$, respectivamente. ($p < 0,05$).

O ácido ascórbico (AA) por outro lado, nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM reduziu produção de TBARS em $35,44\pm 1,28\%$, $55,00\pm 1,12\%$, $60,71\pm 0,64\%$ e $63,04\pm 2,01\%$, respectivamente. O prenol desta forma exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em perfil semelhante ao padrão ácido ascórbico, sem diferença significativa entre as concentrações (0,54 mM, 1,1 mM, 0,1 mM 2,2 mM).

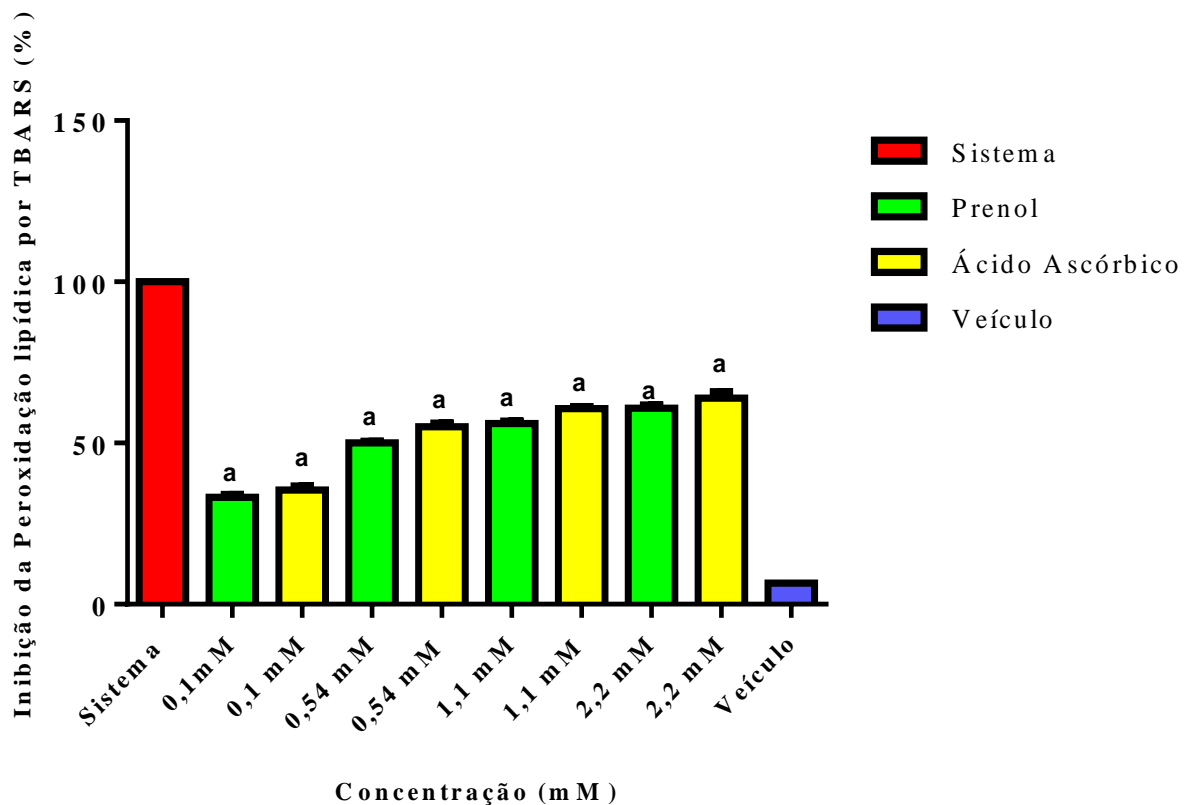


Gráfico 3. Efeitos do hemiterpeno prenol contra a peroxidação lipídica associada a substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 4$, experimentos em triplicata. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ controles (prenol e ácido ascórbico) *versus* sistema (meio reacional). (ANOVA t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O prenol nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM inibiu significativamente o radical DPPH• (sistema), reduzindo seus níveis em 22,64±0,26%, 25,03±0,28%, 27,85±0,11% e 29,87±0,50% respectivamente.

O ácido ascórbico (AA), nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM reduziu os percentuais do radical DPPH• em 20,32±2,87%, 29,37±0,55%, 42,16±1,36% e 56,50±1,17%, respectivamente. O prenol desta forma exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente ao radical sintético, com perfil semelhante ao ácido ascórbico nas concentrações menores (0,1 mM e 0,54 mM) e significativamente inferior nas maiores (1,1 mM e 2,2 mM).

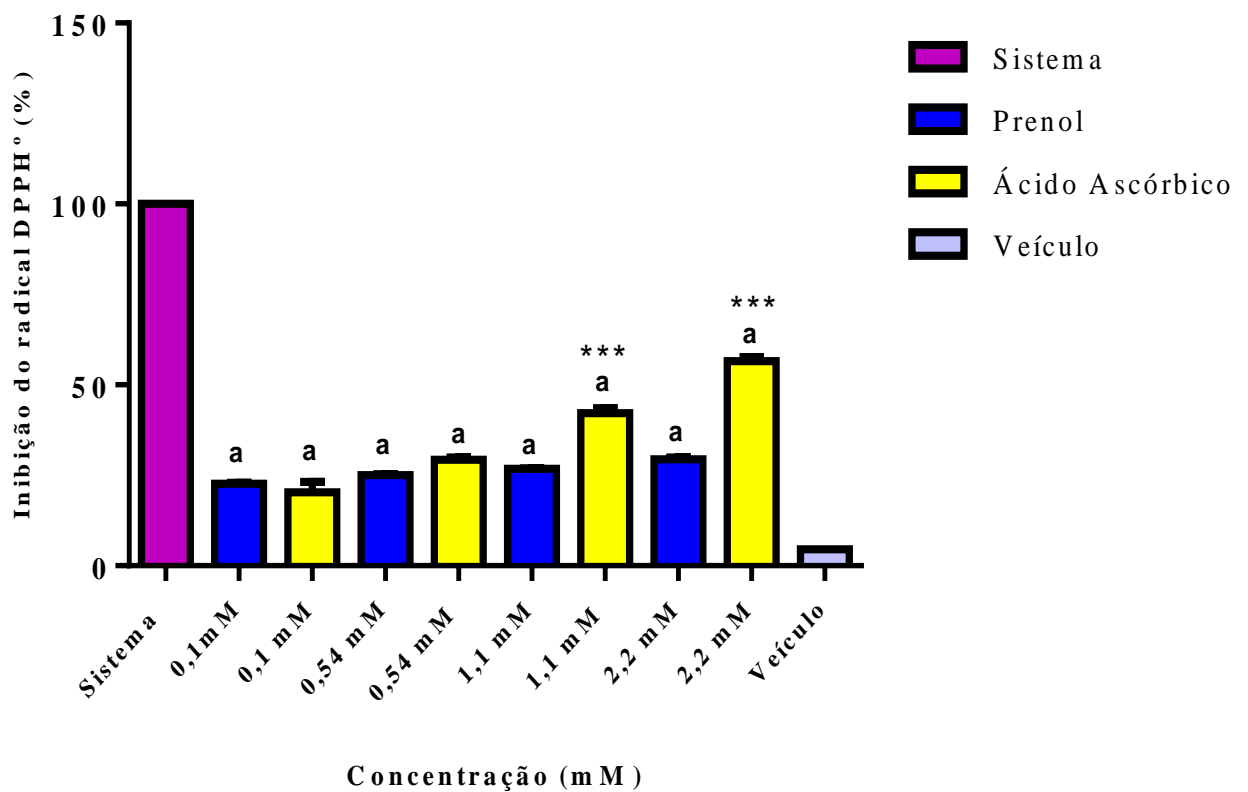


Gráfico 4. Efeitos do hemiterpeno prenol na redução do radical nitrito DPPH•. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 4, experimentos em triplicata. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. ^ap<0,05 controles (prenol e ácido ascórbico) *versus* sistema (meio reacional). *p<0,05 prenol *versus* ácido ascórbico (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O prenol nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM produziu a inibição significativa do radical $ABTS^{\bullet+}$ (sistema), reduzindo seus níveis em $23,96\pm 0,43\%$, $27,18\pm 0,43\%$, $30,05\pm 0,79\%$ e $34,67\pm 0,88\%$ respectivamente.

O ácido ascórbico (AA), nas concentrações de 0,1 mM, 0,54 mM, 1,1 mM e 2,2 mM reduziu os percentuais do radical $ABTS^{\bullet+}$ em $25,50\pm 1,04\%$, $33,17\pm 0,72\%$, $53,67\pm 0,88\%$ e $66,00\pm 1,18\%$, respectivamente. O prenol desta forma exibiu potencial antioxidante *in vitro* frente a este radical, com perfil semelhante ao ácido ascórbico nas menores concentrações (0,1 mM e 0,54 mM) e significativamente inferior nas maiores (1,1 mM e 2,2 mM).

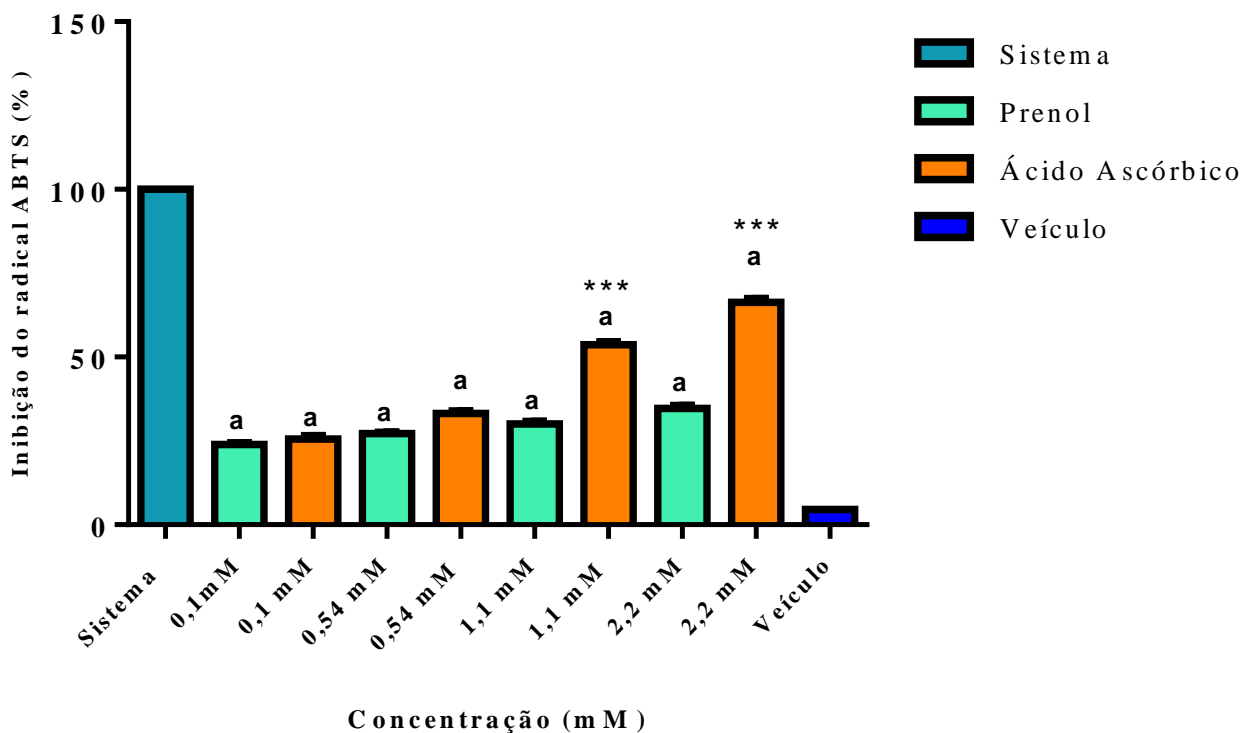


Gráfico 5. Efeitos do prenol na redução do radical $ABTS^{\bullet+}$. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 4$, experimentos em triplicata. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ controles (prenol e ácido ascórbico) *versus* sistema (meio reacional). * $p < 0,05$ prenol *versus* ácido ascórbico (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

4. DISCUSSÃO

O prenol (3-metil-2-buten-1-ol) é um hemiterpenóide de ampla disseminação na natureza, encontrado em muitas frutas cítricas de ampla distribuição no Brasil, como o noni (*Morinda Citrifolia*), acerola (*Malpighia sp*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*). (DUARTE, 2010; PINO et al 2010; BICAS et al, 2011). Entretanto, ainda são escassos os estudos com este terpenóide em modelos antioxidantes *in vitro*. Dessa forma, é importante caracterizar e expandir as informações sobre o potencial antioxidante do prenol.

A atividade antioxidante *in vitro* é baseada em ensaios químicos que avaliam a capacidade de uma substância isolada de produtos naturais ou de fontes sintéticas em reduzir a concentração de radicais livres em um meio reacional específico. (HALLIWELL, 2011).

Dentre os radicais livres, o radical hidroxila (HO•) é considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do HO• com metais/outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o HO• for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases purínicas/pirimidínicas, inativando ou mutando do DNA. Além disso, o HO• pode inativar várias proteínas, ao oxidar grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (- SS), e peroxidar ácidos graxos poli-insaturados das membranas (OYINLOYE, ADENOWO e KAPPO, 2015).

Neste ensaio, •OH é gerado pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) catalisada por Fe²⁺, proveniente do cloreto férrico (FeCl₃) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que reage para formar Ferro(II)-EDTA. O H₂O₂ reage com Ferro II/EDTA para formar Ferro III/EDTA e •OH (reação de Fenton, ilustração 6). O radical formado pode então reagir com 2-deoxirribose ou frutose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico, apresentam coloração rosada, monitorada por espectrofotometria. Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-deoxirribose/frutose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (ALVES et al, 2010).

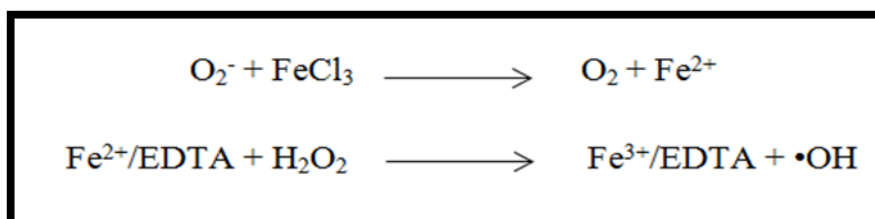


Ilustração 6. Esquemática da reação de Fenton. Alves et al, (2010).

Foi demonstrado que o prenil nas concentrações em estudo produziu a remoção do radical hidroxila em todas as concentrações testadas. Resultados positivos também foram encontrados com o ácido ascórbico (antioxidante padrão usado em diversos estudos), que também foi capaz de reduzir significativamente os percentuais do radical $\bullet\text{OH}$. Vale destacar que nas maiores concentrações o prenil exibiu potencial antioxidante superior ao ácido ascórbico.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, relativamente instável. É um radical livre que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. Sabe-se que o NO atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso e desempenha a função de defesa do hospedeiro. No entanto em situações de estresse oxidativo, há a geração de intermediários reativos, como o radical nitrito ($\text{NO}_2\bullet$) que é altamente citotóxico, e pode propagar lesões teciduais (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013).

O método proposto para determinar a ação sequestradora do íon $\text{NO}_2\bullet$ é baseado na decomposição do Nitroprussiato de sódio em NO, e este ao reagir com O_2 produz os nitritos que são quantificados espectrofotometricamente pela reação com Reagente de Griess (sulfanilamida + cloridrato de N-(naftil)etilenodiamina, ilustração 7) (NEED), dando origem a um diazo composto de coloração intensa vermelha (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

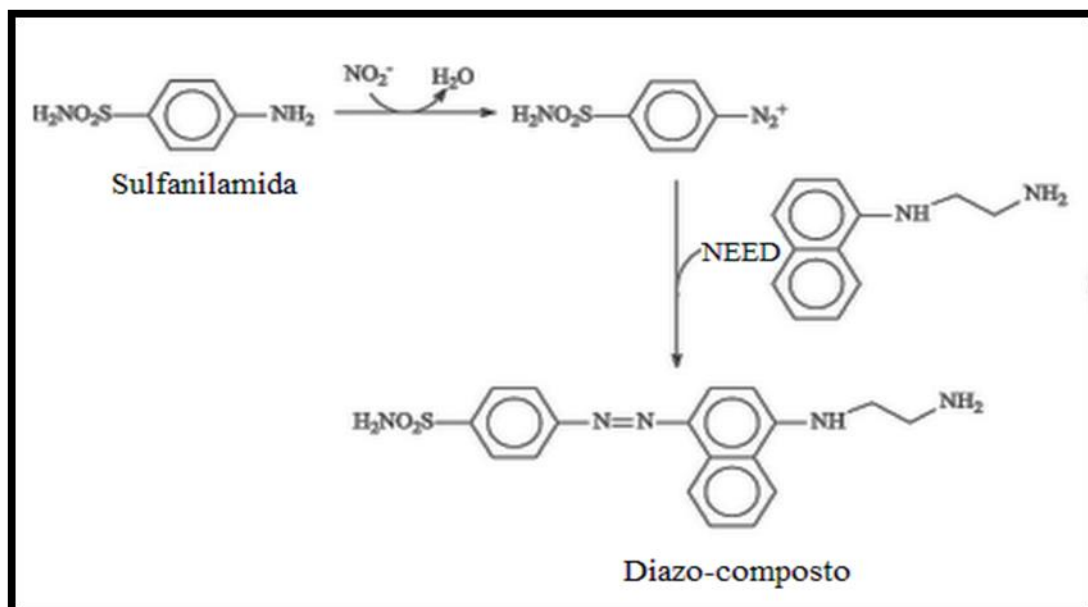


Ilustração 7. Mecanismo de reação usada no método de Griess. Carocho e Ferreira, (2013).

Também foi observado que o prenol produziu a remoção do radical nitrito, de forma significativa, com perfil semelhante ao ácido ascórbico, já que não houve diferença significativa entre as concentrações. O principal mecanismo envolvido na capacidade antioxidante de composto está relacionado à transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio (NIKI, 2010). O mecanismo proposto para as ações sequestradoras sobre essas radicais livres está demonstrado abaixo, estando $\text{HO}\cdot$ e $\text{NO}_2\cdot$ representados pelo radical $\text{R}\cdot$.

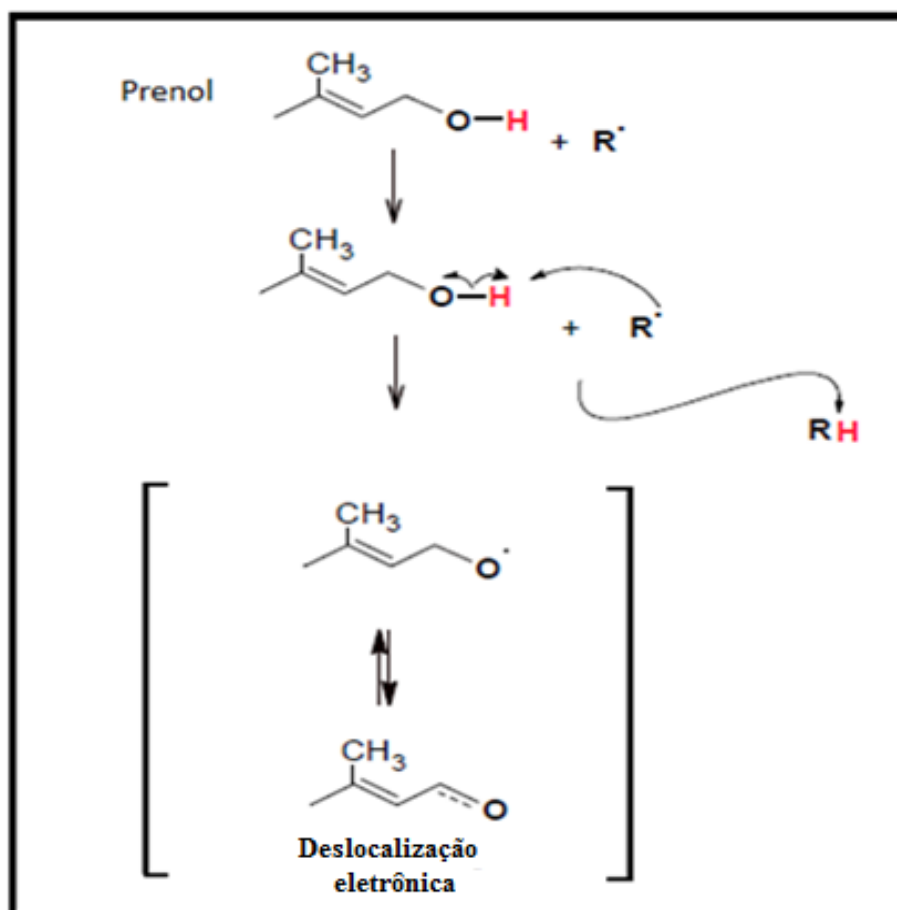


Ilustração 8. Representação esquemática da provável reação entre a molécula do prenol e um radical livre ($\text{R}\cdot$), demonstrando a atividade sequestradora. Autoria própria, 2015.

A presença da dupla ligação é importante para a atividade antioxidante. A ligação carbono-hidrogênio do prenol e sua hidroxila funcional (ligação alílica), vizinhos à dupla ligação possuem caráter ácido, o que facilita a abstração do hidrogênio alílico (H) por nucleófilos e radicais. Este é o mecanismo pelo qual muitas substâncias alifáticas exercem atividade antioxidante, pois após a retirada do hidrogênio alílico pelo radical livre, o novo radical gerado será estabilizado pela deslocalização das ligações duplas, mecanismo semelhante ao que ocorre com carotenóides e outros terpenos alifáticos, como o fitol, geraniol

e nerolidol; isto impede que a própria molécula se transforme em uma molécula reativa (GIORI, 2010; SANTOS et al, 2013).

A determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um teste de determinação antioxidante que foi desenvolvido no final da década de 40; é comumente usado para testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.

Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído, um aldeído com três átomos de carbono. Neste teste uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532 nm (ilustração 9). A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e à alta temperatura (100°C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (SANTOS, 2011, PAPASTERGIADIS et al, 2012).

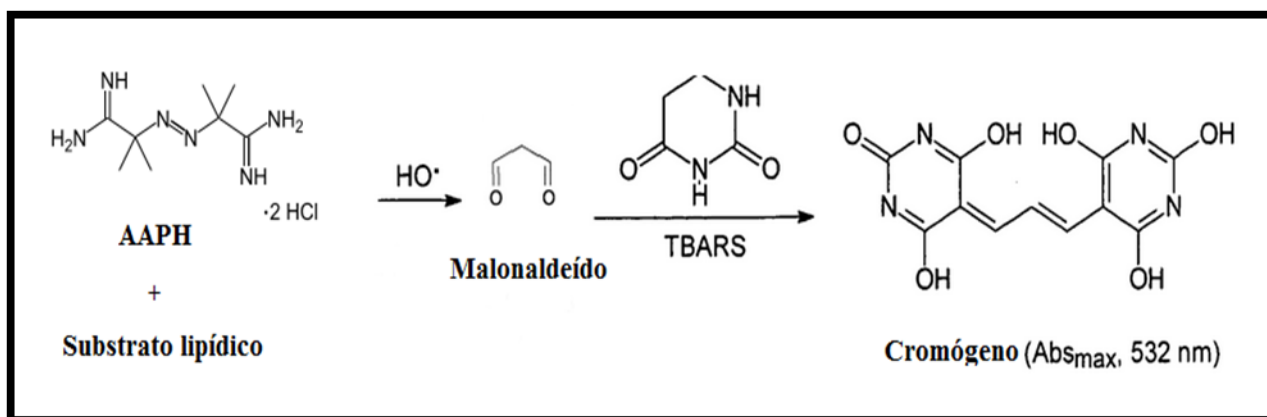


Ilustração 9. Mecanismo da reação da peroxidação lipídica por reação entre o malonaldeído e o ácido tiobarbitúrico. Adaptado de Papastergiadis et al, (2012).

No teste, o malonaldeído é liberado da oxidação dos lipídeos provenientes da gema do ovo e este dá prosseguimento à reação. Os resultados mostram que o prenol reduziu significativamente as porcentagens de formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico, em um perfil semelhante ao padrão ácido ascórbico (sem diferença significativa entre ambos); dessa forma, impediu que os radicais lipídicos deflagrassem o processo de peroxidação e liberação de malonaldeído. Assim como nos mecanismos anteriores, propôs-se que a redução dos radicais lipídicos seja proveniente da transferência de átomos de hidrogênio da hidroxila terminal do prenol, e posterior processo de deslocalização de elétrons para impedir que a molécula se transforme em um próprio radical (Ilustração 10).

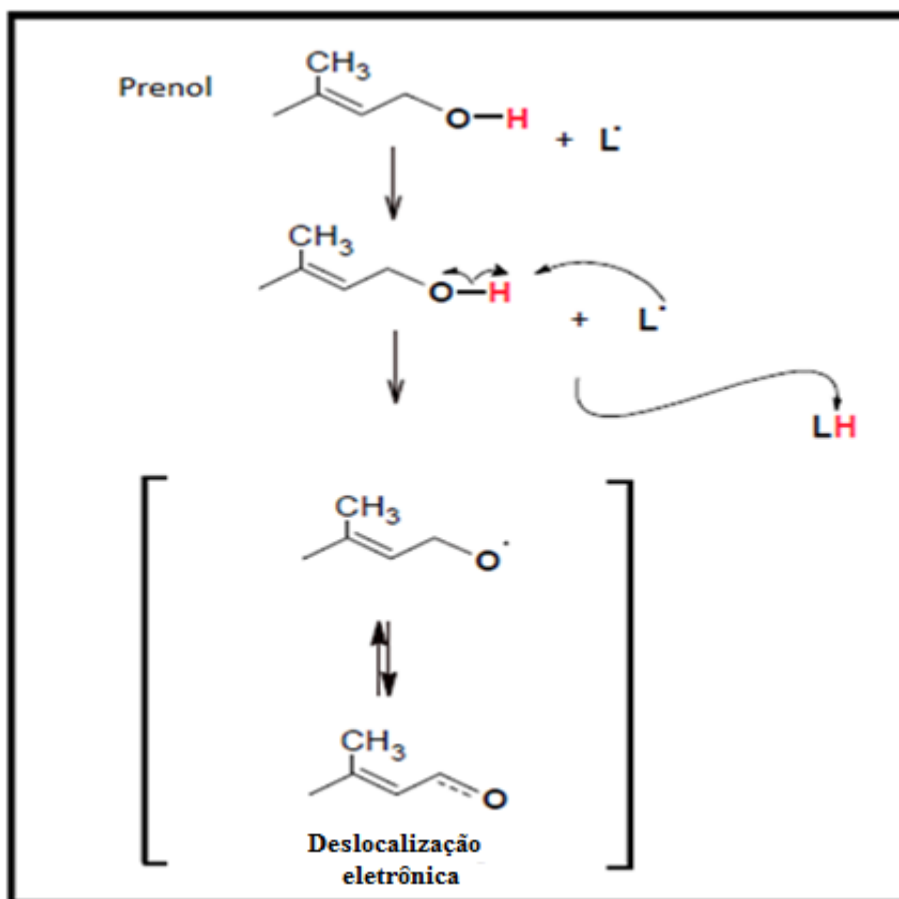


Ilustração 10. Representação esquemática da provável reação entre a molécula do prenol e um radical lipídico (L^\bullet), durante a peroxidação lipídica. Autoria própria, 2015.

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, mais conhecido pela sigla DPPH \bullet , é um radical livre sintético e estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 515-520 nm. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH \bullet , reduzindo-o a hidrazina (HAYES et al, 2011). Quando as substâncias antioxidantes realizam as transferências, seja do hidrogênio ou do elétron, o DPPH é convertido no radical α - α -difênil- β -picrilhidrazina, mais estável. (GULÇIN, ELMASTAS E ABOUL-ENEIN, 2012).

Quando uma determinada substância que age como doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH \bullet , a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade

antioxidante de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenóides (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013).

O prenol também produziu a inibição significativa do radical DPPH embora de forma mais discreta, quando comparado ao ácido ascórbico. Em maiores concentrações o padrão antioxidante foi mais efetivo em reduzir o radical sintético, o que não ocorreu com o prenol; o número de hidroxilas disponíveis pode ser um fator importante para este fato. Também foi proposto um mecanismo de inibição do prenol a este radical (ilustração 11).

Utilizando este método para avaliar a atividade antioxidante, incluindo ácido ascórbico e isoascórbico, estudos revelam que a interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, para a maioria das substâncias testadas o mecanismo parece ser muito mais complexo, necessitando de um estudo posterior mais aprofundado (BRAND-WILLIAMS et al, 1995).

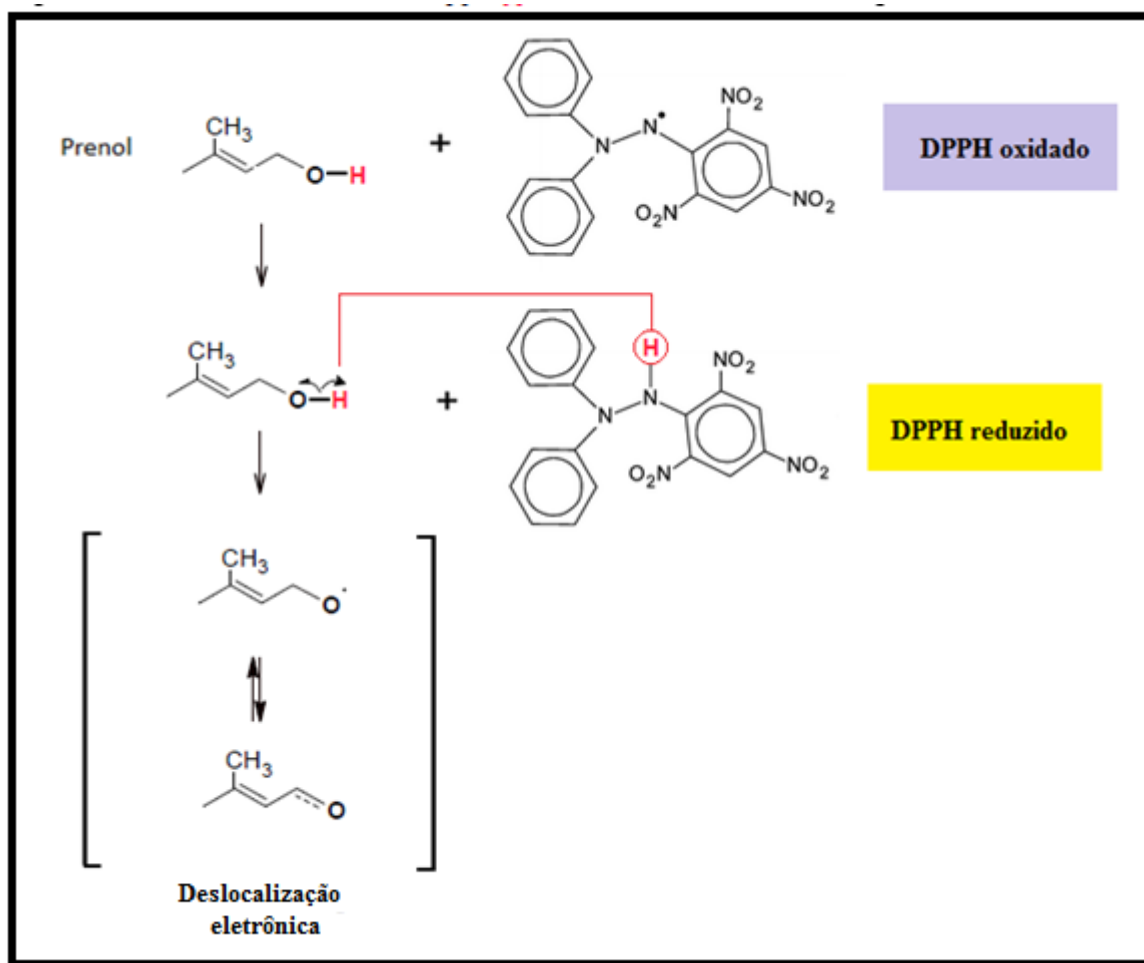


Ilustração 11. Provável mecanismo do prenol na inibição do DPPH•. Autoria própria. 2015.

O método do sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical DPPH^{\bullet} já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ necessita ser gerado antes por reações químicas, principalmente com o persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$).

Ele solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS , provocando a perda da coloração do meio reacional (ROGINSKI e LISSI, 2005; KUSKOSKI et al., 2005).

Assim como no radical DPPH^{\bullet} , o prenil reduziu significativamente o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (sistema), embora de forma inferior ao padrão ácido ascórbico. Como já relatado anteriormente, é sugerido um mecanismo por doação de hidrogênios da hidroxila terminal (Ilustração 12).

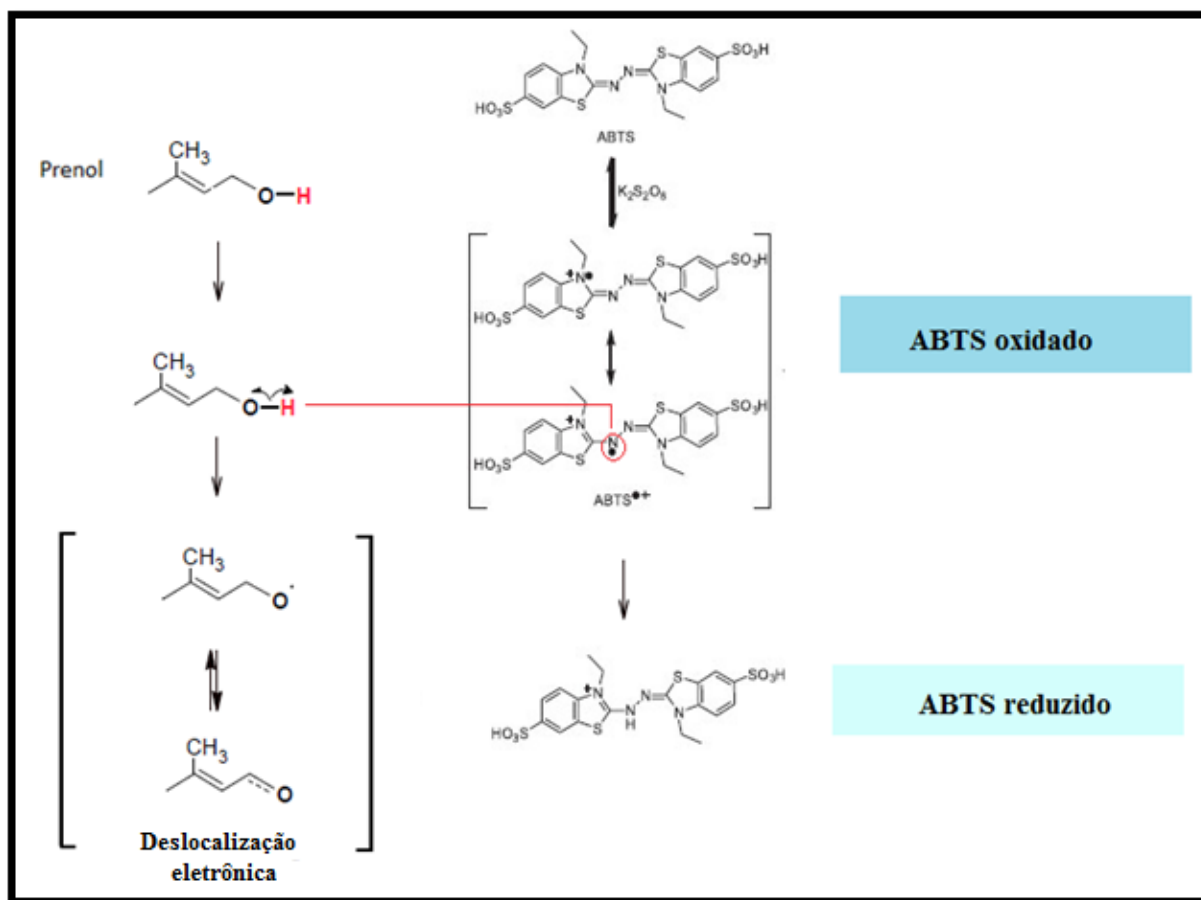


Ilustração 12. Provável mecanismo do prenil na inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Autoria própria. 2015.

O ácido ascórbico é um potente antioxidante pela presença de hidroxilas do grupo carbonila do anel, fortemente redutoras. Os produtos da oxidação do ácido ascórbico e ascorbato - por um elétron e por dois elétrons são, respectivamente, radicais ascorbila e ácido desidroascórbico (ilustração 13). O radical ascorbila, entretanto, é relativamente não reativo, quando comparado a outros radicais livres. Eles possuem a propriedade de reconversão em ascorbato e ácido ascórbico. Esta propriedade torna o ácido ascórbico um eficiente antioxidante, capaz de eliminar espécies altamente reativas, formando um radical de reatividade baixa. (CERQUEIRA, 2007; VILLANUEVA-TIBURCIO, CONDEZO-HOYOS e ASQUIERI, 2010). Pode ser um mecanismo pelo qual em maiores concentrações o ácido ascórbico foi mais efetivo em inibir radicais sintéticos que o prenol.

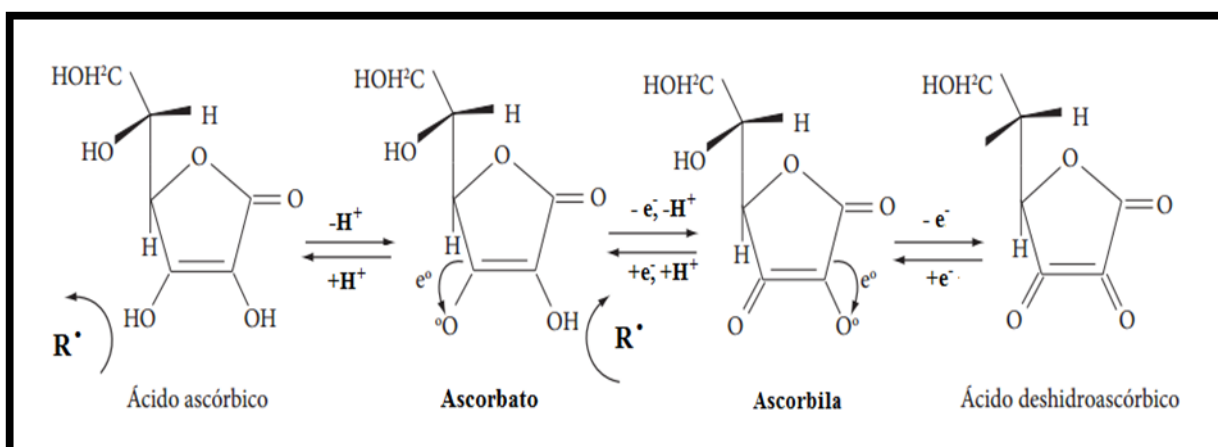


Ilustração 13. Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico frente aos radicais livres. (Villanueva-Tiburcio, Condezo-Hoyos e Asquieri, 2010).

Com base nos resultados, pode ser sugerido que o prenol, pode formar um complexo com radicais livres, provavelmente ao doar hidrogênios convertendo estes radicais em espécies menos reativas. Mecanismos semelhantes foram propostos para alguns terpenóides, de cadeia aberta como o caso do diterpeno fitol e o sesquiterpeno nerolidol (SANTOS et al, 2013; NOGUEIRA NETO, SOUSA e FREITAS, 2013).

No entanto, também é importante discutir que em alguns testes não foram observadas alterações significativas entre as diferentes concentrações utilizadas do prenol, sugerindo que os metabólitos do oxigênio e/ou nitrogênio podem saturar a possível atividade antioxidante deste hemiterpeno (GUIMARÃES et al., 2010). Logo, a exposição a elevadas concentrações

de prenol podem não ser suficientemente capazes de aumentar seu potencial antioxidante, fato este que precisa ser mais bem investigado em futuras pesquisas, especialmente testes *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível verificar o potencial antioxidante *in vitro* do prenol frente aos radicais livres hidroxila e nitrito, bem como a peroxidação lipídica associada a formas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e radicais sintéticos ABTS^{•+} e DPPH[•], possivelmente por um mecanismo de doação de hidrogênio. Ainda sim, mesmo com a capacidade em reduzir o dano oxidativo *in vitro*, é necessária a constatação dessa característica em sistemas orgânicos, via modelos farmacológicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21, n.2, p.143–152, 2013.
- ALASALVAR, C.; BOLLING, B. Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. **British Journal of Nutrition**. v.113, n.2, p.S68-78, 2015.
- ALFADDA, A.A.; SALLAM, R.M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2012, n.1, p.1-14, 2012.
- ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 118, p. 69-78, 2014.
- ALVES C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *In Vitro* and *Ex Vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET,C.; WISS, L. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BICAS, J.L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**. v.44, p.1843–1855, 2011.

BOKHARI, J.; KHAN MR, S.M.; RASHID, U.; JANS, Z.. Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.102, n.0, p.24-29, 2012

BRIEGERA, K.; SCHIAVONEA, S.; MILLER JR, F.J.; KRAUSEA, K. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**. v.17, n.1, p.1-14, 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". **Food and Chemical Toxicology**, v.51, n.15, p.225-239, 2013.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. **Química Nova**. v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CERCHIARO, D.C.SG. HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**. v. 34, n.2, p.300-305, 2011.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.33, n.4, p.567-75, 2012.

DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, v.43, n.10, p.1564-1572, 2010.

GIORI, F.P. Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de β -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Seropedica, RJ, 2010.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.; GELAINN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**. v.107, n.6, p.949-57, 2010

GULÇIN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**. v.5, p.489-499, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HAYES, J. E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products:

Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**. v.126, p.948-955, 2011.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1472, n.1-2, p.142-152, 1999.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**. v.66, n.3, p.54-57, 2014.

MARQUES, T.H.C.; MARQUES, M.L.B.G.C.B.; MEDEIROS, J.V.R.; LIMA, T.C.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Cyane-carvone, a Synthetic Derivative of Carvone, Inhibits Inflammatory Response by Reducing Cytokine Production and Oxidative Stress and Shows Antinociceptive Effect in Mice. **Inflammation**, v.37, p.966-977, 2014.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, n.4, p.503-515, 2010.

NOGUEIRA NETO, J.D.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.34, n.1, p.125-130, 2013.

NOGUEIRA NETO, J.D.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, P.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Antioxidant Effects of Nerolidol in Mice Hippocampus After Open Field Test. **Neurochemical Research**. v.38, n.9, p.1861-70, 2013.

NUNES, G.B.L.; POLICARPO, P.R.; COSTA, L.M.; SILVA, T.G.; MILITÃO, G.C.G.; CAMARA, C.A.; BARBOSA FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; ISLAM, M. T.; FREITAS, R.M. In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity of Some Synthetic Riparin-Derived Compounds. **Molecules**. v.19, p. 4595-4607, 2014.

OYINLOYE, B.E.; ADENOWO, A.F.; KAPPO, A.P. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Antimicrobial Peptides and Human Inflammatory Diseases. **Pharmaceuticals**. v.8, n.2, 151-175, 2015.

PAPASTERGIADIS, A.; MUBIRU, E.; VAN LANGENHOVE, H.; DE MEULENAER, B. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.60, n.38, p.9589-94, 2012.

PINO, J.A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C.E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.183-187, 2010.

PIRES, L.F.; COSTA, L. M.; ALMEIDA, A.A.C.; SILVA, O. A.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Is There a Correlation Between In Vitro Antioxidant Potential

and In Vivo Effect of Carvacryl Acetate Against Oxidative Stress in Mice Hippocampus?. **Neurochemical Research**. v. 39, p. 758-769, 2014.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. v.92, n. 2, p.235-254, 2005.

SANTANA, L.C.L.R.; SILVA, O.A. BRITO, M.R.M.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; GALVÃO, K.C.S.; MORAES, J.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.94, n.2, p.120-129, 2013.

SANTOS, C.C.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, G.A.; COSTA, J.P.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. **Journal of Neuroscience**. v.2013, p.1-9, 2013.

SANTOS, E.T. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**. 30, 604-610, 2007.

SILVA, B.S.; FERRERES, F.; MALVA, J.O.; DIAS, A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**. 90, 157-167. 2005.

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.

TELES, Y.C.F.; MONTEIRO, R.P.; OLIVEIRA, M.S.; RIBEIRO-FILHO, J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **Journal of the Health Sciences Institute**. v.33, n.1, p.89-93, 2015.

SANTOS, C.C.M.P. Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos *in vivo* e *in vitro*. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). 2011. 125 p. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, 2011.

VILLANUEVA-TIBURCIO, J.E.; CONDEZO-HOYOS, L.A.; ASQUIERI, E.R. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.151-160, 2010.

XINYUAN, L.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E.T.; WANG, H. YANG, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**. v.6, n.19, p.1-19, 2013.

ZHANG, J.; HOU, X.; AHMAD, H.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; WANG, T. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. **Food Chemistry**. v.145, n.15, p. 57-65, 2014.



CAPÍTULO IV - Avaliação da atividade esquistossomicida, antimicrobiana intrínseca e da interferência de um hemiterpenóide na resistência a fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus*

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA, ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA E DA INTERFERÊNCIA DE UM HEMITERPENÓIDE NA RESISTÊNCIA A FLUORQUINOLONAS EM *Staphylococcus aureus*.

Alexandre Xavier de Lira da Silva¹, Jonas Nascimento de Sousa¹, Josie Haydee Lima Ferreira², José Pinto de Siqueira Júnior³, Glenn W. Kaatz⁴, Rivelilson Mendes de Freitas¹, Humberto Medeiros Barreto^{2*}, Josué de Moraes⁵, Maria das Graças Freire de Medeiros¹.

¹Laboratório de Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí, Teresina (PI), Brasil.

²Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina (PI), Brasil

³Laboratório Genética Microrganismos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil

⁴School of Medicine, Division of Infectious Diseases, Wayne State University, Detroit, USA

⁵Faculdade de Ciências de Guarulhos, FACIG, Guarulhos, São Paulo, Brasil

Resumo: As doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade no mundo, sejam elas causadas por bactérias, fungos ou vermes parasitários; Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Diversas razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antibióticos e quimioterápicos: alta incidência dessas doenças, especialmente países pobres; altas taxas de resistência em micro-organismos e o decréscimo constante observado no número total de novos antimicrobianos e quimioterápicos aprovados pelo FDA. Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade esquistossomicida e antimicrobiana do hemiterpeno prenol sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos respectivamente. Também foi avaliada a atividade moduladora da resistência às fluorquinolonas em uma linhagem de *S.aureus* que hiperexpressa a bomba de efluxo NorA. A atividade antimicrobiana foi realizada em cinco cepas de micro-organismos, sendo quatro bactérias - *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (SA-1199B superprodutora de proteína NorA), *Escherichia coli* (NEWP22) e *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP53) - e um fungo - *Candida albicans* (NEWP31). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pelo ensaio de microdiluição em caldo BHI 10% em microplaca de 96 poços. O hemiterpenóide prenol não apresentou atividade inibitória contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Entretanto, resultados preliminares indicam que o prenol foi capaz de potencializar a ação antimicrobiana das quinolonas fluoradas ciprofloxacino e norfloxacino contra a cepa de *Staphylococcus aureus* SA-1199B, micro-organismo que hiper-expressa a bomba NorA, um sistema de efluxo multidrogas (MDR) responsável pela resistência à antibióticos. Em relação ao *S. mansoni*, o prenol não apresentou atividade esquistossomicida; observou-se, porém um incremento da mobilidade dos vermes, possivelmente por modulação das vias dos neurotransmissores.

Palavras-chave: Prenol; hemiterpeno; Antimicrobiano; Resistência.

1. INTRODUÇÃO

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

A resistência microbiana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta do micro-organismo frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. A descoberta e a inovação dos antibióticos são consideradas umas das principais conquistas da humanidade, uma vez que além de aumentarem significativamente a expectativa de vida, salvaram milhões de pessoas de infecções até então sem um arsenal terapêutico específico (BUTLER e COOPER, 2011).

As doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo. Tanto a resistência bacteriana intrínseca como a diminuição significativa da efetividade dos antibióticos, bem como as altas taxas de resistência microbiana, acarretam uma necessidade crítica para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos (KAPLAN et al., 2013). Uma vez que o número de novos antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos, com poucas entidades químicas aprovadas, a OMS incluiu os agentes antibacterianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (MENDES, 2014)

A pesquisa de novos antibióticos engloba desde o entendimento das infecções bacterianas, as principais bactérias causadoras destas infecções, a sensibilidade destes microrganismos aos antibióticos existentes, o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos na prática clínica, como estas bactérias se tornam resistentes e seus mecanismos de resistência (CARLET e COLLIGNON, 2011). São necessárias estratégias e tecnologias inovadoras que variem desde a área científica até os aspectos financeiros e reguladores, para aliviar a escassez de novos antibióticos e outros produtos destinados a limitar a resistência antimicrobiana. (WHO, 2012).

Os fungos são microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza. São caracterizados por estruturas unicelulares ou multicelulares e classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos, leveduras e dimórficos. O problema do tratamento das infecções fúngicas pode ser justificado pelo limitado arsenal de drogas antifúngicas comparadas com as drogas antibacterianas, pelo aparecimento de vários efeitos

colaterais à terapia com medicamentos convencionais e pela seleção de cepas resistentes aos fármacos utilizados. (ALMEIDA et al, 2009).

Apesar de atualmente haver uma variabilidade maior de opções de antifúngicos, tanto tópicos quanto sistêmicos, o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, e é clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Muitas dessas drogas pertencem ao mesmo grupo de ação farmacológica e possuem o mesmo mecanismo de ação; contudo, os fungos respondem de forma significativamente diferente quanto à susceptibilidade a elas (MAGALHÃES, 2009).

Essas situações tem encorajado a adoção de novas terapêuticas, dentre elas o uso mais extenso dos produtos naturais (MENEZES; LIMA, 2013). Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas. (COSTA et al, 2008).

Esquistossomose é uma doença causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro (vertebrado/homem) e as formas intermediárias (esporocistos primários, esporocistos secundários, cercárias) se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Constitui um grande problema de saúde pública por estar associado à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico (BRASIL, 2014).

Atualmente, o tratamento quimioterápico da esquistossomose é baseado no uso de apenas um fármaco, praziquantel, mas seu uso extensivo e inapropriado culminou com o aparecimento de resistência, além de ser um fármaco eficaz apenas contra as formas adultas do verme, não atuando nas formas jovens (esquistossômulos). Dessa forma, é muito importante a necessidade de novas alternativas terapêuticas, especialmente com o uso de produtos naturais (MORAES, 2011).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca do hemiterpeno prenol contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos ao determinar a concentração inibitória mínima (CIM), avaliar a atividade moduladora da resistência às fluorquinolonas em uma linhagem de *S.aureus* que hiperexpressa a bomba de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluorquinolonas e avaliar a atividade esquistossomicida em vermes adultos de *S. mansoni*.

2. METODOLOGIA

■ Avaliação da atividade Antimicrobiana

A análise de atividade antimicrobiana foi realizada em cinco cepas de microorganismos, sendo quatro bactérias - *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 25923™), *Staphylococcus aureus SA-1199B* (superprodutora de proteína NorA), *Escherichia coli* NEWP22 e *Pseudomonas aeruginosa* NEWP53 - e um fungo - *Candida albicans* NEWP31.

Uma solução estoque de prenol foi preparada por dissolução de 0,01 g do composto (densidade do composto: 0,85 g/cm³, o que corresponde a 12µL) em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO₄), o que corresponde a concentração 10.000µg/mL ou 10mg/mL. A solução resultante foi então diluída em água destilada esterilizada, em quantidade suficiente para atingir uma concentração de 1024 µg/mL. O DMSO foi utilizado como solubilizante uma vez que experimentos realizados previamente já descartaram atividade antimicrobiana intrínseca deste composto às cepas testadas, a concentrações ≤1024 µg/mL.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo BHI 10%. Para preparação do inóculo, uma porção do crescimento bacteriano em ágar inclinado foi semeada em estrias múltiplas em placas de *petri* contendo ágar nutriente, seguido de incubação à 37°C por 24 horas. Após esse período, uma porção do crescimento obtido nas placas de Petri foi transferida para um tubo falcon contendo 3 ml de Caldo Infusão-Cérebro-Coração ou BHI (do inglês *Brain Heart Infusion*; Himedia, Índia), o qual foi incubado a 37°C por 24 horas.

A partir dessa cultura em BHI, preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala MacFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/ml). Esta suspensão foi diluída em BHI de modo que a concentração final do inóculo em cada poço atingisse cerca de 10⁵ UFC/mL (NCCLS, 2012).

Alíquotas de 100µL de suspensão foram distribuídas nos poços de uma placa de microtitulação no sentido alfabético (A-H). Em seguida, foi realizada a microdiluição de 100µL do produto teste a 1024 µg/mL, nos poços de A a G (concentrações de 512 a 8 µg/mL), tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por três vezes antes da transferência para o poço seguinte. No último poço (H) não foi adicionado o produto teste, servindo este como controle positivo de crescimento bacteriano. Uma fileira de poços distribuída apenas com caldo BHI (sem inóculo e sem o produto-teste) foi usada como controle negativo de

crescimento (controle da contaminação do meio e/ou microplacas). Em seguida as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para determinação da CIM (concentração inibitória mínima em que não se observa o crescimento bacteriano), adicionou-se em todos os poços 20 µL de uma solução de resazurina sódica a 0,01% (m/v). As placas foram então incubadas a 1 hora em temperatura ambiente e após este período procedeu-se a leitura, levando-se em consideração que a mudança de coloração de azul para rosa indicava a ocorrência de crescimento bacteriano devido à redução da resazurina.

■ Avaliação da atividade moduladora da resistência aos antimicrobianos.

Para avaliação do prenil como modulador da resistência às fluorquinolonas (ciprofloxacino e norfloxacino), as CIMs dos antibióticos foram determinadas na presença e na ausência da concentração sub-inibitória (1/8 da CIM) do prenil, ou seja, 128 µg/mL. Elegeram-se a cepa *Staphylococcus aureus* SA-1199B para os testes de modulação antimicrobiana haja vista tratar-se de uma bactéria resistente super-produtora de proteína NorA. As concentrações dos de norfloxacino variaram de 2500 µg/mL a 2,44 µg/mL; ciprofloxacino de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL e nistatina e cetoconazol de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL.

A seguir, repetiu-se o mesmo procedimento da etapa anterior: Alíquotas de 100µL das suspensões microbianas contendo meio BHI com ou sem o prenil foram distribuídas nos poços de uma placa de microtitulação, e posteriormente foi realizada a microdiluição dos antibióticos nos poços, tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por três vezes antes da transferência para o poço seguinte. No último poço não foi adicionado o antibiótico, servindo este como controle positivo de crescimento bacteriano.

As placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 24 horas e após este período procedeu-se a leitura, adicionando-se em todos os poços 20 µL de uma solução de resazurina sódica a 0,01% (m/v) nos poços com bactérias (em virtude do crescimento de *Candida* sp. ser característico, não é necessário a adição de resazurina).

■ Atividade esquistossomicida

Os helmintos *S. mansoni*, linhagem BH, foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* (hospedeiro definitivo), (Moraes et al, 2012) no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Os hamsters foram infectados subcutaneamente com cerca de 150 cercárias e os parasitas adultos, com 49 dias de idade, foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático com o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e heparina sódica. Os ensaios *in vitro* com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados (de Moraes et al. 2011). Os pares de vermes foram lavados em meio RPMI 1640 contendo estreptomicina 200 µg/ mL, penicilina 200 UI/mL e anfotericina B 2 µg/ mL e transferidos em placas para cultura de células com 24 poços contendo 2 mL do mesmo meio, porém suplementado com 10% de soro de fetal bovino e tamponado com HEPES 25.

O prenol foi adicionado às culturas nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL. Praziquantel 5 µg/mL foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 1% foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5% e foram monitoradas diariamente por 5 dias, utilizando um microscópio invertido e um estereomicroscópio. Para avaliar o efeito do prenol sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), a sobrevivência dos parasitas e análise do tegumento.

■ Estatísticas

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados normalizados pelo cálculo da média geométrica das CIMs. O erro padrão e o desvio padrão foram determinados. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism*[®], versão 6.0.

A ocorrência de diferenças entre o tratamento com antibióticos e antifúngicos na ausência e na presença de prenol, foi examinada por da análise de variância de duas etapas (ANOVA). As diferenças mencionadas acima foram analisadas através do pós-teste de *Bonferroni* e foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

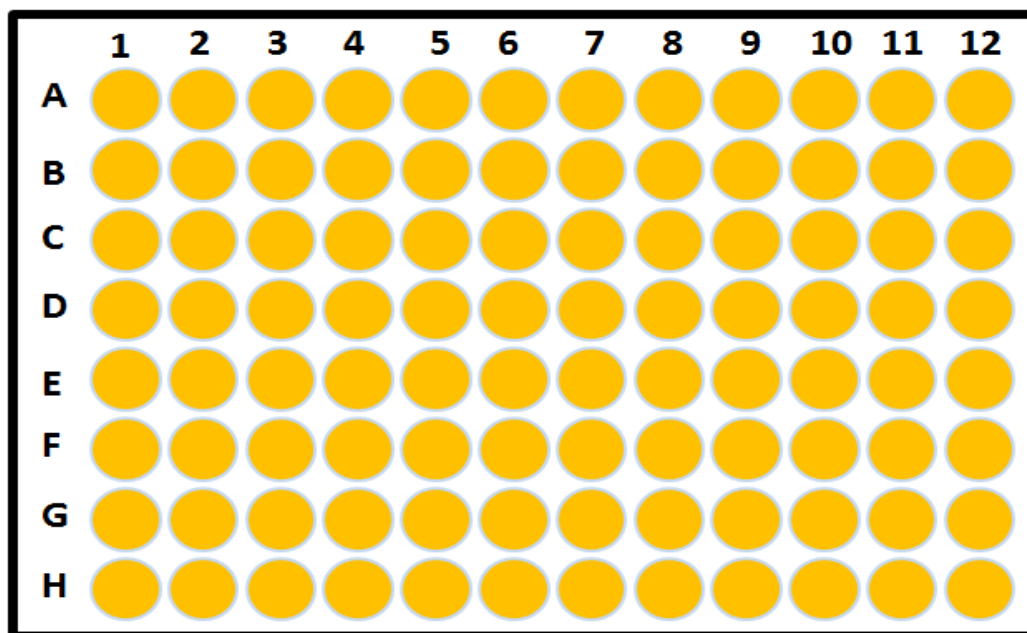


Ilustração 1. Modelo de placa de 96 poços para método de microdiluição seriada em caldo BHI para determinação de atividade antimicrobiana (MICs) do prenol e das associações de prenol e antibióticos. Autoria própria, 2016.

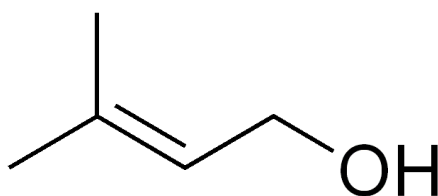


Ilustração 2. Estrutura química do 3-metil-2-buten-1-ol ou prenol. Arquivo pessoal, 2016.

3. RESULTADOS

Os resultados dos ensaios para avaliações da atividade antimicrobiana com o prenol podem ser observados na tabela 1. Produtos naturais de origem vegetal são considerados como tendo uma boa atividade inibitória quando apresentam CIMs ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$, uma atividade inibitória moderada quando apresentam CIMs variando de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, atividade inibitória fraca quando exibem CIMs variando de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e com

atividade inibitória inexistente quando apresentam CIMs acima de 1000 µg/mL (HOLETZ , 2002). De acordo com estes critérios, o prenol não apresentou atividade inibitória contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Tabela 1. Concentração Inibitória mínima (CIM) do hemiterpenóide prenol contra cepas de micro-organismos selecionados.

Micro-organismo	CIM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 TM	≥ 1024
<i>Staphylococcus aureus</i> SA-1199B	≥ 1024
<i>Escherichia coli</i> NEWP22	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NEWP53	≥ 1024
<i>Candida albicans</i> NEWP31	≥ 1024

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia; Pesquisa direta, 2015.

Por outro lado, a adição uma concentração sub-inibitória (1/8 da CIM) do prenol, ou seja, 128 µg/mL, ao meio de crescimento provocou a redução das CIMs dos antibióticos ciprofloxacino e norfloxacino contra a cepa de *Staphylococcus aureus* SA-1199B, sendo o primeiro relato até então do prenol modulando a atividade de fluorquinolonas.

No **gráfico 1 e tabela 2** estão expressas as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos em separado e combinados com o prenol, exemplificando a porcentagem de redução do CIM contra essa linhagem em específica, como já relatado, por possuir uma proteína de membrana responsável por um mecanismo de expulsão de antibióticos do interior da célula.

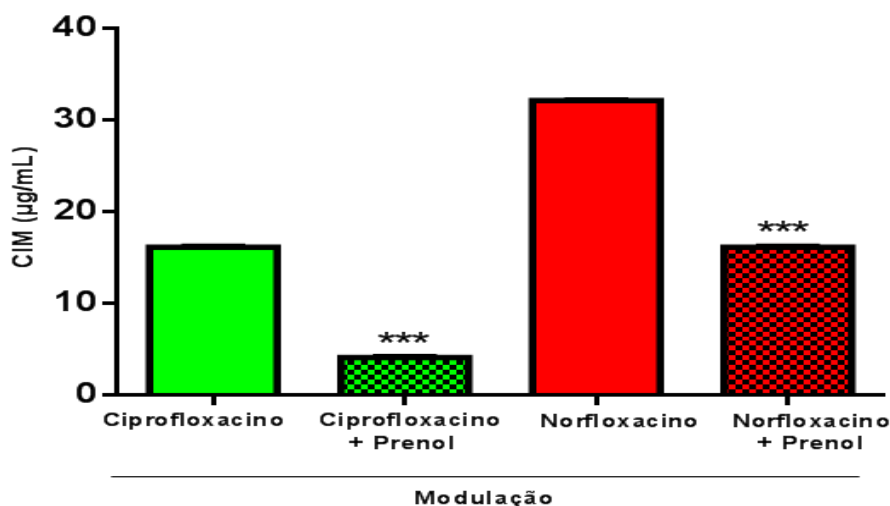


Gráfico 1. Média Geométrica das CIMs dos antibióticos Ciprofloxacino e Norfloxacino na presença e ausência do hemiterpeno prenil. GraphPad Prism. Pesquisa direta, 2015.

Tabela 2. Concentração Inibitória mínima (CIM) do hemiterpenóide prenil contra cepas de micro-organismos selecionados. *Staphylococcus aureus* SA-1199B

Substâncias	CIM (µg/mL)	Redução da CIM (µg/mL)
Prenol	≥ 1024	-
Ciprofloxacino	16	75%
Ciprofloxacino + Prenol	4	
Norfloxacino	32	50%
Norfloxacino + Prenol	16	

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia; Pesquisa direta, 2015.

Em relação aos efeitos do prenil sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, não foram observadas nem mortes, nem alterações dos tegumentos dos vermes (tabela 3). Curiosamente, em relação ao parâmetro de atividade motora (motilidade), nas primeiras horas os parasitas aumentam significativamente a motilidade, seguidos de contrações. Resultado extremamente incomum para a maioria dos compostos estudados por potencial atividade esquistossomicida. Contudo, no dia seguinte os parasitas voltaram ao seu movimento normal.

Tabela 3. Efeitos *in vitro* do prenil sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a		Alterações tegumentares (%) ^a	
			Leve	Significante	Leve	Significante
Controle ^b	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 5 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Prenol 125 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Prenol 250 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Prenol 500 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Prenol 750 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Prenol 1000 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0

^a Percentagem relativa a 20 vermes investigados.^b RPMI 1640.

4. DISCUSSÃO

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, estão disponíveis poucos dados de espécies de plantas pertencentes com atividades positivas frente a micro-organismos, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência do número reduzido de centros de pesquisa ou da disseminação restrita dos resultados dos estudos. (DUARTE, 2007).

Além disso, a maioria das pesquisas é baseada em testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente com base em informações etnofarmacológicas, diferentemente daquelas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas. Assim, existe uma crescente demanda de produtos naturais por indústrias farmacêuticas, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais (PROBST, 2012).

Terpenos e terpenóides são conhecidos na literatura por apresentarem atividade antimicrobiana contra várias bactérias, tais como: *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e menor atividade contra *Candida albicans*, dependendo do terpeno. Assim estes compostos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, na atividade antimicrobiana de determinados produtos de origem vegetal. (BUSTAMANTE et al, 2010).

Como já relatado, de acordo com nossos estudos o hemiterpenóide prenil não apresentou atividade inibitória contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Um estudo que examinou a composição do óleo essencial extraído de folhas de *Pisidium guajava* L. (goiaba) relatou o prenil (3-metil-2-buten-1-ol) entre os compostos majoritários presentes no óleo, além dos alcalóides criptonina e benzofenatridina. Os autores comprovaram que o óleo possui atividade antibacteriana contra micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*), Gram-negativos (*Azotobactor species*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Enterobactor aerogenes*, *Glucanobactor oxidans* e *Pseudomonas fluorescens*) e atividade citotóxica contra linhagem de células de câncer cervical humano. (JOSEPH et al, 2010).

Os autores também testaram o óleo essencial contra cepas de *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatus*, e o mesmo não exibiu qualquer atividade sobre estas espécies, o que de certa forma contribui com os indícios em nosso estudo de que o prenil não apresenta atividade antifúngica. (JOSEPH et al, 2010).

Desta forma, a atividade antimicrobiana desta espécie pode estar relacionada com os outros fitoquímicos presentes na molécula, uma vez que no presente estudo, evidenciou-se que o prenol isolado não apresenta atividade antimicrobiana intrínseca. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de sinergismo entre o prenol e outros metabólitos secundários no efeito antimicrobiano reportado para esta espécie.

Sistemas de Efluxo Multidrogas (MDR) correspondem a um fato crescentemente relatado que tem sido descrita em muitos organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários, além de ser um mecanismo de resistência em células tumorais de mamíferos. As bactérias possuem uma ampla gama de proteínas de efluxo de drogas e um número de espécies clinicamente relevantes, mais notavelmente o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, utilizam estes transportadores, como parte da sua estratégia de resistência (GIBBONS et al, 2003).

Muitos destes mecanismos de efluxo exportam uma vasta gama de antibióticos estruturalmente não relacionados a partir da célula, são mecanismos desenvolvidos por algumas bactérias com a finalidade de expelir moléculas de antimicrobianos, reduzindo as concentrações da droga dentro da célula, além de outras substâncias tóxicas, como metais pesados, antissépticos e quimioterápicos, o que resulta uma concentração intracelular reduzida e, assim, reduzida susceptibilidade. (VIVEIROS et al, 2008).

Estudos indicam que esses sistemas ainda interferem na entrada de nutrientes na célula bacteriana, na manutenção da homeostase, na mediação da adesão bacteriana e na adaptação das bactérias às células do hospedeiro, os quais são importantes fatores de virulência (RICCI E PIDDOCK, 2009).

Uma das proteínas transportadoras mais estudadas é a bomba NorA, uma proteína de efluxo multidrogas associada à membrana que pode diminuir a susceptibilidade às fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus*. Trabalhos na literatura sobre inibidores de bombas MDR em *Staphylococcus aureus* incluem o rastreio de substâncias contra este transportador. Estes inibidores agem de maneira sinérgica com ciprofloxacino e norfloxacino, suprimindo drasticamente o aparecimento de resistência *in vitro* às quinolonas em *S. aureus*. (GIBBONS et al, 2003).

Entre os inibidores de bombas MDR em *S. aureus* citam-se o alcalóide anti-hipertensivo reserpina, os inibidores da bomba de prótons lansoprazol e omeprazol, as flavonolignanas hidnocarpin D e a porfirina feoforbida A e outras flavonas. A atividade antimicrobiana de berberina, um antibiótico natural encontrado em algumas plantas é também

um substrato norA, e teve seu efeito aumentado por baixas concentrações de hidnocarpin D (AESCHLIMANN et al, 1999; HOLLER et al, 2012).

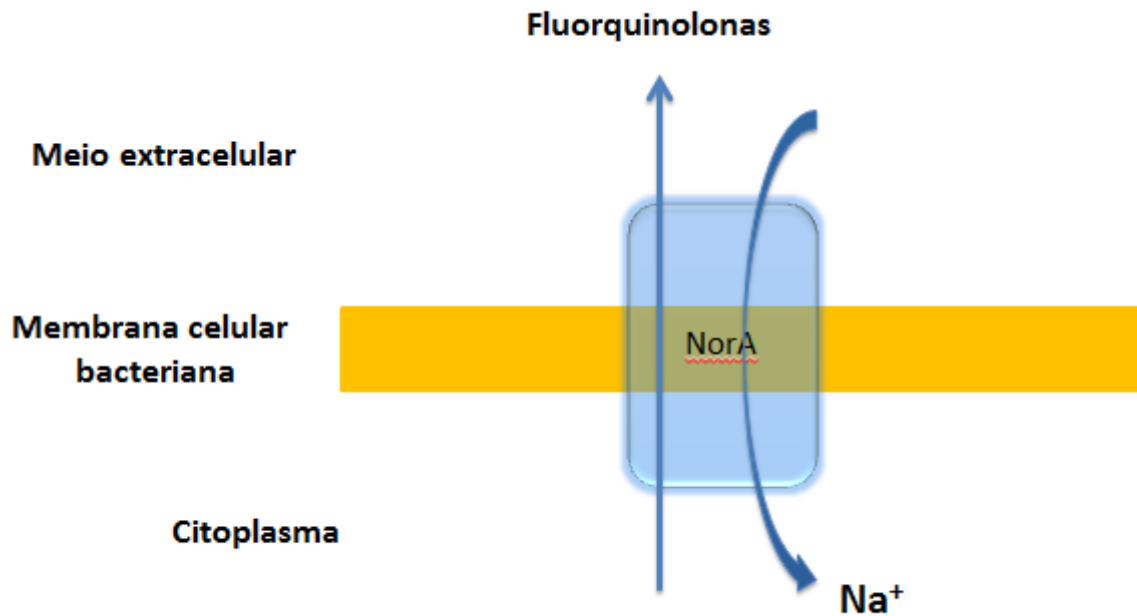


Ilustração 3. Esquematização da bomba de efluxo NorA na parede celular bacteriana. Autoria própria. 2016.

As quinolonas constituem uma importante classe de antibióticos que atuam através da inibição das topoisomerases tipo II bacterianas. As quinolonas mais recentes introduzidas na terapêutica são, em sua maioria, fluoradas, incluindo o ciprofloxacino, norfloxacino e o levofloxacino. Estas quinolonas e outras quinolonas fluoradas são amplamente utilizadas no tratamento de infecções urogenitais, respiratórias e gastrintestinais comuns causadas por microrganismos Gram-negativos, incluindo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae*. (GOLAN, 2009).

Tipicamente, as bactérias desenvolveram resistência às quinolonas através de mutações cromossômicas nos genes que codificam as topoisomerases tipo II ou através de alterações na expressão das purinas e bombas de efluxo das membranas que determinam a concentração de fármaco no interior das bactérias. Em relação ao *S. aureus* resistente, ele é amplamente disseminado, e as quinolonas são menos efetivas no tratamento das infecções causadas por essa espécie de bactéria (BIEDENBACH et al, 2006).

A literatura está repleta de reivindicações de produtos naturais e extratos que exibem atividade antibiótica, com muitas pesquisas descrevendo compostos com valores de CIM maiores que 1 mg/ml (1000 ug/ml), que em uma perspectiva clínica tem pouca relevância. Entretanto, é provável que um número de substâncias relativamente inertes possam exibir atividade antibacteriana nesta alta concentração. (BASSOLÉ e JULIANI, 2012; BARRETO et al, 2014).

Devido ao baixo desenvolvimento de novos fármacos e a propagação das bactérias de MDR, existe uma necessidade urgente de identificar metas claras para bloquear mecanismo de efluxo, para selecionar as moléculas com uma elevada eficácia inibitória e ausência de efeitos tóxicos em células de mamíferos (OSPINA et al, 2014). A procura por novos agentes tem focado os produtos naturais como moduladores da atividade antibiótica por bomba de efluxo (ZECHINI e VERSACE, 2009).

De fato, os resultados preliminares com o hemiterpeno prenol indicam que esta molécula modulou significativamente as duas quinolonas testadas, ciprofloxacino e norfloxacino. Houve redução das concentrações inibitórias mínimas quando se associou o hemiterpeno com as mesmas (redução de 75% e 50%, respectivamente). A literatura é escassa em relação aos efeitos farmacológicos dos hemiterpenóides, não havendo até esta data conhecimento de estudos de modulação à resistência de antibióticos com hemiterpenos.

Esses agentes de modificação da resistência potencializam a atividade de um antibiótico contra uma estirpe resistente. Podem visar especificamente um mecanismo de resistência, tais como a inibição de resistência a múltiplas drogas (MDR), por exemplo como a inibição do mecanismo de efluxo NorA em *Staphylococcus aureus* ou agir de forma sinérgica através de um mecanismo ainda não descrito (GIBBONS, 2004). Assim faz-se necessário, a realização de mais testes microbiológicos, a fim de esclarecer se o prenol é capaz realmente de inibir o mecanismo da bomba NorA, potencializar o efeito das quinolonas de forma sinérgica ou como os autores descrevem, por um mecanismo ainda não descrito.

O desenvolvimento de inibidores da bomba de efluxo de fato é uma área da pesquisa muito promissora, uma vez que tais compostos poderiam ser usados em conjunto com antimicrobianos existentes, estendendo o tempo de vida útil desses antibióticos através da melhoria de sua eficácia terapêutica e suprimindo o surgimento de variantes de resistência que de outro modo poderiam surgir durante o tratamento (RICCI E PIDDOCK, 2009).

Em relação à atividade do prenol sobre vermes adultos de *S. mansoni*, observou-se que o mesmo não apresentou atividade esquistossomicida, pelo contrário, aumentou a atividade motora e contrações dos vermes nas primeiras horas, cessando após 24 horas. Essa alteração na atividade motora dos sugere que o 3-metil-2-buten-1-ol atingiu a via de neurotransmissores do verme.

Sabe-se que neurotransmissores do *Schistosoma* são similares aos de mamíferos, um achado surpreendente em virtude da enorme distancia filogenética entre eles. De fato, o controle da motilidade dos helmintos está associado a vários neurotransmissores como serotonina, dopamina, acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, glutamato, GABA e neuropeptídeos, sendo os neurotransmissores possíveis alvos de agentes esquistossomicidas (MORAES, 2012).

O sistema nervoso do *S. mansoni* tem recebido muita atenção nas últimas décadas, sobretudo pelo fato de representar um ponto de ataque para novas drogas. Existem atualmente evidências sugerindo que a 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina) funciona como neurotransmissor excitatório, desempenhando importante papel no controle neuromuscular com aumento da atividade motora, frequência e amplitude de contração desse parasita. A serotonina parece ser a amina biogênica dominante em todos os platemintos. Esses efeitos podem ser resultado da ativação de receptores serotoninérgicos em *S. mansoni*, que inervam a massa muscular corporal e/ou de ativação direta de musculatura. (CARVALHO, COELHO e LENZI, 2008). Isto é um indício que o prenol pode ter atingido essa via de neurotransmissão.

Resultados semelhantes foram encontrados com hicantone e oxamniquine, produtos do metabolismo oxidativo do pró-fármaco lucantone; estes aumentam a motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* em concentrações específicas. Hicantone e o oxamniquine também apresentam atividade anticolinérgica, promovendo aumento da motilidade do *S. mansoni*. O carbacol, colinomimético de atuação direta sobre receptores colinérgicos pós-sinápticos, bloqueia este efeito, promovendo a paralisia do verme *in vitro* (SILVA, 2006). Também é uma hipótese que o prenol possa atingir a via colinérgica e causar o aumento da motilidade.

Um estudo com o isoprenol (3-metil-3-buten-1-ol), um intermediário do prenol, revelou que o mesmo possui a capacidade de atrair por quimiotaxia, nematódeos de água doce (*Bursilla monhystra*) e terrestre (*Caenorhabditis elegans*). Independentemente do tempo de exposição, ambos os vermes foram atraídos pelo hemiterpeno, provando que esta molécula é capaz de ativar receptores de odor destes organismos invertebrados (HOCKELMANN, MOENS E JUTTNER, 2004). Este fato seria mais um indicativo da ação do prenol sobre helmintos.

Dessa forma, ficam os questionamentos sobre o uso do prenil como produto natural, seja isoladamente ou em alguns extratos vegetais, direcionado contra *S.mansoni*, onde o mesmo tem um efeito contrário ao pesquisado (ausência de mortalidade e aumento da motilidade), podendo até mesmo antagonizar a eficácia de moléculas esquistossomicidas.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, verificou-se que o prenil, apesar de não apresentar atividade antibacteriana direta sobre as cepas testadas, foi capaz de modular positivamente a ação antimicrobiana das quinolonas fluoradas ciprofloxacino e norfloxacino na cepa de *Staphylococcus aureus* SA-1199B, micro-organismo que hiper-expressa a bomba NorA, um sistemas de efluxo multidrogas (MDR) responsável pela resistência à antibióticos.

Também foi relatada uma ação incomum sobre vermes de *S. mansoni*, com aumento significativo da motilidade e número de contrações, sugerindo uma ação do terpeno sobre a via de neurotransmissores do verme.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.M.M.; SOUZA, E.A.F.; BIANCHIN, D.B.; SVIDZINSKI, T.I.E. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.84, n.3, p.249-55, 2009.

AESCHLIMANN, J.R.; DRESSER, L.D.; KAATZ, G.W.; RYBAK, M.J. Effects of NorA Inhibitors on In Vitro Antibacterial Activities and Postantibiotic Effects of Levofloxacin, Ciprofloxacin, and Norfloxacin in Genetically Related Strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 2, p.335-340, 1999.

BARRETO, H. M.; FONTINELE, F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, D. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITO, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** (Online), v. 2014, p. 1-7, 2014.

BIEDENBACH, D.J.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.55, n.2, p.119-27, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas. 144 p. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 4.ed. Brasília, , 2014.

BUSTAMANTE, K.G.L.I.; LIMA, A.D.F.I.; SOARES, M.L.I.; FIUZA, T.S.I.; TRESVENZOL, L.M.F.; BARA, M.T.F.; PIMENTA, F.C.; PAULA, J.R.I. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus Vogel*) – Fabaceae. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. v.12, n.3, p.341-345, 2010.

BUTLER, M.; COOPER, M. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **Journal of Antibiotics**. v.64, n.6, p. 413-425 2011.

CARLET, J. et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. **Lancet**, v.378, n.9788, p. 369-371 2011.

CARVALHO, O.S. COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 124 p. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008.

COSTA, J.G.M.; CALDAS, G.F.R.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E.O.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p. 583-586, 2008.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**. v. 07, p.5-20, 2007.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.4, p.13–17, 2003.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**. v.21, n.2, p.263-277, 2004.

GOLAN, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. Guanabara Koogan, 2ª ed. Rio de Janeiro, 2009.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.P. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HOLLER, J.G.; CHRISTENSEN, S.B.; SLOTVED, H.; RASMUSSEN, H.B.; GÚZMAN, A.; OLSEN, C.; PETERSEN, B.; MØLGAARD, P. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.67, n.5, p.1138-44, 2012.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97, p.1027-1031, 2002.

JOSEPH, B.; MINI PRIYA, R.; HELEN HOLETZ, P.A.M.; SUJATHA, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* (L.) Leaf. **Journal of Advanced Biotechnology**. v.9, n.1, p.10-14, 2010.

KAPLAN, W. WIRTZ, V.J.; MANTEL-TEEUWISSE, A.; DUTHEY, B.; LAING, R. Priority Medicines for Europe and the World 2013. Geneva: WHO - World Health Organization; 2013. 245p.

MAGALHÃES, D. V. Atividade antifúngica de derivados sintéticos do Eugenol e timol frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis*. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

MENDES, S.C.U.S. Visão de futuro para produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação 2014. 216p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

MENEZES, C.P.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Cladosporium carrionii*. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.94, n.1, p.49-53, 2013.

MORAES, J.; NASCIEMENTO, C.; MIURA, L.M.; LEITE, J.R.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**. v.8, p.548-558, 2011.

MORAES, J.; CARVALHO, A.A.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.; MARQUES, T.H.; 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, 2012.

OSPINA, M.A.; PIERI, F.A.; PIETRALONGA, P.A.; MOREIRA, M.A.S. Sistemas de efluxo multidroga em *Escherichia coli* e uso de inibidores como possíveis adjuvantes na terapia da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.2, p.381-387, 2014.

PROBST, I.S. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2012.

RICCI, V.; PIDDOCK, L.J.V. Only for substrate antibiotics is a functional AcrAB-TolC efflux pump and RamA required to select multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.64, p.654-657, 2009.

WHO - World Health Organization: The evolving threat of antimicrobial resistance – options for action. 125p. Geneva: WHO; 2012.

VIVEIROS, M.; MARTINS, M.; COUTO, I. et al. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. **Current Drug Targets**. v.9, p.760-778, 2008.

ZECHINI, B., VERSACE, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 4, p. 37-50, 2009.

BASSOLÉ, I. H. N., JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, p. 3989–4006, 2012.

SILVA, P.G. Avaliação da atividade esquistossomicida do 3-(4-clorobenzil)5-(4-nitrobenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ-4) e do Praziquantel frente a *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal). 65 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2006.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Existe pouca literatura sobre funções biológicas dos hemiterpenos e consequente, poucos depósitos de patentes;
- O prenol apresentou uma DL₅₀ entre 2000 e 5000 mg/kg em camundongos fêmeas (característica de substâncias de baixa toxicidade);
- Não foi tóxico ao micro-organismo *Artemia salina*, com CL₅₀ de 2944,14 µg/mL;
- Não produziu alterações significativas em todos os parâmetros hematológicos, fisiológicos, e maior parte dos bioquímicos;
- Diminuiu significativamente os valores de glicose e ácido úrico na maior dose;
- Modulou parâmetros comportamentais, inferindo-se como atividade depressora no sistema nervoso central;
- Exibiu significativa atividade antioxidante *in vitro* frente aos radicais hidroxila, nitrito e contra a peroxidação lipídica;
- Inibiu os radicais sintéticos DPPH e ABTS de forma menos efetiva que o ácido ascórbico;
- Não apresentou atividade antimicrobiana intrínseca frente às linhagens analisadas;
- Exibiu atividade moduladora das quinolonas ciprofloxacino e norfloxacino frente a uma cepa geneticamente resistente;
- Aumentou a atividade motora e o número de contrações em vermes de *S.mansoni*.

Os presentes resultados enriquecem a literatura sobre este hemiterpenóide e trazem perspectivas para a realização de novos testes que permitam o uso do prenol como fitomedicamento ou produto biotecnológico. São perspectivas futuras do trabalho: produzir complexos de inclusão e formas nanotecnológicas com o prenol, e prosseguir com a bioprospecção frente a outros protocolos experimentais *in vitro* e *in vivo* (determinação da atividade antioxidante *in vivo*, atividade ansiolítica, antidepressiva, antiepilética e anti-inflamatória), bem como tentar esclarecer o possível mecanismo de modulação de antibióticos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. SILVA, A. X. L.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, M. G. F. **Propriedades biológicas dos hemiterpenos: uma prospecção científica e tecnológica.** In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, 2015, Teresina. Aspectos Interdisciplinares da P&D de medicamentos. Teresina: EDUFPI. v.2. p.1-685, 2015.
2. SILVA, A. X. L.; GOMES, K. K. L. B.; MEDEIROS, M. G. F.; ROLIM, H. M. L. **Nanotecnologia em ciências da saúde no Brasil: uma prospecção científica e tecnológica.** In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, 2015, Teresina. Aspectos Interdisciplinares da P&D de medicamentos. Teresina: EDUFPI. v.2. p.1-685, 2015.
3. SILVA, A. X. L.; SANTOS, B.N.G.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, M. G. F. **Avaliação do potencial antioxidante in vitro de um hemiterpeno candidato a novo fármaco.** In: I Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, Teresina, 2015.
4. SILVA, A. X. L.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, M. G. F. **Citotoxicidade de um hemiterpeno frente ao teste de exposição à *Artemia salina*.** In: I Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, Teresina, 2015.
5. SANTOS, B.N.G. ; MONTEIRO, N.R.G.; XIMENES, A.M.R.; SILVA, A. X. L.; SILVA, O.A. CITÓ, A.M.G.L. MEDEIROS, M. G. F. **Potencial antioxidante in vitro do óleo essencial de *Lippia origanoides*.** I Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, Teresina, 2015.
6. FRANÇA, F.P.S.S.; NEGREIROS, D.S.; MELO, M.D.O.; CORTEZ, R. V. SILVA, A. X. L.; MEDEIROS, M. G. F. **Panorama da hanseníase no Piauí: registro ativo e número de novos casos.** In: I Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes (CONDONER) e I Congresso Piauiense de Doenças Negligenciadas, Parnaíba, 2015.
7. NEGREIROS, D.S.; FRANÇA, F.P.S.S.; MELO, M.D.O.; CORTEZ, R. V. SILVA, A. X. L.; MEDEIROS, M. G. F. **Terpenos com alegações farmacológicas direcionadas ao tratamento da hanseníase: uma prospecção tecnológica.** In: I Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes (CONDONER) e I Congresso Piauiense de Doenças Negligenciadas, Parnaíba, 2015.
8. SILVA, A. X. L.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, M. G. F. **Terpenóides com ação ansiolítica e antidepressiva: uma prospecção tecnológica.** In: III Workshop de Projetos e Dissertações, 2014, Teresina. Anais do III Workshop de Projetos e Dissertações. Teresina: EDUFPI. v.1, n.1. 2014.

ANEXOS



ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 28 de Novembro de 2014.

Ilma.

Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS FREIRE DE MEDEIROS.
Departamento: Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (28 de Novembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **095/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Prospecção do terpenóide prenil: contribuição tecnológica e perspectivas para o desenvolvimento de um medicamento**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Janeiro/2015 à Dezembro/2019, e serão usados 360 Camundongos isogênicos (324 machos e 36 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO II. Exemplo de Laudo dos exames hematológicos realizados no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário.



LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

N° EXAME: 1564/15			REGISTRO: ---
PROPRIETÁRIO: Alexandre Xavier de Lira da Silva			ANIMAL: Animal 09
ESPÉCIE:	SEXO: Fêmea	IDADE: 3 meses	RAÇA: SRD
DATA DA COLETA: 27/05/15			
SUSPEITA CLÍNICA: A esclarecer			
REQUISITANTE: Francisco Dantas			

HEMOGRAMA

ERITROGRAMA	VALORES ENCONTRADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
Hemácias ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	8,3	5,5–8,5
Hemoglobina (g/dL)	10,3	9–18
Hematócrito (%)	38,7	37–55
VGM (fL)	47	46–67
CHGM (g/dL)	26,5	32–36
RDW (%)	23,8	12–25
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	*	200–500

LEUCOGRAMA	VALORES ENCONTRADOS		VALORES DE REFERÊNCIA	
Leucócitos Totais (Cel/ μL)	3.300		1.700–6.000	
	Relativo (%)	Absoluto (/ μL)	Relativo (%)	Absoluto (/ μL)
Mielócitos	0	0	0	0
Metamielócitos	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0–3	0–300
Segmentados	17	561	10–47	300–1000
Linfócitos	79	2.607	57–85	1000–4.800
Eosinófilos	4	132	2–10	100–1.250
Monócitos	0	0	3–10	150–1.350
Basófilos	0	0	Raro	Raro

Jain, 1996; Meyer; Harvey, 2004.

Laudenita Nunes
Médica Veterinária
CRMV-PI 1294


Ana Paula Barros
Médica Veterinária
CRMV-PI 1295

Ítala Siqueira
Médica Veterinária
CRMV-PI 1125

Ilka Catarina
Médica Veterinária
CRMV-PI 1156

Wellson Oliveira
Médico Veterinário
CRMV-PI 0777

Janaína Cardoso
Médica Veterinária
CRMV-PI 1315

ANEXO III. Exemplo de Laudo dos exames bioquímicos realizados no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Nº EXAME:			REGISTRO:
PROPRIETÁRIO: Alexandre Xavier de Lira da Silva			ANIMAL: Animal 01
ESPÉCIE: Camundongo	SEXO:	IDADE:	RAÇA:
DATA DA COLETA: 24/06/15			
SUSPEITA CLÍNICA: A esclarecer			
REQUISITANTE: Francisco Dantas			

EXAMES BIOQUÍMICOS

	VALORES ENCONTRADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
		CAMUNDONGO
Glicose (mg/dL)	130,2	79 – 145
Ureia (mg/dL)	24,2	21 – 29
Creatinina (mg/dL)	0,29	< 0,5
Ácido úrico (mg/dL)	2,3	–
AST/TGO (UI/L)	249,3	77 – 383
ALT/TGP (UI/L)	68,5	40 – 189
Fosfatase Alcalina (UI/L)	195,2	66 – 262
CK (U/L)		–
Proteína total (g/dL)		5 – 7
Albumina (g/dL)		3 – 4
Globulina (g/dL)		–
Bilirrubina total (mg/dL)	0,28	–
Bilirrubina conjugada (mg/dL)	*	–
Bilirrubina não conjugada (mg/dL)	*	–
Colesterol total (mg/dL)		–
Triglicérides (mg/dL)	69	–
Cálcio (mg/dL)		7,9 – 10,5
Fósforo (mg/dL)		5,6 – 9,2
Magnésio (mg/dL)		–

Thrall, 2006.

Obs.: * Amostra insuficiente para realização dos testes.

Laudenita Nunes
Médica Veterinária
CRMV-PI 1294


Itala Siqueira
Médica Veterinária
CRMV-PI 1125

Wellson Oliveira
Médico Veterinário
CRMV-PI 0777

Ana Paula Barros
Médica Veterinária
CRMV-PI 1295

Ilka Catarina
Médica Veterinária
CRMV-PI 1156

Janaina Cardoso
Médica Veterinária
CRMV-PI 1315

