



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO TOXICOGENÉTICA NÃO CLÍNICA DO FITOL LIVRE E EM NANOEMULSÃO

MUHAMMAD TOREQUL ISLAM

TERESINA – PI

2017

MUHAMMAD TOREQUL ISLAM

PROSPECÇÃO TOXICOGENÉTICA NÃO CLÍNICA DO FITOL LIVRE E EM NANOEMULSÃO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal na Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Ponto focal: Piauí

Orientador(a):

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Teresina – PI

2017

MUHAMMAD TOREQUL ISLAM

PROSPECÇÃO TOXICOGENÉTICA NÃO CLÍNICA DO FITOL LIVRE E EM NANOEMULSÃO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal na Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Orientadora)
Presidente

Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida
Examinador Interno

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Examinador Interno

Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Examinador Externo

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
Examinador Externo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

MAGNÍFICO 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. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI

Prof^a. Dr^a. Carla Eiras

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO-
UFPI

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

Epígrafe

*Quality beats quantity; but I want both of them.
Selfishness is a universal enzyme; it can digest anything at any moment.
Solve the problems before you forget; after tonight you may have a new one.*

Muhammad Torequl Islam, 2017

Dedicatória

Ao meu amado e eterno **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** (*In memoriam*), que me descobriu no campo da pesquisa e me deu a oportunidade de trabalhar no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer ao meu criador, o Deus Todo Poderoso, que, devido sua misericórdia e graça, terminarei esta etapa da minha vida. Devo à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, que cuidou de mim não apenas como orientando, mas também como filho. Devo gratidão pelos seus tremendos esforços e consolidação mental.

Reconheço ao Prof. Dr. Ferdinand de Carvalho Pereira e à sua família o cuidado e a ajuda durante este período de estudo. Também ao Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, pela contínua colaboração.

Gostaria de agradecer do fundo do coração ao Prof. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, ao Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, ao Prof. Antonio Luiz Gomes Júnior, à Prof^a. Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, à Prof^a. Dr^a. Jéssica P. Costa, ao Prof. Dr. Arnóbio Antonio da Silva Júnior e à Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida pela contínua ajuda e apoio mental.

Além disso, agradeço ao Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes, à Prof^a. Dr^a. Antônia Maria das Graças Lopes Citó, à Prof^a. Dr^a. Hercília Maria Lins Rolim, à Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Freire de Medeiros, à Prof^a. Dr^a. Lidiane da Silva Araújo e, especialmente, ao Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior que, continuamente, animaram-me e me apoiaram para o sucesso na RENORBIO.

Especial agradecimento a todos os pesquisadores e estudantes (Mestrado, Doutorado e Pós-doutorado), que trabalharam no NTF e fora do NTF. Estou tentando lembrar os nomes: Keyla, Leonardo, Kátia, Letícia, Ricardo, Ana Maria, Rosália, Victor, Tonny, Raí, Samara, Ag-Anne, George, Johanssy, Guilherme, Oskar, Alisson, Iwyson, Jurandir, Josemar e outros.

Também quero agradecer ao Prof. Dr. Germano Pinho de Moraes, à Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Mendes de Moura Dantas, ao Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Ferreira e à Prof^a. Dr^a. Mayara Ladeira Coelho, pelo encorajamento e apoio mental.

Estou realmente muito grato à administração da RENORBIO, Ponto Focal Piauí. Cordiais agradecimentos aos laboratórios e aos funcionários que, continuamente, ajudam-nos a manter um local de trabalho adequado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, onde foram realizadas a parte experimental da minha formação acadêmica.

Finalmente, agradeço aos meus pais e familiares pelo encorajamento, oração e forte colaboração mental durante este período de estudo.

RESUMO

O fitol natural e sintético têm diversas atividades farmacológicas, tais como antimicrobianas, citotóxicas, antitumorais, antimutagênicas, antiteratogênicas, antidiabéticas, hipolipemiantes, antiespasmódicas, antiepilépticas, antinociceptivas, antioxidantes, anti-inflamatórias, ansiolíticas, antidepressivas e imunoadjuvantes. O estudo objetivou o desenvolvimento de nanoemulsão com fitol e avaliação dos perfis toxicogênicos em *Artemia salina*, *Allium cepa* e eritrócitos de ratos, bem como antioxidantes *in vitro*, *ex vivo* em eritrócitos de ratos, e em *Saccharomyces cerevisiae*. O fitol livre e o nanoemulsionado foram testados nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mM e de 2, 4, 8, 16, 40, 80 e 160 µM. O dicromato de potássio, sulfato de cobre, peróxido de hidrogênio e o trolox foram utilizados como padrões para toxicidade/citotoxicidade e genotoxicidade, bem como para efeito oxidante/antioxidante. A avaliação oxidante/antioxidante *in vitro* foi testada frente aos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e radical óxido nitrito; e peroxidação lipídica, potencial redutor e inibição de hemólise em eritrócitos de ratos. Adicionalmente, foi realizado o teste em *S. cerevisiae*. O fitol livre e nanoemulsionado em *A. salina* e *A. cepa* exibiram toxicidade e citotoxicidade em 4, 8 e 16 mM; e genotoxicidade em *A. cepa* em todas as concentrações testadas, com respostas adaptativas e/ou reparo dos danos em 2 mM, após 48 e 72 h. Os resultados para citotoxicidade em *A. salina* e eritrócitos de ratos sugerem que o fitol não é citotóxico nas concentrações de 40, 80 e 160 µM, mas apresentou citotoxicidade em 4 e 8 mM. O fitol, dependendo da concentração, livre e nanoemulsionado, em cotratamento com ácido etileno diamino tetra-acético, dicromato de potássio, sulfato de cobre e trolox podem, possivelmente, induzir lise de membrana, oxidação celular e citotoxicidade/toxicidade em *A. salina*, e atividade antioxidante (*ex vivo*) em eritrócitos de ratos, respectivamente. O fitol livre e o nanoemulsionado também apresentaram atividades antioxidantes pela captura de radicais livres *in vitro* e em *S. cerevisiae*, para as concentrações de 2 e 4 µM. Entretanto, foram oxidativos em 8 e 16 µM em *S. cerevisiae* proficiente e mutadas para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, bem como para catalase e duplos mutantes. Em síntese, o fitol livre e nanoemulsionado apresentaram atividades tóxicas, citotóxicas, oxidantes e genotóxicas em elevadas concentrações, por prováveis mecanismos de lise e alteração de potencial de membrana, indução de necrose e/ou apoptose, bem como por efeitos pró-oxidativos. Em baixas concentrações foram citoprotetores em *A. salina* e eritrócitos de ratos, possivelmente por mecanismos antioxidantes. O fitol livre e nanoemulsionado apresentaram atividades antagônicas como antioxidantes e citotóxicas, de forma similar e, possivelmente, podem ser aplicados em formulações farmacêuticas destinadas à prevenção de estresse oxidativo e como agentes antitumorais.

Palavras-chave: Fitol, nanoemulsão, citotoxicidade/toxicidade, genotoxicidade, antioxidante.

ABSTRACT

Phytol and its laboratory synthetic derivatives have various pharmacological activities such as: antimicrobial, cytotoxic, antitumor, antimutagenic, anti-atherogenic, antidiabetic, lipid-lowering, antispasmodic, antiepileptic, antinociceptive, antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic, antidepressant and immunoadjuvant. The study aimed at the preparation of phytol nanoemulsion and evaluation of toxicogenic profiles in *Artemia salina* and *Allium cepa*, as well as antioxidants in *in vitro*, in erythrocytes of rats, and *Saccharomyces cerevisiae*. Phytol and its nanoemulsion were tested at 2, 4, 8, 16, 40, 80 and 160 μM , and 2, 4, 8 and 16 mM concentrations. Potassium dichromate, hydrogen peroxide, copper sulphate and trolox were used as standards for toxicity/cytotoxicity and genotoxicity as well as for oxidants/antioxidants. The oxidative/antioxidant *in vitro* assay was tested against the radicals: 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl, ethylbenzotoleno-sulfonic acid and nitrite oxide radical; and for lipid peroxidation, reducing potential and inhibition of hemolysis in rat erythrocytes. In addition, the antioxidant test was performed in *S. cerevisiae*. Phytol and its nanoemulsion in *A. salina* and *A. cepa* exhibited toxicity and cytotoxicity at 4, 8 and 16 mM; and genotoxicity in *A. cepa* at all concentrations tested, with an adaptive response and/or damage repair at 2 mM, after 48 and 72 h. The results for cytotoxicity in *A. salina* and erythrocytes of rats suggest that phytol is non-cytotoxic at concentrations of 40, 80 and 160 μM but showed cytotoxicity at 4 and 8 mM. Phytol and nanoemulsified phytol in co-treatments with ethylene diamine tetraacetic acid, potassium dichromate, copper sulfate and trolox may possibly induce membrane lysis, cellular oxidation and cytoskeletal toxicity in *A. salina*, and antioxidant activity (*ex vivo*) in rat erythrocytes. Phytol and nanoemulsified phytol also showed antioxidant capacities by free radical capture and in *S. cerevisiae*, at concentrations of 2 and 4 μM . But they were oxidative at 8 and 16 μM in proficient *S. cerevisiae* and mutated for cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase, as well as for liver catalase. In summary, phytol and nanoemulsified phytol presented toxic, cytotoxic, oxidative and genotoxic effects at high concentrations, probably by inducing lysis and alterations of membrane potentials, induction of necrosis and/or apoptosis. It may be due to the prooxidative effects. However, at low concentration phytol exhibited cytoprotective in *A. salina* and erythrocyte of rats, possibly by antioxidant mechanisms. Phytol and nanoemulsified phytol may have similar antagonistic activities as antioxidants and cytotoxic agents and can be considered as pharmaceutical formulations intended to prevent oxidative stress and tumor prevention.

Keywords: Phytol, nanoemulsion, cyto-/toxicity, genotoxicity, antioxidant.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE TABELAS E QUADROS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Potenciais terapêuticos dos óleos essenciais	23
2.1.1 Atividades biológicas dos OEs de importância farmacológica	23
2.1.1.1 Efeitos citotóxicos	23
2.1.1.2 Efeitos genotóxicos, mutagênicos/antimutagênicos e carcinogênicos	24
2.1.1.3 Efeitos antioxidantes e outras atividades relacionadas	25
2.2 Terpenos, diterpenos e suas atividades biológicas/farmacológicas	25
2.2.1 Atividade antioxidante dos terpenos e diterpenos	32
2.2.2 Atividades antimicrobiana, antiviral e antimalárica dos diterpenos	33
2.2.3 Diterpenos e suas propriedades antiprotozoária e inseticida	35
2.2.4 Efeitos citotóxicos dos diterpenos	35
2.2.5 Atividade anticâncer dos diterpenos	35
2.2.6 Atividades quimiopreventiva e antimutagênica dos diterpenos	38
2.2.7 Efeitos dos diterpenos no sistema imunológico	39
2.2.8 Efeito antinociceptivo dos diterpenos	39
2.2.9 Diterpenos no sistema cardiovascular (SCV)	40
2.2.10 Diterpenos em lipidemia	41
2.2.11 Diterpenos no sistema hepático	41
2.2.12 Diterpenos como agentes neuroprotetores	41
2.2.13 Diterpenos com atividade trombolítica/antiplaquetária	42
2.2.14 Outras atividades dos diterpenos	43
2.3 Fitol	43
2.3.1 Biossíntese e metabolismo do fitol	47
2.3.2 Propriedades biológicas do fitol	52
2.3.2.1 Indicações toxicológicas do fitol	52
2.3.2.2 Atividade antimicrobiana do fitol	52
2.3.2.3 Atividade citotóxica do fitol	52
2.3.2.4 Efeitos antitumoral, antimutagênico e antiteratogênico do fitol	52
2.3.2.5 Fitol como adjuvante imunológico	53
2.3.2.6 Fitol em diabetes mellitus insulino-dependente	53
2.3.2.7 Fitol como mediador na redução de lipídios	54
2.3.2.8 Atividades neurofarmacológicas do fitol	54
2.3.2.9 Atividades antioxidante e anti-inflamatória	54
2.3.2.10 Fitol na fisiopatologia	55
2.3.2.11 Fitol como fonte de energia alternativa	55
2.4 Sistemas de vetorização e nanoemulsões	56
2.4.1 Sistemas de vetorização	56
2.4.2 Nanoemulsões	57
2.5 Genotoxicidade e biomarcadores toxicogenéticos	59
3 CAPÍTULO 1: Avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do fitol livre e em nanoemulsão	62
3.1 Resumo	62
3.2 Introdução	62
3.3 Materiais e Métodos	63
3.3.1 Reagente e produtos químicos	63
3.3.2 Obtenção dos cistos de <i>A. salina</i> e bulbos de <i>A. cepa</i>	64
3.3.3 Preparação da amostra teste	64
3.3.4 Preparação da nanoemulsão	64
3.3.5 Análise da distribuição de tamanhos e medições do potencial zeta	64
3.3.6 Incorporação e dispersão de FIT na nanoemulsão	65
3.3.7 Teste de citotoxicidade por bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	65

3.3.8 Avaliação da toxicidade/citotoxicidade e mutagenicidade pelo teste de <i>A. cepa</i>	65
3.3.9 Determinação da genotoxicidade em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i>	66
3.3.10 Análise estatística	67
3.4 Resultados	67
3.4.1 Características da nanoemulsão com FIT	67
3.4.2 Toxicidade/citotoxicidade do FIT e da FNE em <i>Artemia salina</i>	68
3.4.3 Toxicidade/citotoxicidade e genotoxicidade do FIT e do FNE em <i>A. cepa</i>	68
3.4.4 Genotoxicidade por Ensaio Cometa em <i>A. cepa</i>	71
3.5 Discussão	73
3.6 Conclusão	80
Referências	80
4 CAPÍTULO 2: Efeito citoprotetor do fitol na inibição de estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio	86
4.1 Resumo	86
4.2 Introdução	86
4.3 Materiais e Métodos	87
4.3.1 Reagentes e produtos químicos	87
4.3.2 Cistos de Microcrustáceos	88
4.3.3 Preparação de amostras para o bioensaio de letalidade em <i>A. salina</i>	88
4.3.4 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	89
4.3.5 Teste de hemólise em eritrócitos de ratos	89
4.3.6 Indução de hemólise em eritrócitos de ratos por peróxido de hidrogênio	89
4.3.7 Estatísticas	90
4.4 Resultados	90
4.4.1 Atividades citotóxica/citoprotetora do FIT em <i>A. salina</i>	90
4.4.2 Citotoxicidade e atividade antioxidante do FIT em eritrócitos de ratos	93
4.5 Discussão	94
4.6 Conclusão	100
Referências	100
5 CAPÍTULO 3: Avaliação da capacidade antioxidante do fitol e de sua formulação em nanoemulsão	103
5.1 Resumo	103
5.2 Introdução	103
5.3 Materiais e Métodos	104
5.3.1 Reagentes e químicos	104
5.3.2 Preparação do FNE	104
5.3.3 Análise da distribuição do tamanho das nanopartículas de FIT e medição do potencial zeta	105
5.3.4 Carga de fármaco nas nanoemulsões	105
5.3.5 Teste de inibição de hemólise	105
5.3.6 Preparação da amostra	106
5.3.7 Teste de inibição de DPPH•	106
5.3.8 Atividade de descoloração do ABTS•+	106
5.3.9 Atividade de eliminação de •OH	107
5.3.10 Atividade de eliminação do radical óxido nítrico (NO•)	107
5.3.11 Atividade de inibição da peroxidação lipídica	108
5.3.12 Capacidade de potencial redutor	108
5.3.13 Capacidade de inibição de hemólise em eritrócitos de ratos	109
5.3.14 Testes oxidantes/antioxidantes com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
5.3.15 Análise estatística	110
5.4 Resultados e Discussão	110
5.4.1 Caracterização do fitol em nanoemulsão (FNE)	110
5.4.2 Atividade antioxidante do fitol em inibição de DPPH•	112
5.4.3 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na descoloração do ABTS•+	112
5.4.4 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na eliminação de •OH	112
5.4.5 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na inibição da peroxidação lipídica	115
5.4.6 Capacidade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão no potencial redutor (PR)	115
5.4.7 Capacidade do fitol livre e em nanoemulsão na inibição de hemólise em eritrócitos de ratos	116
5.4.8 Atividades oxidantes/antioxidantes do fitol livre (FIT) e nanoemulsionado (FNE) em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
5.5 Conclusões	122
Referências	122
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
REFERÊNCIAS	130

APÊNDICE A – Artigo publicado no periódico <i>Phytotherapy research</i>	154
APÊNDICE B – Artigo publicado no periódico <i>Chemico-Biological Interactions</i>	155
APÊNDICE C – Artigo submetido ao periódico <i>Chemosphere</i>	156
APÊNDICE D – Artigo publicado no periódico <i>International Archives of Medicine</i>	157
APÊNDICE E – Artigo publicado no periódico <i>International Archives of Medicine</i>	158
APÊNDICE F – Outras publicações relacionadas ao tema da tese	159
ANEXO A – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFPI	164

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Caminhos para a biossíntese de diterpenos em plantas.	26
Figura 2. Atividades biológicas/farmacológicas relatadas para os diterpenos.	27
Figura 3. Esqueleto básico de diterpenos com atividade antioxidante.	32
Figura 4. Alguns diterpenos com atividades antimicrobiana e citotóxica.	34
Figura 5. Alguns diterpenos com atividade antitumoral.	37
Figura 6. Diterpenos com atividades quimiopreventiva e/ou antigenotóxica/antimutagênica.	38
Figura 7. Alguns diterpenos relatados como anti-inflamatórios e imunoestimuladores.	39
Figura 8. Diterpenos com atividade antinociceptiva.	40
Figura 9. Diterpenos com atividades hepato-/cardio-/neuroprotetora.	41
Figura 10. Diterpenos com atividades antiplaquetária, antitrombótica e vasorelaxante.	42
Figura 11. Compilação dos dados da prospecção científica.	44
Figura 12. Prospecção tecnológica para o fitol.	45
Figura 13. Distribuição de patentes sobre o fitol, considerando o ano, país de origem e categoria	46
Figura 14. Vias de biossíntese do fitol.	48
Figura 15. Vias de biossíntese do ácido fitânico.	49
Figura 16. Via de metabolismo do ácido fitânico.	50
Figura 17. Derivados do fitol (em laboratório).	51

CAPÍTULO 1

Figura 1. Sugestões de mecanismos citotóxicos postulados para o FIT e FNE em <i>Artemia salina</i> .	74
Figura 2. Sugestões de mecanismos citotóxicos/tóxicos e genotóxicos postulados para o FIT e FNE em <i>Allium cepa</i> .	79

CAPÍTULO 2

Figura 1. Eventos toxicogenéticos do fitol.	99
---	----

CAPÍTULO 3

Figura 1. Possíveis mecanismos de redução do fitol.	116
---	-----

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1. Atividades farmacológicas do FIT e FNE em sistemas teste para avaliação toxicogenética e oxidante/antioxidantes	127
---	-----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Óleos essenciais diterpênicos derivados de plantas com importantes atividades biológicas.	28
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeitos do FIT no tamanho (diâmetro) e potencial zeta (PZ) do veículo para nanoemulsão e FNE.	67
Tabela 2. Atividade citotóxica do FIT e FNE em <i>A. salina</i> .	68
Tabela 3. Toxicidade em raízes de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes tratamentos.	69
Tabela 4. Perfil citotóxico do FIT, FNE e controles em <i>A. cepa</i> .	70
Tabela 5. Atividade genotóxica do FIT, FNE e possíveis respostas adaptativas e/ou de reparo de danos ao DNA em <i>A. cepa</i> .	72

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Efeitos citoprotetores do FIT em baixas concentrações em <i>A. salina</i> .	91
Tabela 2. Efeitos citoprotetores do FIT em altas concentrações em <i>A. salina</i> .	92
Tabela 3. Citotoxicidade do fitol tempo e concentrações dependentes em <i>A. salina</i> .	93
Tabela 4. Hemólise em eritrócitos induzida por estresse oxidativo	94

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Efeitos do FIT no tamanho (diâmetro) e potencial zeta (PZ) do veículo para nanoemulsão e FNE.	111
Tabela 2. Potencial antioxidante do FIT e FNE <i>in vitro</i> , em comparação aos controles.	113
Tabela 3. Potencial antioxidante da CE ₅₀ do FIT e FNE <i>in vitro</i> e do padrão (trolox).	114
Tabela 4. Avaliação oxidante/antioxidante do FIT em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , avaliados pelo tamanho (0-40 mm) do halo de crescimento leveduriforme em placas de petri.	119
Tabela 5. Avaliação oxidante/antioxidante do FNE em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , avaliados pelo tamanho (0-40 mm) do halo de crescimento leveduriforme em placas de petri.	120

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 1. Efeitos do FIT e FNE em sistemas teste e seus prováveis mecanismos de ação.	128
---	-----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

Quadro 1. Cotratamento do FIT com agentes químicos citotóxicos, oxidantes, citogenotóxicos e antioxidantes	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH: 2,2'-azobis (2- metilpropionamidina);
ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico;
ALDH3A2: Aldeído desidrogenase família 3 membro 2;
AMP: Adenosina monofosfato;
ATM: Ataxia telangiectasia;
ATP: Adenosina trifosfato;
CaCl₂: Cloreto de cálcio;
CAT: Catalase;
CCl₄: Tetracloreto de carbono;
CE: Concentração efetiva;
CH₂O•-: Radicais metóxi aniônicos;
CIPO: Organização Canadense de Propriedade Intelectual;
CL₅₀: Concentração com 50% de letalidade;
CN: Controle negativo;
CO₂: Dióxido de carbono;
CoA: Coenzima A;
COXs: Ciclo-oxigenases;
CuSO₄.5H₂O: Sulfato de cobre pentahidratado;
CuZn-SOD: Cobre-zinco-superóxido dismutase;
Cyp: Citocromo P;
DNA: Ácido desoxirribonucleico;
DPPH•: radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil;
DSB: Quebras de dupla cadeia;
EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético;
EPO: Escritório Europeu de Patentes;
ERK: Receptor de quinase extracelular;
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio;
EROs: Espécies reativas de oxigênio;
FALDH: Aldeído graxo desidrogenase;
FIT: Fitol livre;
FNE: Fitol nanoemulsionado;
GABA: Ácido gama aminobutírico;

GIRK: Canal de potássio de retificadores regulados pela proteína G;
GLUT2/GLUT4: Proteínas transportadoras de glicose para dentro da célula;
GPx: Glutaciona peroxidase;
GSH: Glutaciona reduzida;
GST: Glutaciona-S-transferase;
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio;
HBV: Vírus da hepatite B;
HCl: Ácido clorídrico;
HCV: Vírus da hepatite C;
HepG2: Células de hepatocarcinoma humano;
HIV: Vírus da imunodeficiência humana;
RRH: Reparo de recombinação homóloga;
HSCs: Células estreladas;
HSP70 1A: Proteína de choque térmico família A (HSP70), membro 1A;
IC₅₀: Concentração que inibe 50% da proliferação celular;
IFN- γ ; Interferon gama;
IL: Interleucinas;
IM: Índice mitótico;
iNOS: Óxido nítrico sintase indutível;
INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial;
K₂Cr₂O₇: Dicromato de potássio;
LDH: Lactato desidrogenase;
LPO: Lipoperoxidase;
LPS: Lipopolissacarídeo;
LXR β : Receptor beta do fígado;
MAPKs: Proteína-quinases ativadas por mitógenos;
MDA: Malonilaldeído;
MCF2: Células de adenocarcinoma humano;
MgCl₂: Cloreto de magnésio;
MIC: Concentração Inibitória Mínima;
MMS: Metil metanossulfonato;
MNs: Micronúcleos;
Mn-SOD: Manganês-superóxido dismutase;
mRNA: RNA mensageiro;

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio;
Na₂CO₃: Bicarbonato de sódio;
Na₂SO₄: Fosfato de sódio;
NaCl: Cloreto de sódio;
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado;
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido;
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido;
NF-κB: Fator nuclear-*kappa*-B;
NHEJ: União de extremidade não-homóloga;
NK92: Célula natural *killer* 92;
NO: Óxido nítrico;
NO•: Radicais de óxido nítrico;
NOS-2: Óxido nítrico sintase 2;
Nrf2: Fator nuclear eritroide 2;
O₂^{-•}: Radical ânion superóxido;
OEs: Óleos essenciais;
OH: Grupo hidroxila;
•OH: Radical hidroxila;
OMS: Organização Mundial de Saúde;
PBS: Solução de tampão fosfato salino;
PC: Polineuropatia crônica;
PCA: Poli (cianoacrilato);
PGDs: Prostaglandinas;
PGE: Prostaglandina E;
PI3K: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3- quinase;
PKB: Proteína quinase B;
PKC: Proteína quinase C;
PLA: Poli (ácido láctico);
PLG: Poli (ácido glicolítico);
PLGA: Poli (copolímero de ácido láctico e glicolítico);
PPARs: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma;
PR: Potencial redutor;
PZ: Potencial zeta;

r^2 : Coeficiente de correlação;
RNA: Ácido ribonucleico;
RXR: Receptor X de retinoides;
RZCP: Condrodisplasia punctata rizomélica;
Slr1652: Isogênico *Synechocystis* sp;
SSB: Quebras de fitas simples;
TBA: Ácido tiobarbitúrico;
TBARS: Radicais de ácido tiobarbitúrico;
TGF- β : Fator de crescimento tumoral β ;
Th2: Linfócito T-*helper* 2;
TMV: Vírus do mosaico do tabaco;
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa;
TPP: Tiamina pirofosfato;
TRO: Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico);
TZDs: Tiazolidinedionas;
USPTO: Organização de Propriedade Intelectual dos Estados Unidos;
UV: Ultravioleta;
VE: Veículo para nonoemulsão;
V79: Fibroblastos de pulmão de hamster chinês;
WIPO: Organização Mundial da Propriedade Intelectual;
YEPD: Extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar bacteriológico;
 α -SMA: Alfa-actina de músculo liso por miofibroblastos.

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam uma pluralidade de uso a saber: alimentos, rituais, construção, utensílios domésticos, instrumentos musicais, lenha, pesticidas, roupas e abrigo (POLAT et al., 2015) e, especialmente, como remédios, devido à grande variedade de princípios farmacologicamente ativos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) menciona que cerca de 25% dos medicamentos modernos são desenvolvidos a partir de plantas usadas tradicionalmente. Como os medicamentos oriundos de plantas medicinais geram lucros, a popularidade da medicina tradicional cresce dia após dia. Além desse aspecto, os compostos bioativos, derivados de plantas medicinais, não só podem ser diretamente utilizados como agentes terapêuticos, mas também podem servir como protótipos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de várias doenças em seres humanos (MALL; GAUCHAN; CHHETRI, 2015).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de produtos de metabolismo secundário de plantas, de baixo peso molecular (<500 daltons) e extraídos por destilação a vapor, bem como por processos de extração com solventes (NAKATSU et al., 2000; CALSAMIGLIA et al., 2007; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Os OEs geralmente são armazenados em dutos de óleo e resina, glândulas ou tricomas (pelos glandulares) das plantas (BASER; DEMIRCI, 2007). Aproximadamente 60.000 toneladas são produzidas por ano, com o valor de mercado estimado em 700 milhões de dólares, indicando alta produção e consumo de OEs em todo o mundo. Foram identificadas, pelo menos, 300 espécies de plantas produzindo cerca de 3.000 OEs diferentes, das quais cerca de 10% são comercialmente importantes (DJILANI; DICKO, 2012).

Na maioria das vezes, os OEs são utilizados como agentes aromatizantes em perfumarias, produtos farmacêuticos, cosméticos e preservação de produtos alimentares e bebidas (BURT, 2004; HUSSAIN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013). É evidente que os OEs, nos sistemas tradicionais, foram prescritos para uma variedade de problemas de saúde devido suas atividades biológicas importantes como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antimutagênico, antidiabético, antiviral, anti-inflamatório, antiprotozoário, neurofarmacológico, entre outras (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SHAREEF; YELLU; ACHANTA, 2014). Entretanto, na maioria das vezes, as bioatividades dos OEs são dirigidas por um ou dois dos seus componentes fitoquímicos (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs podem constituir 20-100 metabólitos secundários de plantas diferentes, pertencentes a uma variedade de classes químicas (CARSON; HAMMER, 2011), principalmente os ésteres, éteres, álcoois, aldeídos, monoterpenos, óxidos, fenóis, sesquiterpenos e terpenos. Dentre estes, os fenilpropanoides e os derivados oxigenados constituem as maiores classes de fitoquímicos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Os terpenos, de forma estrutural e funcional, representam os constituintes

químicos mais abundantes em OEs. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15), mas também existem hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (BAKKALI et al., 2008; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2011).

Os terpenos contendo quatro unidades de isopreno (cinco unidades de carbono), apresentando, portanto, 20 átomos de carbono com grupos metila ramificados são os diterpenos, que podem ser diterpenoides quando oxigenados. Os diterpenoides têm demonstrado uma série de atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiano, anticancerígeno, anti-inflamatório, cicatrizante, anti-hipertensivo, analgésico e atividades neurofarmacológicas (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2011; COSTA et al., 2012 e 2014). Eles também podem ser utilizados como alucinógenos e edulcorantes (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2011).

O fitol (3,7,11,15-tetrametil hexadec-2-en-1-ol), representado pelo acrônimo FIT, é um diterpenoide derivado de clorofila abundantemente presente na natureza. Possui atividades biológicas similares aos OEs e aos terpenos, tais como antioxidante, antimicrobiana (INOUE et al., 2005; SAIKIA et al., 2005; MORAES et al., 2014), anticâncer (GUO et al., 2014), imunoadjuvante, antidiabética, hipolipemiante (TAKAHASHI et al., 2002a,b), ansiolítica (COSTA et al., 2014), antidepressiva (COSTA et al., 2011), antinociceptiva (SANTOS et al., 2013), espasmolítica (PONGPRAYOON et al., 1992), antiteratogênica (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002), facilitadora de crescimento capilar e anticasca (PRABAVATHY, 2014). Embora o número de evidências de seus efeitos biológicos esteja crescente, o fitoquímico continua sendo utilizado como fragrância em cosméticos, produtos de higiene pessoal e produtos não cosméticos (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). No entanto, o FIT e seus metabólitos comuns, como o ácido fitânico, estão em destaque em terapias da doença de Refsum (WIERZBICKI, 2007; WANDERS; KOMEN; FERDINANDUSSE, 2011) e síndrome de Sjögren-Larsson (WILLEMSEN et al., 2004).

O FIT pode ser considerado como produto natural ou sintético de importância para formulações farmacêuticas. No entanto, a avaliação da segurança, especialmente relativa aos riscos toxicogenéticos, é crucial para qualquer substância com potencial farmacêutico (ISLAM, 2016a). Além desse aspecto, o potencial toxicogenético do FIT ainda não está bem esclarecido. Cabe ressaltar que fármacos podem induzir riscos genotóxicos e carcinogênicos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2010; DOWNES; FOSTER, 2015).

As nanodrogas são eficazes pelas suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas carreando substâncias farmacêuticas com boa viabilidade oral e diversos benefícios biotecnológicos. No entanto, podem também levar a complicações clínicas e farmacêuticas, com ênfase para os seus possíveis potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos (ONOUE; YAMADA; CHAN, 2014; FARCAL et al., 2015). A avaliação toxicogenética de produtos farmacêuticos e de nanocarreadores pode

ser realizada em diversos sistemas teste, incluindo os estudos de mutação de genes em bactérias e os testes *in vitro* e *in vivo* para avaliações citogenéticas em células eucarióticas (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

Dentre os testes citogenéticos, o teste *Allium cepa* apresenta diversos biomarcadores para análises de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, com resultados similares aos testes com animais (LUBINI et al., 2008). Em estudos toxicogenéticos, o teste com *Saccharomyces cerevisiae* é também um bom modelo de células eucarióticas, com muitos genes funcionais e ortólogos aos do ser humano e pode ser usado na identificação de genes susceptíveis à toxicidade e genotoxicidade (NORTH et al., 2010, 2011 e 2014). O Ensaio Cometa também é preciso na detecção de danos e recomendado para reduzir os efeitos em terapias (KHALILI-FARDI; SAFARI; EGHBAL, 2015), para a avaliação de danos ao material genético e também vem sendo, internacionalmente, recomendado para avaliação de nanocarreadores (VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011; BAHADAR et al., 2016).

Considerando o potencial farmacológico dos OEs, dos diterpenos e, em especial do FIT, a importância terapêutica dos nanocarreadores e a diversidade de testes toxicogenéticos, com aplicação de biomarcadores citotóxicos e citogenéticos, o estudo objetivou a realização da prospecção toxicogenética do FIT livre e nanoemulsionado (FNE) em estudos não clínicos. Para tanto, foi necessário o desenvolvimento da nanoemulsão e a aplicação dos biomarcadores para: (1) toxicidade em *Artemia salina* e em *Allium cepa*; (2) citotoxicidade em *A. salina*, *A. cepa* e em eritrócitos de ratos; (3) genotoxicidade e reparo com o Ensaio Cometa em *A. cepa*; (4) mutagenicidade em *A. cepa*; (5) atividade citoprotetora e antioxidante em *A. salina* e em eritrócitos de ratos; (6) atividades antioxidantes *in vitro* e (7) atividades oxidantes/antioxidantes em *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas enzimáticas para superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e duplos mutantes, e para catalase e duplo mutante.

A tese intitulada por “Prospecção toxicogenética não clínica do fitol livre e em nanoemulsão” está demonstrada no presente documento em: (1) INTRODUÇÃO, de forma sucinta, apresenta dados gerais sobre o objeto da pesquisa; (2) REFERENCIAL TEÓRICO (revisões publicadas em periódicos com QUALIS A2 e B1 para Biotecnologia), onde estão descritas as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, terpenos, diterpenos e do FIT, bem como sobre sistemas de vetorização de fármacos e biomarcadores toxicogenéticos; (3) CAPÍTULO 1 “Avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do fitol e de sua formulação em nanoemulsão” (artigo submetido a periódico QUALIS A2 para Biotecnologia), onde se apresenta os resultados para toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade nos sistemas teste *A. salina* e em *A. cepa*; (4) CAPÍTULO 2 “Efeitos citoprotetores na inibição de estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio” (publicado em periódico QUALIS B2 para Biotecnologia), onde foram avaliados os efeitos citotóxicos/citoprotetores e antioxidantes do fitol em *A.*

salina e em eritrócitos de ratos, com o uso de substâncias padrões para os possíveis mecanismos citotóxicos e citoprotetores em sistemas celulares, e os efeitos de interferência do FIT nessas atividades farmacológicas; (5) CAPÍTULO 3 “Avaliação da capacidade antioxidante do fitol e de sua formulação em nanoemulsão” (publicado em periódico QUALIS B2 para Biotecnologia), com os dados do potencial antioxidante do FIT e FNE frente aos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e radical óxido nítrico, em estudos de peroxidação lipídica, potencial redutor e inibição da hemólise em eritrócitos de ratos, em comparação com um análogo de α -tocoferol, bem como os efeitos oxidantes/antioxidantes em *S. cerevisiae*.



Organizado com base nos artigos publicados:

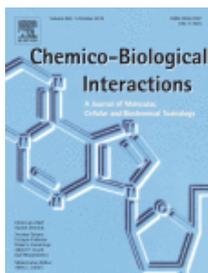


Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes.

Phytotherapy Research, v. 30, p. 1420-44, 2016.

[IF: 2.69; QUALIS B1 para Biotecnologia] Apêndice A.

Islam MT, da Mata AM, de Aguiar RP, Paz MF, de Alencar MV, Ferreira PM, Melo-Cavalcante AA.



Phytol in a pharma-medico-stance.

Chemico-Biological Interactions, v. 240, p. 60-73, 2015.

[IF: 2.61; QUALIS A2 para Biotecnologia] Apêndice B.

Islam MT, de Alencar MV, da Conceição Machado K, da Conceição Machado K, de Melo-Cavalcante AA, de Sousa DP, de Freitas RM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Potenciais terapêuticos dos óleos essenciais

Os produtos naturais obtidos a partir de minerais, plantas e animais servem como fontes importantes para novos fármacos e terapias (DE PASQUALE, 1984). Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 75% de compostos bioativos, oriundos de vegetais, são de importância para o desenvolvimento de drogas usadas em terapias de doenças humanas (MALL et al., 2015), mas cada planta contém milhares de componentes químicos, com efeitos benéficos e nocivos. Não há dúvida de que o uso de padrões, doses e fisiopatologia dos pacientes sejam as principais considerações dos medicamentos à base de plantas (IZZU et al., 2016), como os óleos essenciais (OEs).

Os OEs são metabólitos secundários encontrados em plantas, que vêm sendo considerados nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria. Atualmente, aproximadamente 3.000 OEs estão bem caracterizados (LIANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Eles apresentam propriedades protetoras para as plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas, mas também podem atrair alguns insetos que são vitais para a germinação e reprodução das plantas (BAKKALI et al., 2008).

Curiosamente, os países do Mediterrâneo e regiões tropicais são ricos em plantas medicinais, que servem como boas fontes de OEs. Os OEs são bem conhecidos por suas propriedades antissépticas, antimicrobianas, analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias, espasmolíticas e anestésicas (BAKKALI et al., 2008), bem como outras propriedades medicinais importantes, como a atividade antioxidante (TEIXEIRA et al., 2012; ROBY et al., 2013). Eles também podem ser usados para adicionar sabor e fragrância a alimentos, a bebidas e a outros bens, e atuar como conservantes para alimentos e bebidas (HYLDGAARD et al., 2012). Devido suas diversas aplicações, atividades biológicas e contribuições fisiológicas (BAKKALI et al., 2008; LIANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015), os OEs estão ganhando atenção no campo da descoberta e desenvolvimento de drogas.

2.1.1 Atividades biológicas dos OEs de importância farmacológica

2.1.1.1 Efeitos citotóxicos

As atividades citotóxicas de OEs ou de seus componentes principais podem ser ativadas pela luz. Isto pode ser benéfico e/ou prejudicial para o hospedeiro, uma vez que os OEs podem causar danos às membranas celulares, organelas, materiais genéticos e outras macromoléculas (por exemplo,

proteínas e lipídios), pois podem atuar como pró-oxidantes em associação com espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, eles possuem atividade antioxidante vital, mas também podem apresentar citotoxicidade e fototoxicidade (DIJOUX et al., 2006). Os OEs parecem não ter um alvo celular específico, o que, provavelmente, decorre da pluralidade de seus constituintes (CARSON et al., 2002).

A citotoxicidade dos OEs pode resultar da sua lipofilicidade, que lhes permite atravessar, facilmente, a parede celular e a membrana citoplasmática de uma variedade de organismos. Isto pode perturbar estruturas celulares, aumentar a permeabilidade da membrana, causar a perda de íons celulares essenciais, agir na redução do potencial de membrana, colapsar a bomba de prótons e esgotar o *pool* de adenosina trifosfato (ATP) (BAKKALI et al., 2008). Além disso, os OEs podem coagular o citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998) e macromoléculas de células danificadas, como DNA, lipídios e proteínas (ULTEE et al., 2002; BURT, 2004).

Em doses mais elevadas, os OEs alteram a fluidez da membrana, fazendo com que se tornem anormalmente permeáveis, resultando, assim, em fuga de radicais, citocromo C, íons cálcio e proteínas. Eles também resultam na produção de espécies reativas oxidáveis secundárias em associação com espécies reativas primárias, levando ao estresse oxidativo, falha bioenergética, destruição das membranas mitocondriais internas e externas, levando à morte celular por apoptose e necrose (YOON et al., 2000; ARMSTRONG, 2006). Os efeitos citotóxicos também podem ser explicados por sua capacidade de induzir danos ao material genético - aspecto a ser discutido a seguir.

2.1.1.2 Efeitos genotóxicos, mutagênicos/antimutagênicos e carcinogênicos

A avaliação do potencial genotóxico (danos ao DNA) de qualquer tipo de produto para o consumo humano é uma etapa crucial e obrigatória para a sua segurança com relação ao potencial carcinogênico e a indução de defeitos hereditários (GUZMAN et al., 2008). Embora as atividades cancerígenas e mutagênicas nucleares sejam raras para os OEs, o aumento à sua exposição pode resultar em adutos covalentes com materiais genéticos, levando à formação de pequenos mutantes citoplasmáticos. A formação de adutos é principalmente influenciada pela luz solar (UV). Os OEs polifenólicos têm atividade pró-oxidante e estão sendo testados quanto à sua capacidade para reduzir o volume tumoral local ou a proliferação de células tumorais através das suas propriedades apoptóticas e/ou necróticas (MANOSROI et al., 2006, WU et al., 2006).

Os OEs são altamente permeáveis mas, em concentrações elevadas, podem induzir genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (BAKKALI et al., 2008; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Entretanto, existem relatos sobre suas ações na indução do reparo de DNA, resultando, assim, nas suas propriedades antimutagênicas (BAKKALI et al., 2008). Os OEs extraídos de gengibre foram

antimutagênicos e quimiopreventivos em *Salmonella typhimurium* (JEENA et al., 2014), possivelmente devido aos seus efeitos antioxidantes, que serão descritos no próximo item.

2.1.1.3 Efeitos antioxidantes e outras atividades relacionadas

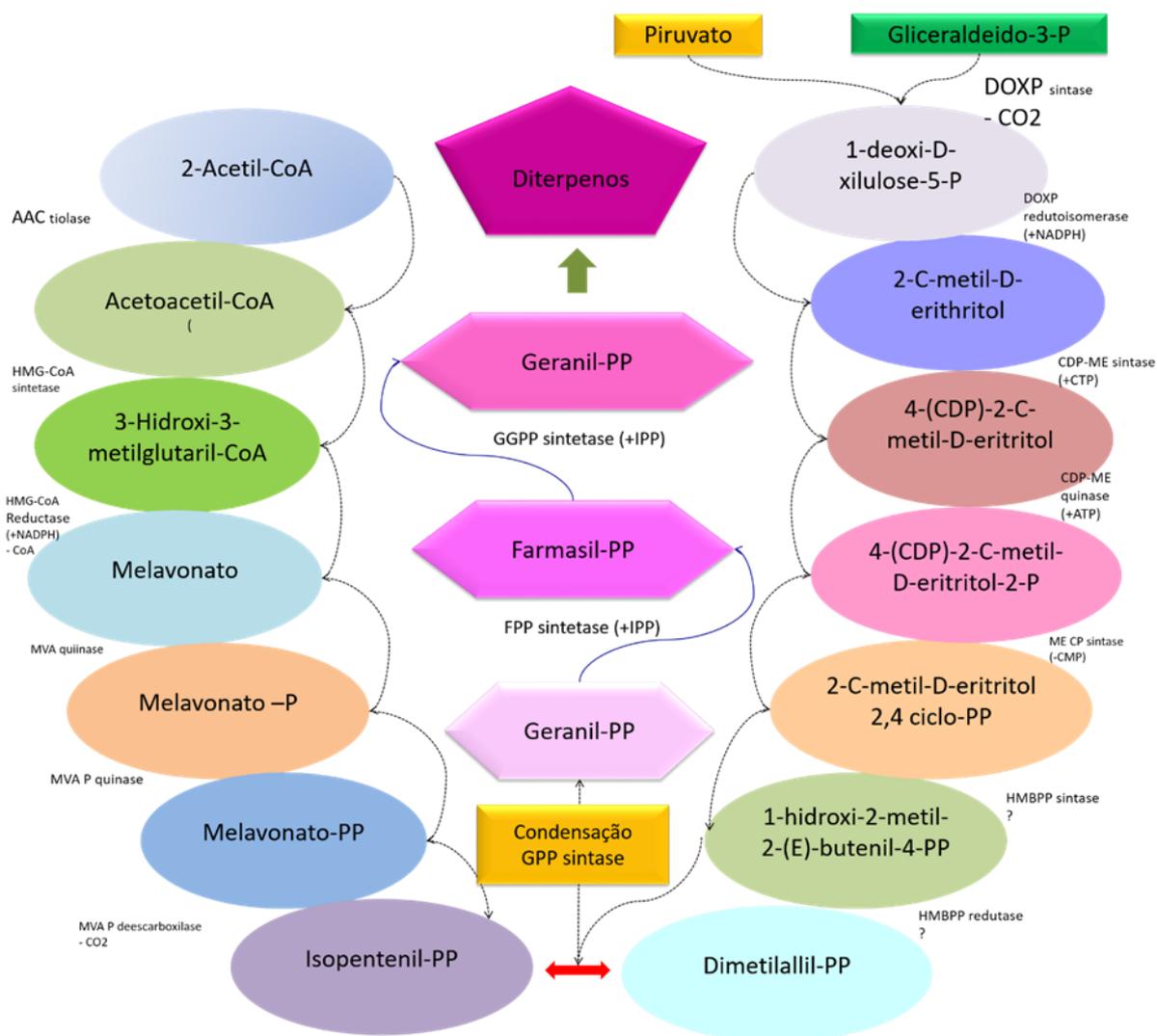
Os OEs que incluem terpenoides e compostos fenólicos são de elevado interesse científico devido às suas atividades antioxidantes. Em pequenas doses, têm propriedades antioxidantes; mas, em altas doses, podem ter efeitos cito-/genotóxicos/mutagênicos (BAKKALI ET AL., 2008). Os OEs que têm um grupo hidroxila ativo (-OH) podem funcionar como antioxidantes (GYAWALI; IBRAHIM, 2014), explicando, assim, as atividades antioxidantes. Estes antioxidantes são eliminadores de EROs/ERNs, portanto, são agentes importantes para o tratamento de fenômenos neurológicos, tais como ansiedade (COSTA et al., 2014) e outros fenômenos neurodegenerativos relacionados, além de doenças cardiovasculares (ZIAEE et al., 2015), agindo, assim, na promoção da saúde (ANDRADE et al., 2014).

Os componentes dos OEs tais como o terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvona, geraniol, linalol, citronelol, nerol, safrol, eucaliptol, limoneno e cinamaldeído podem apresentar efeitos de sinergismo que podem influenciar em suas atividades biofísicas e biológicas (IPEK et al., 2005), também com interferência dos componentes presentes em menores concentrações (HOET et al., 2006; SANTANA-RIOS et al., 2001). Devido suas propriedades medicinais associadas às atividades antioxidantes (TEIXEIRA et al., 2012; ROBY et al., 2013), os OEs também apresentam contribuições fisiológicas (BAKKALI et al., 2008; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015) e estão ganhando atenção no campo da descoberta e desenvolvimento de fármacos.

2.2 Terpenos, diterpenos e suas atividades biológicas/farmacológicas

Os terpenos formam classes estruturais e funcionalmente diferentes que consistem em bases de cinco carbonos chamadas unidades de isopreno. Uma via de biossíntese geral de diterpeno está demonstrada na **Figura 1**. Os terpenos contendo quatro unidades de isopreno, portanto 20 átomos de carbono com grupos metil ramificados, são diterpenos; e os que são oxigenados são chamados diterpenoides. Os diterpenos são sintetizados tanto pelo ácido mevalônico quanto pelas vias de ácido não mevalônico (DUBEY et al., 2003).

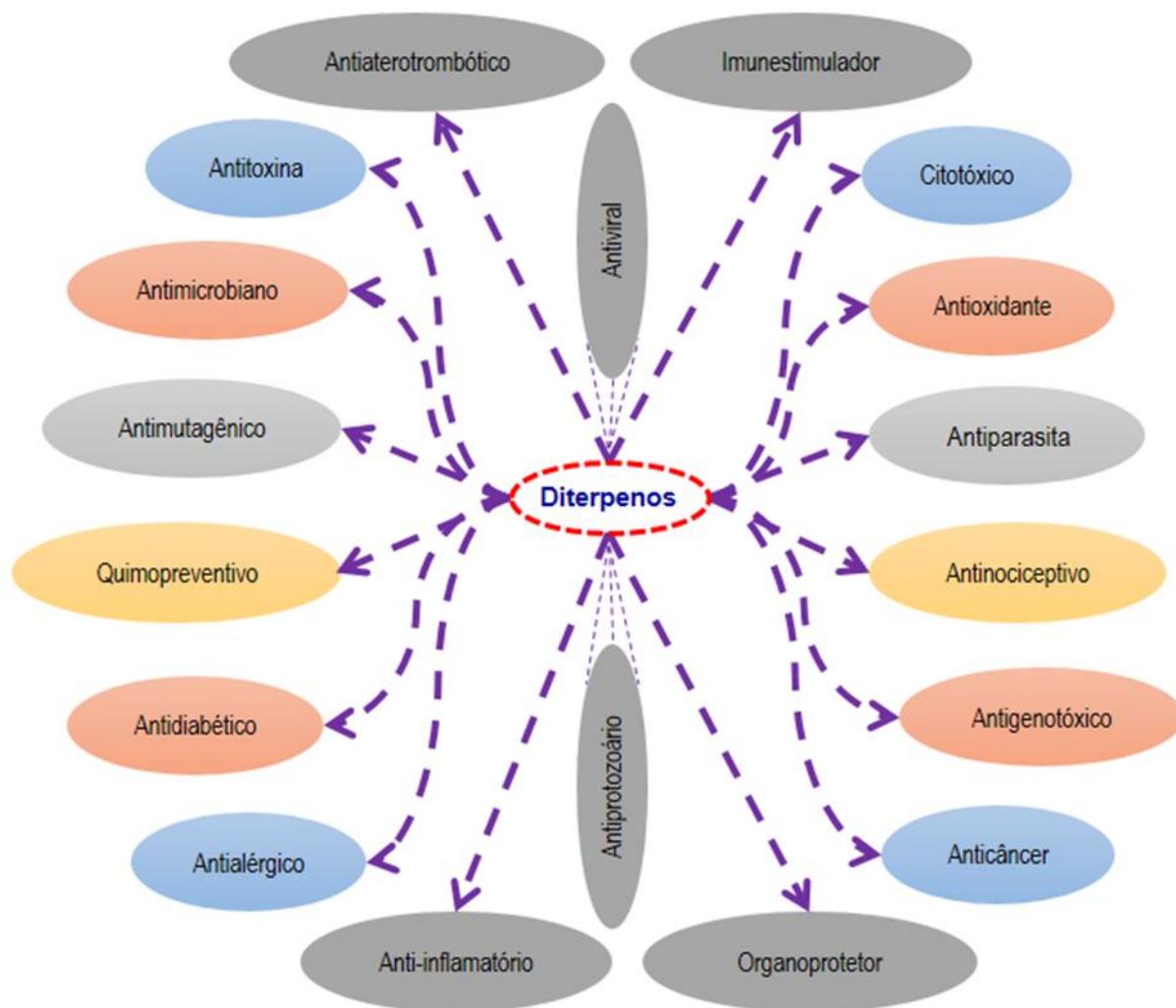
Figura 1. Caminhos para a biossíntese de diterpenos em plantas.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

Diversos estudos revelaram que os diterpenos têm atividades antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, anticancerígena, antigenotóxica, antimutagênica, quimiopreventiva, anti-inflamatória, antinociceptiva, imunoestimulante, organoprotetiva, antidiabética, hipolipemiante, antialérgica, antiplaquetária, antitrombótica e antitoxina (**Figura 2**). Os diterpenos, uma família de componentes presentes em certos OEs, estão se tornando um marco no mundo dos OEs. Os diterpenos formam a base para compostos biologicamente importantes, tais como retinol, retinal, taxol e fitol. Os diterpenoides, por sua vez, têm atividades antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, cicatrizante de feridas, anti-hipertensiva, analgésica e neurofarmacológica (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2014). Além disso, eles podem ser usados como alucinógenos e edulcorantes, bem como para estimular contrações uterinas (DEVAPPA et al., 2011), como relatado na **Tabela 1**.

Figura 2. Atividades biológicas/farmacológicas relacionadas para os diterpenos.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

Tabela 1. Óleos essenciais diterpênicos derivados de plantas com importantes atividades biológicas.

Atividade	Fonte	Diterpeno/atividade (mecanismo)/sistema teste/dose (via)	Referências
Antioxidante	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Carnosol, ácido carnósico (600 mg/kg), rosmadial, ácido rosmarínico estudados por técnicas biofísicas	PÉREZ-FONS et al., 2006
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Atividade anticâncer mediada por antioxidantes em diferentes tipos de tumores sólidos e sanguíneos	PETIWALA; JOHNSON, 2015
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	400 mg/kg (ácido carnósico mais carnosol. A razão 1:1 p/p) inibiu a peroxidação lipídica	ORTUÑO et al., 2015
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Indução de defesas antioxidantes e atividade anticancerígena do ácido carnósico e carnosol	CARVALHO et al., 2015
	<i>Croton zambesicus</i>	Ent-18-hidroxi-traquilano-3-ona demonstrou inibição da produção de óxido nítrico na aorta de ratos	MARTINSEN et al., 2010
	<i>Lobophytum compactum</i>	Os lobocompactóis A e B (IC ₅₀ : 17,80-59,06 µM) exibiram atividades antirradicais (O ⁻) e anticancerígenas contra células tumorais A549 (pulmão) e HL-60	MINH et al., 2011
	<i>Premna tomentosa</i>	Três novos diterpenos icetexanos com atividade anti-DPPH [•]	AYINAMPUDI et al., 2012
	<i>Euphorbia prolifera</i>	Dez novos diterpenos mirisinol apresentaram atividade inibidora da produção de óxido nítrico	XU et al., 2012
	<i>Ajuga ciliata</i>	Dois novos diterpenos neo-clerodano apresentaram atividade inibidora da produção de óxido nítrico	GUO et al., 2012
	<i>Casearia sylvestris</i>	A casearina B reduziu a produção de EROs	PRIETO et al., 2013
<i>Sideritis linearifolia</i>	Foliol, linearol e sidol (5 e 10 µM) apresentaram efeito citoprotetor através da inibição do estresse oxidativo induzido por H ₂ O ₂	GONZÁLEZ-BURGOS et al., 2013	
Anti-inflamatória	<i>Euphorbia paralias</i>	A paralianona e o seu análogo (até 10 µM) inibiram a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos J774	BARILE et al., 2007
	<i>Helianthus annuus</i>	Graniflorólicos, caurenóicos e traquilobóicos mostraram atividade inibidora da produção de óxido nítrico, PGE, TNF-α, NOS-2 e COX-2 em macrófagos (1-20 µM)	DÍAZ-VICIEDO et al., 2008
	<i>Tedania ignis</i>	O Tedanol a 1 mg/kg em camundongos mostrou forte inibição da expressão de COX-2 e iNOS com produção de MPO	COSTANTINO et al., 2009
	<i>Vitex negundo</i>	Negundoins A-E, negundoína F, negundoína G e dois outros (IC ₅₀ : 0,12-0,23 µM) mostraram inibição de iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7	ZHENG et al., 2010
	<i>Premna obtusifolia</i>	Pimaranos, rosanos abietanos, icetexanos em conjunto com outros 15 diterpenos conhecidos, inibiram a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264,7 macrófagos	SALAE et al., 2012
	<i>Aplysia dactylomela</i>	Acetato de dactyloditerpenol inibiu tromboxano B2 (IC ₅₀ 0,4 µM) e O ⁻ (IC: 1 µM) em de microglia de ratos	JIMÉNEZ-ROMERO et al., 2014
	Sementes de café	Kahweol inibiu a iNOS, a atividade e expressão da COX-2, a secreção de MCP-1 e a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais	CÁRDENAS et al., 2015
	<i>Erythrophleum ivorense</i>	Eritrovirensina (10–100 mg/kg, p.o.)	ARMAH et al., 2015
Antimicrobiana	<i>Xenia novaebritanniae</i>	Novaxenicinas B e xeniólidas I exibiram anticorpos anti- <i>Escherichia coli</i> e atividade contra <i>Bacillus subtilis</i> 25 µg/mL	BISHARA et al., 2006
	<i>Prumnopitys andina</i>	2p-acetoxiferruginol	SMITH et al., 2008
	<i>Viguiera arenaria</i>	Diterpenos Ent-pimarano (MIC: <100 µg/mL), ácido ent-pimara-8, 15-dien-19-óico; Ent-8, 15-pimaradien-3beta-ol; Ent-15-pimareno-8 beta, 19-diol; E ent-8, 15-pimaradien-3beta-acetoxi (MIC:	PORTO et al., 2009

		<10 µg/mL) atuaram contra <i>Kocuria rhizophila</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. pneumonia</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Solidago virgaurea</i>	Nove diterpenos clerodanos apresentaram atividade contra <i>S. Aureus</i>	STARKS et al., 2010
	<i>Premna obtusifolia</i>	Pimaranos, rosanos abietanos e icetexanos mostraram atividade antibacteriana contra <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. sonei</i> e <i>P. aeruginosa</i>	SALAE et al., 2012
	<i>Alpinia pahangensis</i>	A pahangensina B mostrou atividade contra <i>B. cereus</i> com MIC: <100 µg/mL.	SIVASOTHY et al., 2013
	<i>Eremophila microtheca</i>	Serrulatano 1 (MIC: 64-128 µg/mL) para vários micro-organismos	BARNES et al., 2013
	<i>Caesalpinia furfuracea</i>	Os ácidos calsalurfúricos A apresentaram atividade contra <i>S. Aureus</i> com MIC de 16 µg/mL	SIRIDECHAKORN et al., 2014
	<i>Trigonostemon heterophyllus</i>	Trigonostemona e trigonoquineno B mostraram atividade contra <i>S. aureus</i> em 20 µg/mL.	LI et al., 2014
	<i>Turraeanthus africanus</i>	Turraeanins G mostrou atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> em alíquotas de 40 µL.	CHENDA et al., 2014
Antiviral	<i>Dictyota pfaflii</i>	Dolabelladienetriol exibiu atividade anti-HIV-1 com IC ₅₀ de 7,2 µM	CIRNE-SANTOS et al., 2008
	<i>Dodonaea viscosa</i>	Os diterpenos de Ent-labden mostraram atividade anti-herpes com seletividade	OLIVEIRA et al., 2012
	<i>Illicium jiadifengpi</i>	Nove ácidos jiadifenoicos exibiram atividade contra o vírus Coxsackie B2, B3, B4 e B6 (IC ₅₀ : 0,82 – 200 µM/mL)	ZHANG et al., 2013
	<i>Daphne genkwa</i>	Genkwadafinina tem atividade contra a hepatite B e C e HIV	EO et al., 2014
	<i>Illicium jiadifengpi</i>	Os ácidos jiadifenoicos agiram contra Coxsackie B3 (IC ₅₀ : 7,0-22,2 µM/mL).	ZHANG et al., 2014
	<i>Dictyota spp.</i>	Os diterpenos dolabellanos produziram atividade anti-HIV-1 (IC ₅₀ : 0,25-210 µM).	PARDO-VARGAS et al., 2014
Antimalárica	<i>Radix salviae</i>	Miltiorinas A-D exibiu atividade anti-influenza A com IC ₅₀ de 39,5 µg/mL	HIRATA et al., 2015
	<i>Fuerstia africana</i>	Os diterpenos de abietano mostraram atividade anti- <i>Plasmodium falciparum</i> com IC ₅₀ de 1,95 µg/mL	KOCH et al., 2006
	<i>Bowdichia nitida</i>	6a,7p-diacetoxi-uacapano exibiu atividade anti- <i>P. falciparum</i> com uma EC ₅₀ de > 100 µg/mL.	MATSUNO et al., 2008
	<i>Vitex cauliflora</i>	3-oxo, 15,17,18-triacetoxi-labda-7,13E-dieno mostrou efeito anti- <i>P. falciparum</i> com IC ₅₀ de 30,7 µg/mL	RASAMISON et al., 2010
Antiprotozoária	<i>Salvia species</i>	14 diterpenos do tipo clerodano produziram forte atividade inibitória com valores de IC ₅₀ de 22,9 µM para <i>Entamoeba histolytica</i> e de 28,2 µM para <i>Giardia lamblia</i>	CALZADA et al., 2015
Leishmanicida	<i>Caesalpinia echinata</i>	Cinco novos diterpenos de cassano agiram contra <i>Leishmania amazonensis</i> a uma concentração de 20 µg/mL	COSTA et al., 2011
	<i>Baccharis platypoda</i>	Platipodiol	MOREIRA et al., 2014
Inseticida	<i>Erythroxylum passerinum</i>	14-O-metil-ryanodanol agiu contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	BARREIROS et al., 2007
	<i>Euphorbia kansui</i>	Dois diterpenos ingenane agiram contra <i>Nilaparvata lugens</i> e <i>Tetranychus urticae</i> (250-1000 mg/L)	DANG et al., 2010
	<i>Calceolaria talcana</i>	Vários diterpenos demonstraram atividade contra <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Drosophila melanogaster</i> .	MUÑOZ et al., 2013
Citotóxica	<i>Glossocarya calcicola</i>	Clerodanes exibiram citotoxicidade contra células Sf9 (IC ₅₀ : entre 0,76 ± 0,098 e 1,22 ± 0,038 µg/mL)	RASIKARI et al., 2005
	<i>Xenopus embryos</i>	cansuinina B, 20-OD-ingenol Z e 20-OD-ingenol E (0,1-200 µg/mL) exibiram atividade de bloqueio do ciclo celular em embriões de <i>Xenopus</i>	OKOUCHI et al., 2005

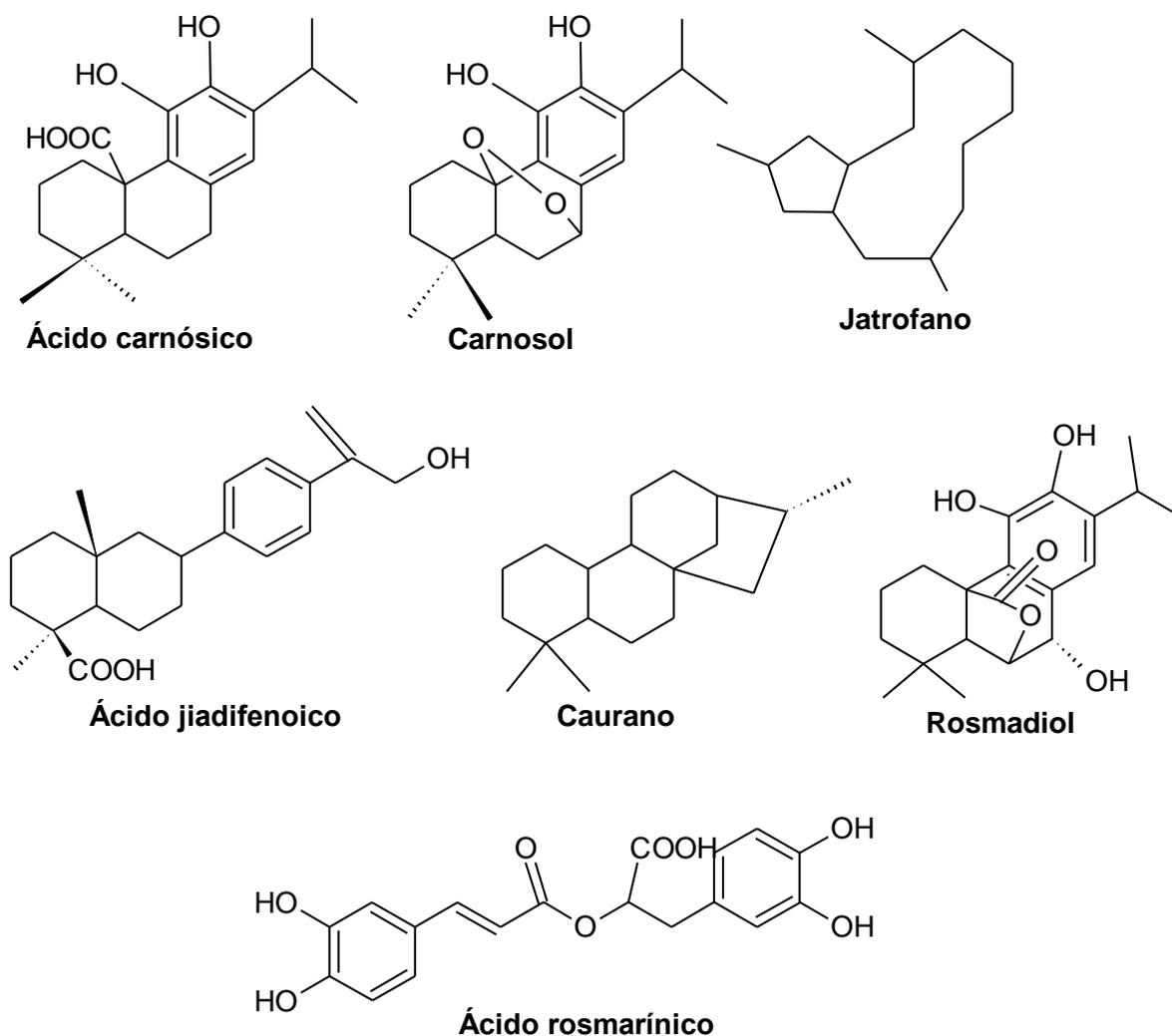
	<i>Chloranthus henryi</i>	Henrilabdanos C (IC ₅₀ : 0,09-0,66 µM) apresentaram citotoxicidade contra BEL-7402, BGC-823 e HCT-8	LI et al., 2008
	<i>Gelonium aequoreum</i>	Gelomulidas K produziu citotoxicidade contra A549, MDA-MB-231, MCF7 e HepG2, com IC ₅₀ <20 µg/mL	LEE et al., 2008
Anticâncer	<i>Pinus sylvestris</i>	15-etil-18-metil-pinifolato (10 µg/mL) exibiram atividade contra Hela, SK-N-SH e BEL-7402	WANG et al., 2008
	<i>Andrographis paniculata</i>	A andrographolactona exibiu valores de IC ₅₀ de 0,05 mM contra linhagens de câncer de cólon	WANG et al., 2009
	<i>Hedychium spicatum</i>	Dois novos diterpenos do tipo lábdano exibiram citotoxicidade contra A-431, MCF-7 e A-549	REDDY et al., 2009
	<i>Sequoia sempervirens</i>	20-hidroxiferruginol e 6α-hidroxysugiol (IC ₅₀ : 2-5 µg/mL) inibiram fortemente tumores de cólon, do pulmão e de mama	SON et al., 2005
	<i>Taxus sumatrana</i>	Cinco novos ésteres de diterpenos taxanos demonstraram atividade contra Hepa59T/VGH, NCI, e Hela	SHEN et al., 2005
	<i>Celastrus hypoleucus</i>	(+)-7-desoxinimbidol apresentou atividade anticâncer contra HeLa, A549, CNE e MCF com IC ₅₀ entre 2,34 e > 50 µg/mL	XIONG et al., 2006
	<i>Euphorbia kansui</i> <i>Daphne genkwa</i> <i>Laetia thamnia</i>	12 diterpenos (0,1-50 µg/mL) inibiram a topoisomerase II em células embrionárias de <i>Xenopus</i> Yuanhuajine (IC ₅₀ : 11,1-53,4 M) inibiram DNA Topoisomerase I. Ent-caur-16-en-19-óico (IC ₅₀ : 5,03 µg/mL), en-3-hidro-hidroxi-ran-16-eno (IC ₅₀ : 12,83 µg/mL) e ent-caur-16-en-3alfa,19-diol apresentaram atividade contra 22Rv1, LNCaP, bem como potencial anticâncer contra HT29, HCT116, SW480, SW620 e MCF-7.	MIYATA et al., 2006 ZHANG et al., 2006 HENRY et al., 2006
	<i>Petalostigma pubescens</i>	Os diterpenos sonderianol e de primarano atuaram contra células leucêmicas de camundongos L1210, P388 e células de hepatocarcinoma.	GRACE et al., 2006
Antigenotóxica Antimutagênica	<i>Salvia officinalis</i> Sementes de café	Manool demonstrou atividade em HepG2 a 0,5-8,0 µg/mL. Palmitato de cafestol (0,9 e 1,7 µg/mL) e uma mistura de cafestol e kahweol (> ou = 0,3 µg/mL) exibiram efeitos antigenotóxicos na HepG2.	NICOLELLA et al., 2014 MAJER et al., 2005
	<i>Casearia sylvestris</i>	A casearina B mostrou ser genotóxica, mas não possui efeitos mutagênicos em células HepG2 (ensaio cometa).	PRIETO et al., 2013
	<i>Physcomitrella patens</i>	Ent-beiereno, ent-sandaracopimaradieno, ent-caur-16-eno, e 16-hidroxi-ent-caureno exibiram efeitos antimutagênicos em <i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>E. coli</i> .	ZHAN et al., 2015
Quimiopreventiva	<i>Salvia corrugata</i>	Fruticulina C, 7a-metóxi-19-acetoxi-roileanona, 7a, 19-diacetoxi-roiletanona, e 7-dehidroxi-coniactone exibiram atividade quimiopreventiva (IC ₅₀ : 0,06-59,5 µM) em testes de inibição de histona-desacetilase	GIACOMELLI et al., 2013
	<i>Hedychium coronarium</i>	Isocoronarina D, metoxicoronarina D, etoxicoronarina D e benzoil eugenol inibiram NF-kB, COX-1 e COX-2 (IC ₅₀ : 0,9-57,6 µM).	ENDRINGER et al., 2014
Imunoprotetora	<i>Cryptomeria japônica</i>	Sugiol e Secoferruginol (10 µM) modularam a função DC humana (produziu grandes quantidades de IL-4 e pequenas quantidades de IFN-γ) de forma a favorecer a polarização de células TH2.	TAKEI et al., 2007
	<i>Aralia cordata</i>	O ácido pimaradienoico produziu resposta celular através da expressão de mRNA de Cyp26a1 e ativação de RAR em células HepG2.	TANABE et al., 2014
Antinociceptiva	<i>Phaleria nisidai</i> <i>Laurencia glandulifera</i>	Simplexina (4,0 µg) aumenta a liberação de IFNγ em mononucleares. O neorogioltriol (62,5 µM) diminuiu a produção de óxido nítrico, COX-2 e expressão do fator de necrose tumoral alfa em células Raw264.7.	KULAKOWSKI et al., 2015 CHATTER et al., 2009

	<i>Leonotis leonurus</i>	7-O-p-glicósido de luteolina e luteolina (10 mM) exibiram atividade antinociceptiva mediada por receptor GABA.	HE et al., 2012
Cardioprotetora	<i>Croton cajucara</i>	Trans-dehidrocrotolina (5, 10 ou 15 mg/kg, i.v.) em ratos reduziu a liberação de óxido nítrico.	SILVA et al., 2005
	<i>Viguiera robusta</i>	Os diterpenos do tipo caurane e pimarano produziram atividade inibitória da contratilidade vascular.	AMBROSIO et al., 2006
	<i>Pycnocycla spinosa</i>	3,7,10,14,15-pentaacetil-5-butanoil-13,17-epoxi-8-mirinsina exibiu atividade antiespasmódica com valor de IC ₅₀ de 0,062 ± 0,011 µM.	GHANADIAN et al., 2014
	<i>Baccharis trimera</i>	Os diterpenos neo- e ent-clerodano (30, 100 e 300 µM) na veia porta de ratos Wistar, despolarizada com KCL induziu bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem.	GARCIA et al., 2014
Antidiabética/hipolipemiante	<i>Premna tomentosa</i>	Três novos diterpenos icetexano (3 µg/mL) apresentaram atividade antirradical DPPH•, com atividade inibidora de α-glicosidase.	AYINAMPUDI et al., 2012
	<i>Polyalthia longifolia</i>	16α-hidroxi-cleroda-3,13 Z-dien-15,16-olide (50 mg/kg/dia durante 8 semanas, p.o.) em camundongos produziram atividades antidipogênicas e antiobesidade.	BEG et al., 2015
Hepatoprotetora	<i>Acanthopanax koreanum</i>	O ácido acantoico (20 ou 50 mg/kg, i.g.) em camundongos expostos ao CCl ₄ e células estreladas hepáticas estimuladas com TGF-β, inibiu a expressão de α-SMA estimulada por TGF-β e aumentou a expressão de LXRβ.	BAI et al., 2014
	<i>Dioscorea bulbifera</i>	Diasbulina-D (16, 32 e 64 mg/kg/dia durante 12 dias) em camundongos aumentou a glutathione peroxidase, a glutathione-S-transferase, a superóxido dismutase cobre-zinco e Mn-SOD e reduziu os níveis de catalase.	MA et al., 2011
Neuroprotetora	<i>Fritillaria ebeiensis</i>	Dois diterpenos labdanos (6α, 7p-di-hidróxi-Labda-8 (17), 12 (E), 14-trieno e 6-oxo-2a-hidróxi-labda-7,12 (E), 14-trieno) mostraram efeitos neuroprotectores em células SH-SY5Y a 3, 10 e 30 µM.	XU et al., 2011
	<i>Aloysia virgata</i>	(16R)-16,17,18-tri-hidroxifilocladan-3-ona e (16R)-16,17-di-hidroxifilocladan-3-ona (0,3-3 mg / kg, i.p.) produziram efeitos semelhantes a ansiolíticos em camundongos.	WASOWSKI; MARDER, 2011
Antitrombótica	<i>Trogopterus xanthipes</i>	Manool (IC ₅₀ : 11,0 µg/mL), (12R,13R)-8,12-epoxi-14-labden-13-ol (IC ₅₀ : 8,7 µg/mL), pomiferina A e 8,11,13-abietatrieno-7α, 18-diol (IC ₅₀ : 9,2 µg/mL), em trombina de plasma de coelho.	YANG et al., 2010
	<i>Abies georgei</i>	7-oxocallitrisico apresentou fraca atividade antitrombina e atividade moderada contra agregação plaquetária em coelhos a 100 µg/mL.	YANG et al., 2010
Antialérgica	<i>Suregada multiflora</i>	Ent-16-caiureno-3β, 15β, 18-triol, 3-oxo-16-caureno-15β, 18-diol, ent-16-caiureno-3β, 15β-diol, abbeokutona, helioscopinólida A, helioscopinólida C e helioscopinólida I (IC ₅₀ : 22,5 a 42,2 µM) exibiram atividade antialérgica em células RBL-2H3 com os valores IC ₅₀ variando entre 22,5 e 42,2 µM.	CHEENPRACHA et al., 2006
Antitoxina	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Diterpeno dolastano	MOURA et al., 2011
Antiangiogênica	Sementes de café	Cafestol diminuiu a produção de FAK e AKT e óxido nítrico em HUVECs.	WANG et al., 2012

2.2.1 Atividade antioxidante dos terpenos e diterpenos

Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram potenciais capacidades antioxidantes de alguns diterpenos importantes (**Figura 3**), tais como carnosol, ácido carnósico (600 mg/kg) (ORTUÑO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015), rosmadial, ácido rosmarínico (PÉREZ-FONS et al., 2006; PETIWALA; JOHNSON, 2015), lobocompactóis A e B (IC₅₀: 17,80-59,06 µM) (MINH et al., 2011), foliol, linearol (5 µM), sidol (10 µM) (GONZÁLEZ-BURGOS et al., 2013) e diterpenos de jatrofano (CHEN et al., 2014).

Figura 3. Esqueleto básico de diterpenos com atividade antioxidante.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

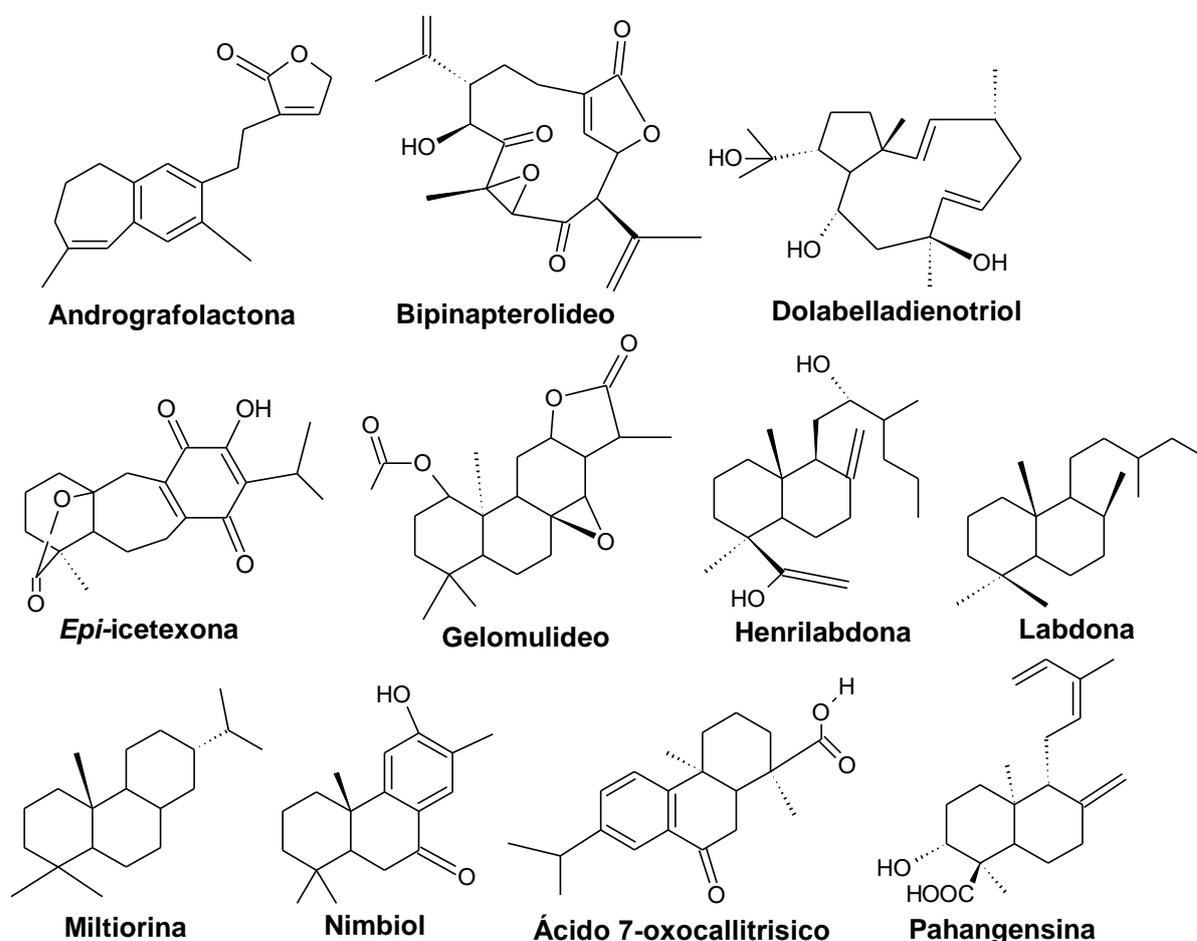
Pérez-Fons e colaboradores (2006) observaram efeitos de diterpenos obtidos de *Rosmarinus officinalis* nas membranas fosfolipídicas, com alterações na permeabilidade de membrana. Os modos mais comuns de atividades antioxidantes são a inibição da peroxidação lipídica (ORTUÑO et al., 2015), produção de EROs e de radicais de óxido nítrico (NO•) (CHEN et al., 2014). De acordo com González-Burgos e colaboradores (2013), diterpenos de caurano (por exemplo, foliol, linearol e sidol) são relatados como compostos citoprotetores por mecanismos antioxidantes.

2.2.2 Atividades antimicrobiana, antiviral e antimalárica dos diterpenos

Substâncias com um ou mais grupos -OH ativos, que também têm atividade antioxidante, podem aumentar a permeabilidade da membrana de uma variedade de organismos, tais como bactérias, fungos e vírus. Devido sua alta lipofilicidade, os diterpenos em alta concentração podem facilmente penetrar na membrana celular e criar poros. Assim, eles podem causar a perda de componentes celulares essenciais, incluindo organelas, levando ao encolhimento celular e morte subsequente. Os diterpenos que possuem estas propriedades incluem ent-beyer-15-en-19-ol (3,1 e 3,6 µg/mL) (DREWES et al., 2006), diterpenos de casbane (MIC: 62,5-500 µg/mL) (SÁ et al., 2012) e diterpenos tricíclicos fundidos com pirazole (MIC: 0,71-3,12 µg/mL) (YU et al., 2015).

Estudos recentes apontam que o timol tem forte inibição da *Eikenella corrodens* e *Candida albicans* (VLACHOJANNIS et al., 2015). No entanto, os efeitos dos diterpenos foram principalmente estudados usando concentrações mais elevadas do que em baixas. Alguns diterpenos antibacterianos importantes são diterpenos de ent-pimarano (MIC: <100 µg/mL), ent-pimara-8 (14), 15-dien-19-óico (PA), sal de sódio PA, ent-8 (14) 15-pimaradien-3beta-ol, ent-15-pimareno-8 beta, 19-diol, ent-8 (14), 15-pimaradien-3beta-acetoxi (MIC: <10 µg/mL) (PORTO et al., 2009), pahangensina B (MIC: <100 µg/mL) (SIVASOTHY et al., 2013), serrulatano 1 (MIC: 64-128 µg/mL) (BARNES et al., 2013), diterpenos antifúngicos 16α-hidroxicicloda (14) Z-dien-15,16-olide (MIC90: 50.3, 100.6 e 201.2 µM) (BHATTACHARYA et al., 2015), diterpenos antivirais diterpenos ent-labden (OLIVEIRA et al., 2012), bem como os diterpenos dolabelanos (PARDO-VARGAS et al., 2014). Alguns dos diterpenos com atividades antimicrobiana e citotóxica estão representados na **Figura 4**.

Figura 4. Alguns diterpenos com atividades antimicrobiana e citotóxica.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

As atividades antibacterianas e antifúngicas dos diterpenos estão relatadas na **Tabela 1**. Xenicanos (MANZO et al., 2009), 16a-hidroxiciclododa-3,13 (14) Z-dien-15,16-olido (BHATTACHARYA et al., 2015) e 1,4-dihidroxi-2E, 6E,12E-trien-5-ona-casbano (VASCONCELOS et al., 2014) produziram uma forte atividade contra *Candida albicans*. O diterpeno dolabelladienotriol apresentou atividade anti-HIV-1, com uma EC_{50} de 7,2 μ M (CIRNE-SANTOS et al., 2008); enquanto que a genkwadanina inibiu fortemente o crescimento do vírus da hepatite B e C (HBV e HCV) e HIV (EO et al., 2014). Além disso, os diterpenos ent-labdano de *Dodonaea viscosa* exibiram atividade antiviral contra o vírus B2, B3, B4 e B6 de Coxsackie com uma $IC_{50} > 0,82 \rightarrow 200 \mu$ M/mL (ZHANG et al., 2013). De outro modo, a atividade anti-herpes e anti-influenza A foi demonstrada pelo tratamento com diterpenos (OLIVEIRA et al., 2012) e miltiorins A-D (HIRATA et al., 2015), respectivamente. Verificou-se que as cefalininas A (IC_{50} : 0,42 μ M) e B (IC_{50} : 0,79 μ M) de *Caesalpinia minax* produzem uma forte atividade contra *Plasmodium falciparum* (MA et al., 2014), seguida de diterpenos isolados de *Fuerstia Africana*, *Polyalthia longifolia* (GBEDEMA

et al., 2015), *Hypoestes forskalei* (AL MUSAYEIB et al., 2014), *Vitex cauliflora* (RASAMISON et al., 2010) e *Bowdichia nitida* (MATSUNO et al. 2008).

2.2.3 Diterpenos e suas propriedades antiprotozoária e inseticida

A leishmaniose, a malária, e outras doenças transmitidas por insetos são frequentemente observadas em regiões subdesenvolvidas. Os OEs, como diterpenos, que têm atividades citotóxicas, são atualmente de grande interesse para combater esses tipos de doenças. Costa e colaboradores (2011) relataram cinco novos diterpenos da planta *Caesalpinia echinata*; e Moreira e colaboradores (2014) identificaram platypodiol em *Baccharis platypoda*, que é relatado como tendo atividade leishmanicida. Os diterpenoides clerodanes de *Clerodendron infortunatum* foram encontrados agindo contra a praga do algodão, *Helicoverpa armigera* (ABBASZADEH et al., 2014). De outra forma, os diterpenos de duas espécies de *Erythroxylum* foram relatados, anteriormente, por exibirem uma atividade inseticida contra as larvas de *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue, zika, chikungunya e febre amarela (BARREIROS et al., 2007).

2.2.4 Efeitos citotóxicos dos diterpenos

Existem inúmeros relatos indicando que os diterpenos são citotóxicos e anticancerígenos. Mas estudos também apontam atividades antígeno-tóxicas e antimutagênicas. Os diterpenos derivados da clorofila, a exemplo o FIT, apresentam atividades antioxidante, citotóxica, antimutagênica, antibiótico-quimioterápica, hipolipemiante e neurofarmacológica (ISLAM et al., 2015). Dados toxicológicos sugerem que o FIT é bem tolerado por roedores. No entanto, em altas concentrações pode produzir EROs e induzir potencial pró-inflamatório intrínseco, resultando em efeitos críticos nas células que podem levar até morte celular. A concentração de diterpenos é um fator crucial uma vez que a toxicidade de qualquer substância é uma preocupação quando se considera a sua concentração e tempo de exposição (COSENTINO et al., 2014). Um bom número de diterpenos em uma grande variedade de células foi listado, anteriormente, na **Tabela 1**.

2.2.5 Atividade anticâncer dos diterpenos

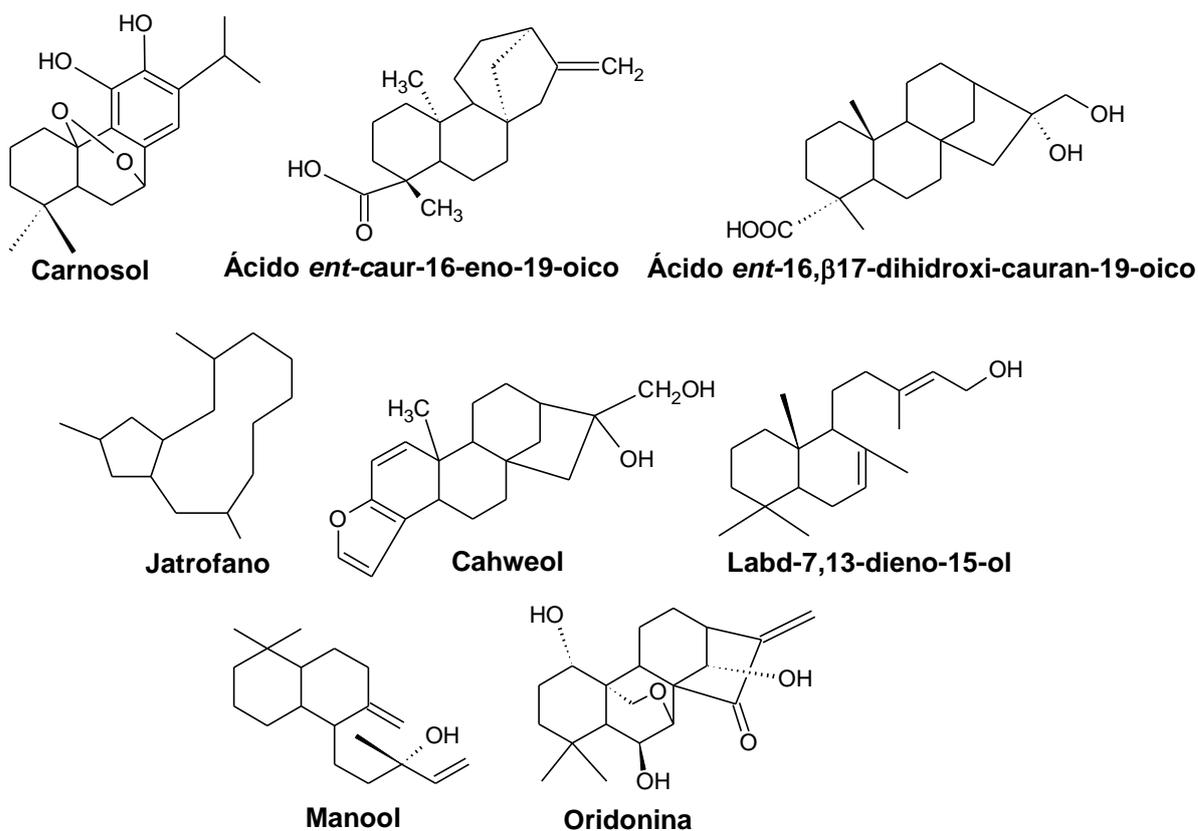
Tendo propriedades citotóxicas, bem como a capacidade de direcionamento celular, os diterpenos podem afetar a morte celular programada. Por exemplo, vários estudos (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*) que foram conduzidos, independentemente, com uma variedade de diterpenos (**Figura 5**) revelaram

que estes compostos são candidatos promissores para o tratamento de tumores, a exemplo dos taxanos, um diterpeno de origem vegetal utilizado como agente quimioterapêutico. O taxol é utilizado para o tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão, bexiga, próstata, melanoma, esofágico, assim como outros tipos de tumores sólidos. Também tem sido utilizado no sarcoma de Kaposi. Existem relatos de que cinco ésteres de diterpenos de taxano isolados de *Taxus sumatrana* (SHEN et al., 2005) e (+)-7-desoxinimbidiol exibem atividade antitumoral significativa contra várias linhagens de células tumorais humanas (XIONG et al., 2006). Ter propriedades antagônicas como antioxidantes e citotóxicas apontam que os diterpenos podem ser uma boa ferramenta para a terapia do câncer (LESGARDS et al. 2014).

O diterpeno (11,12,16-trihidroxi-2-oxo-5-metil-10-desmetil-abieta-1, 6,8,11,13-penteno) isolado a partir do extrato metanólico de *Premna serratifolia* L., quando testado em neuroblastoma SHSY-5Y e células de melanoma B16, mostrou uma atividade antitumoral significativa. Além disso, há uma menção para o seu potente potencial antirradical (DPPH•) (HABTEMARIAM; VARGHESE, 2015). A inibição de topoisomerase I e II de DNA foi observada no tratamento com diterpenos de Yuanhuajino (IC₅₀: 11,1-53,4 µM) (MIYATA et al., 2006) e 12 compostos de terpeno (0,1-50 µg/mL) (ZHANG et al., 2006), respectivamente.

Os diterpenos, 13-hidróxi-15-oxo-zoapatlino induziram hipodiploidia e externalização de fosfatidilserina, rompendo o potencial de membrana mitocondrial (PIAZ et al., 2007), enquanto carnosol e carnosol aldeído causaram a expressão de genes dependentes de Nrf2 em culturas neuronais corticais primárias de camundongos (FISCHEDICK et al., 2013). O éster de tigliano, diterpeno de *Aleurites fordii*, a uma concentração de 8 µg/mL induziu aumento de IFN-γ em células NK92 (PEI et al., 2012). Além disso, demonstrou-se que os diterpenoides tricíclicos de clerodano bioativos exercem uma ação antiproliferativa conduzindo à apoptose em várias células tumorais derivadas de humanos e camundongos (SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010 e 2014).

Figura 5. Alguns diterpenos com atividade antitumoral.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

A quimioterapia é um dos tratamentos mais comuns para o câncer de várias origens. No entanto, é bem conhecido que a terapia com substâncias químicas que destroem células cancerosas também podem atuar em células normais, o que poderia resultar no desenvolvimento de um novo câncer induzido por essa terapia. Atualmente são utilizadas várias estratégias, entre as quais a segmentação celular. No entanto, por ser uma técnica onerosa, os cientistas farmacêuticos estão concentrados em outros campos, como a carga natural do produto. Os diterpenos fruticulina C, 7a-metoxi-19-acetoxi-roiletanona, 7a,19-diacetoxi-roiletanona e 7-dehidróxi-conacitona exibem atividade quimiopreventiva (IC_{50} : 0,06-59,5 μ M), pela atividade de indução da quinase redutase e histona desacetilase (GIACOMELLI et al., 2013), enquanto a isocoronarina D, a metoxicoronarina D, a etoxcoronarina D, o benzoato de eugenol agiram via inibição do fator nuclear-kappa-B (NF-kB), ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e COX -2 (IC_{50} : 0,9-57,6 μ M) (ENDRINGER et al., 2014).

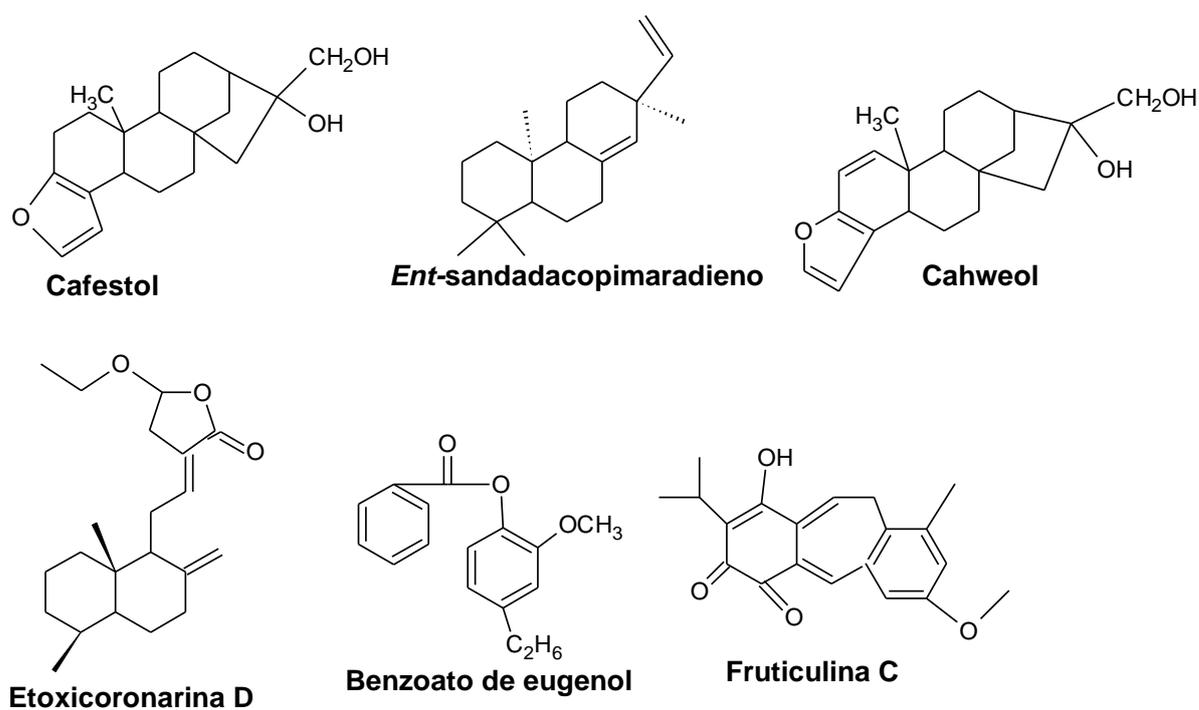
Outros diterpenos, tais como os equinocais H-U exibem atividade inibidora de NF-kB (MITSUI et al., 2015). De outro modo, dois diterpenos de lathyrane em *Euphorbia lathyris* (JIAO et al., 2009) e diterpenos de jatrofano em *Euphorbia dendroides* (PEŠIĆ et al., 2011) exerceram atividade anticancerígena em linhagens celulares de câncer resistentes a múltiplas drogas. A oridonina, um

diterpeno de ent-caurano, isolado de *Isodon rubescens*, mostrou-se ligar diretamente com uma proteína de choque térmico induzível por estresse 70 1A (HSP70 1A). Como resultado, poderia ser usado como um tratamento para a leucemia (PIAZ et al., 2013), mas de forma antagônica, os diterpenos podem ter efeitos antígenotóxicos e/ou antimutagênicos, como discutido no próximo item.

2.2.6 Atividades quimiopreventiva e antimutagênica dos diterpenos

O efeito prejudicial sobre os materiais genéticos é chamado de efeito genotóxico, que quando não reparado pode ser fixado ao DNA. Os OEs como antioxidantes são quimiopreventivos e/ou antimutagênicos, a exemplo do manool, que foi relatado como antígenotóxico em células V79 e HepG2 a 0,5 - 8,0 µg/mL (NICOLELLA et al., 2014). Outros diterpenos também apresentam propriedades antimutagênicas (**Figura 6**) tais como o palmitato de cafestol (0,9 e 1,7 µg/mL), uma mistura de cafestol e cahweol (> 0,3 µg/mL) (MAJER et al., 2005) e beiereno, ent-sandaracopimaradieno, ent-caur-16-eno e 16-hidroxi-ent-caureno (ZHAN et al., 2015).

Figura 6. Diterpenos com atividades quimiopreventiva e/ou antígenotóxica/antimutagênica.

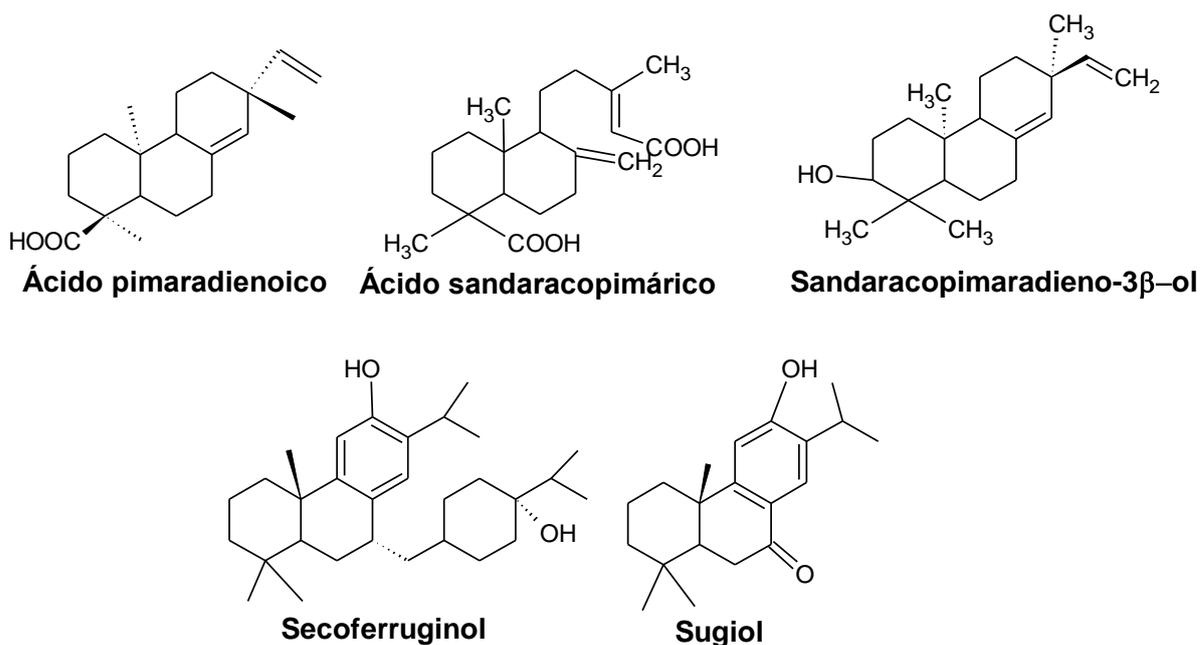


Fonte: ISLAM et al., 2016a.

2.2.7 Efeitos dos diterpenos no sistema imunológico

Os efeitos sobre o sistema imunológico é outro fator importante a considerar para qualquer droga designada para consumo humano. Vários diterpenos foram identificados como tendo potencial imunoestimulador em vez de imunossupressor, bem como anti-inflamatórios (**Figura 7**). Os diterpenos, sugiol e secoferruginol (10 μM cada) modularam a função imunológica humana (produziram grandes quantidades de IL-4 e liberaram pequenas quantidades de IFN- γ), de uma forma que favorece a polarização das células TH-2 (TAKEI et al., 2007); enquanto o ácido sandaracopimárico e o sandaracopimaradieno-3 β -ol (0,1-10 μM cada) produziram grandes quantidades de IFN- γ e liberaram pequenas quantidades de IL-4, dependendo da secreção de IL-12 (TAKEI et al., 2008). De outro modo, o ácido pimaradienoico, isolado de *Aralia cordata*, produz resposta celular através da expressão de mRNA de Cyp26a1 e ativação de RAR em células HepG2 (TANABE et al., 2014).

Figura 7. Alguns diterpenos relatados como anti-inflamatórios e imunoestimuladores.



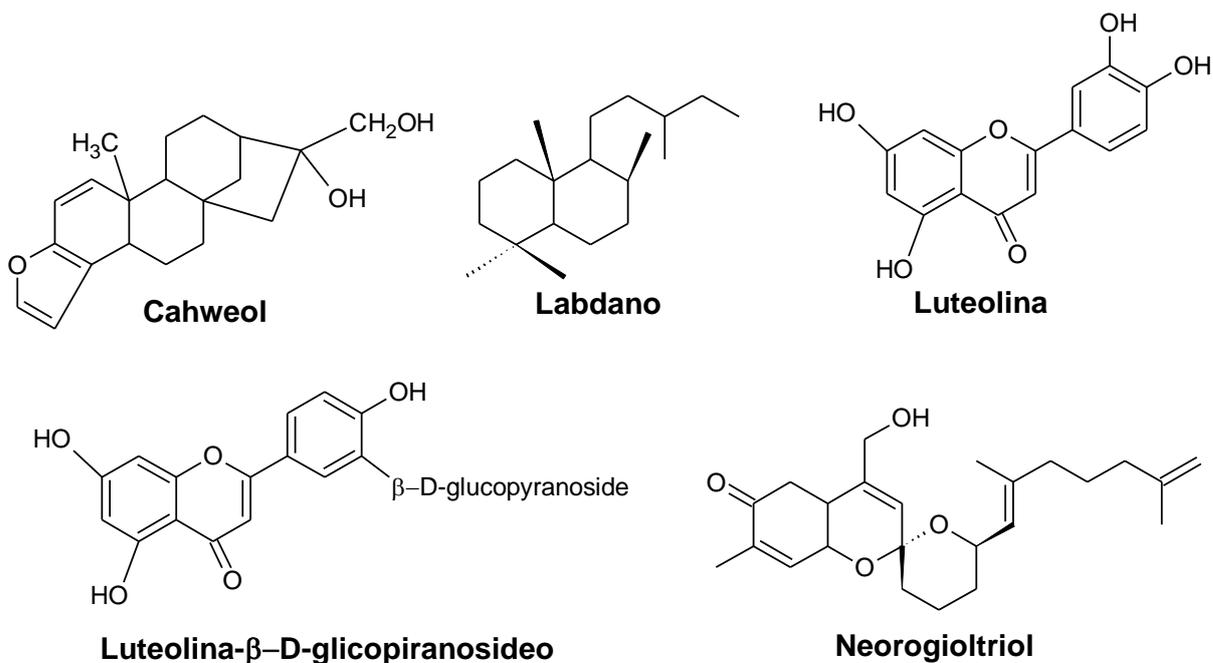
Fonte: ISLAM et al., 2016a.

2.2.8 Efeito antinociceptivo dos diterpenos

Alguns diterpenos com atividades antinociceptiva estão apresentados na **Figura 8**. O composto neorogioltriol, isolado de *Laurencia glandulifera*, numa dose de 62,5 μM , reduziu a produção de óxido nítrico e COX-2, bem como a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em células Raw264.7 (CHATTER et al., 2009). Enquanto que a luteolina tem atividade antinociceptiva através da via mediada

por ácido gama aminobutírico-A (GABAA) (HE et al., 2012). Cahweol, os conhecidos componentes do café, também exibiram efeitos antinociceptivos periféricos em ratos *Wistar* machos (GUZZO et al., 2015). O FIT também apresenta atividade antinociceptiva (ISLAM et al., 2015).

Figura 8. Diterpenos com atividade antinociceptiva.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

2.2.9 Diterpenos no sistema cardiovascular (SCV)

Em ratos *Wistar*, os diterpenos labdanos produziram proteção proteica para o SCV através de uma via de ativação independente da proteína quinase B (AKT/PKB) (CUADRADO-BERROCAL et al., 2015). Os diterpenos neo- e ent-clerodano (30, 100 e 300 μM) agem via bloqueio dos canais de cálcio dependentes da voltagem (GARCIA et al., 2014). Efeitos contrários foram observados para os diterpenos do tipo caurano e pimarano, que produziram atividade inibitória na contratilidade vascular (AMBROSIO et al., 2006); e o trans-dehidrocrotolina (5, 10 ou 15 mg/kg, iv), que inibiu a produção de NO• em ratos (SILVA et al., 2005). O 3,7,10,14,15-pentaacetil-5-butanoil-13 e o 17-epóxi-8-mirsinene, isolado de *Pycnocyclus spinosa*, têm atividade antiespasmódica (valores de IC₅₀ de 0,062 ± 0,011 μM) em ratos (GHANADIAN et al., 2014). Os diterpenos isolados de *Aconitum napellus* exibem atividade de bloqueio do canal de potássio, que são seletivos na expressão nos átrios, sugerindo ferramentas úteis no tratamento de arritmias ventriculares graves, como fibrilação ventricular e morte cardíaca súbita (KISS et al., 2013).

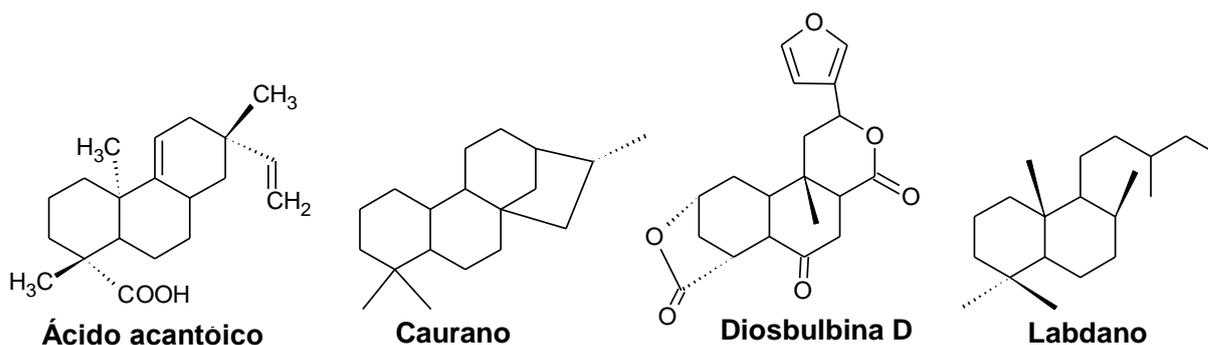
2.2.10 Diterpenos em lipidemia

Três novos diterpenos isolados de *Premna tomentosa* possuem atividades antioxidantes *in vitro* por mecanismos associados à captura de radicais livre, como DPPH• e também por produzirem atividade de α -glucosidase (AYINAMPUDI et al., 2012). Por outro lado, o 16 α -hidroxiciclododeca-3, 13 (14) Z-dien-15, 16-olida *Polyalthia longifolia*, numa dose de 50 mg/kg/dia, durante 8 semanas, em ratos C57BL/6, apresentou atividades antiadipogênicas e antiobesidade (BEG et al., 2015).

2.2.11 Diterpenos no sistema hepático

O ácido acantoico a 20 ou 50 mg/kg inibiu a expressão de α -SMA estimulada por TGF- β , aumentou a expressão de LXR β em ratos induzidos com tetracloreto de carbono e estimulou o fator hepático de crescimento tumoral β (TGF- β) em células estreladas (HSCs) (BAI et al., 2014). A diosbulina D pode aumentar as biomoléculas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST), cobre-zinco-superóxido dismutase (CuZn-SOD), manganês-superóxido dismutase (Mn-SOD) e catalase (CAT) em ratos (MA et al., 2011). Como a principal função do antioxidante é a citoproteção, a diosbulina-D pode agir através de hepatoprotetividade mediada por proteção antioxidante. Outros diterpenos também apresentam atividades hepato, cardio e neuroprotetoras (**Figura 9**).

Figura 9. Diterpenos com atividade hepato-/cardio-/neuroprotetoras.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

2.2.12 Diterpenos como agentes neuroprotetores

Exemplos de alguns diterpenos com funções neuroprotetoras são o linearol e sidol (GONZÁLEZ-BURGOS et al., 2014), diterpenos de labdano (XU et al., 2011) e (16R) -16,17,18-trihidroxifilocladan-3-ona e (16R) -16,17-di-hidroxifilocladan-3-ona (WASOWSKI; MARDER, 2011). Os diterpenos com

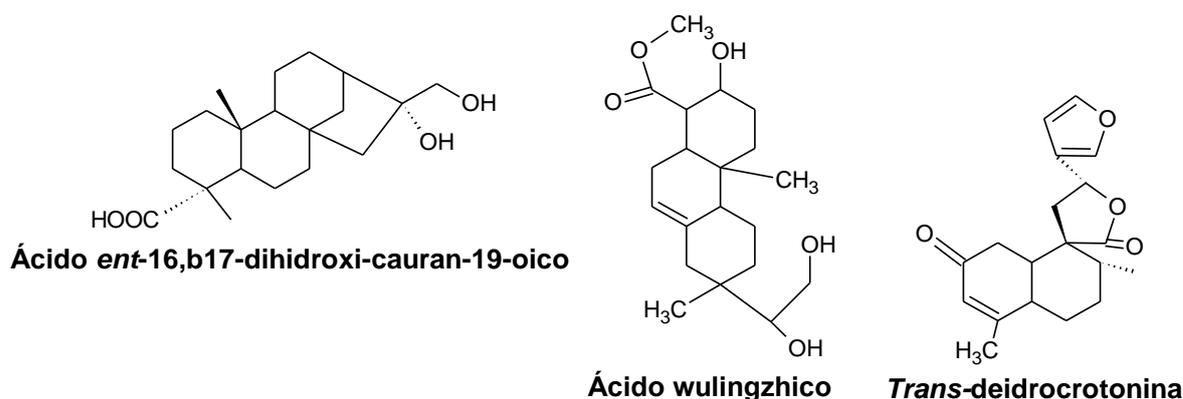
potenciais antioxidantes são também capazes de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-18, COX-1, COX-2, prostaglandinas, malonaldeído e lipoperoxidase, com aumento de GPx, GSH, GST e CAT, que conferem potencial de neuroproteção (ISLAM et al., 2016a).

Os diterpenos isolados de *Curcuma kwangsiensis* (SCHRAMM et al., 2012), ginkgolida B (WU et al., 2013) e ácido carnósico (AZAD et al., 2015) são evidentes pelo seu potencial neuroprotetor. O FIT também apresenta atividades ansiolíticas, antidepressivas e antiepilépticas. Todas essas atividades são associadas às suas potencialidades antioxidantes. Estes diterpenos podem ser direcionados para pacientes com doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP) (ISLAM et al., 2015 e 2016a). Diterpenos podem atuar na isquemia cerebral (WU et al., 2013), dor neuropática (HU et al., 2012) e neuroinflamação (JUNG et al., 2009).

2.2.13 Diterpenos com atividade trombolítica/antiplaquetária

Um coágulo dentro do vaso sanguíneo é denominado de trombose, que pode obstruir a passagem de sangue, nutrientes, fármacos ou outras micro/macromoléculas para atender às demandas de tecidos e células. É também uma das principais causas de choque e insuficiência cardíaca congestiva. A agregação plaquetária é outro fenômeno obstrutivo. Os diterpenos isolados de *Trogopterus xanthipes* e *Siegesbeckia pubescens* mostraram atividades antiplaquetárias e antitrombóticas em roedores (YANG et al., 2010; WANG et al., 2011). Alguns exemplos de diterpenos com atividades antiplaquetárias, antitrombóticas e vasorelaxantes estão apresentados na **Figura 10**.

Figura 10. Diterpenos com atividades antiplaquetária, antitrombótica e vasorelaxante.



Fonte: ISLAM et al., 2016a.

2.2.14 Outras atividades dos diterpenos

Algumas outras propriedades, como antialérgica (TANG et al., 2009), antitoxina (CHEENPRACH et al., 2006; MOURA et al., 2011), antiasmática (CHO et al., 2010) antiparasita endógeno (REINA et al., 2011) e antiangiogênica (WANG et al., 2012), também foram relatadas para os diterpenos.

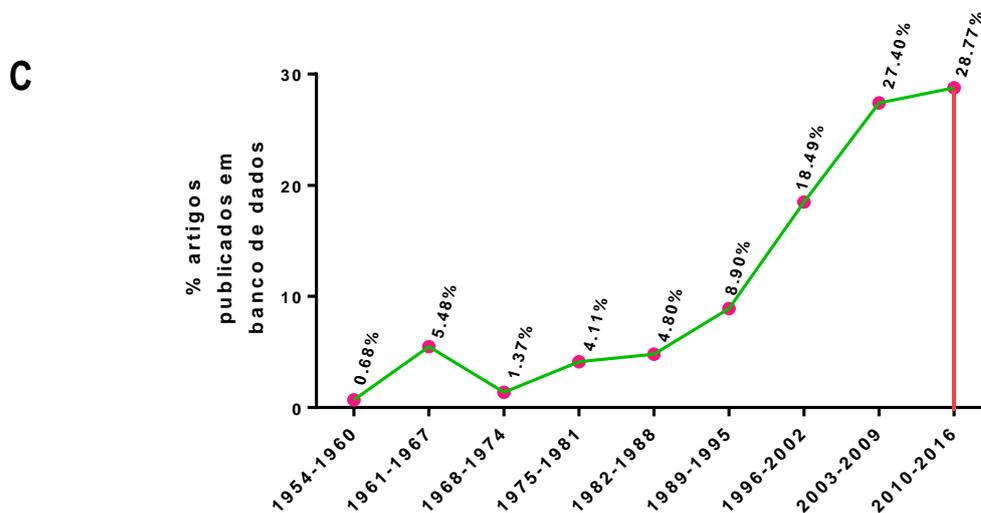
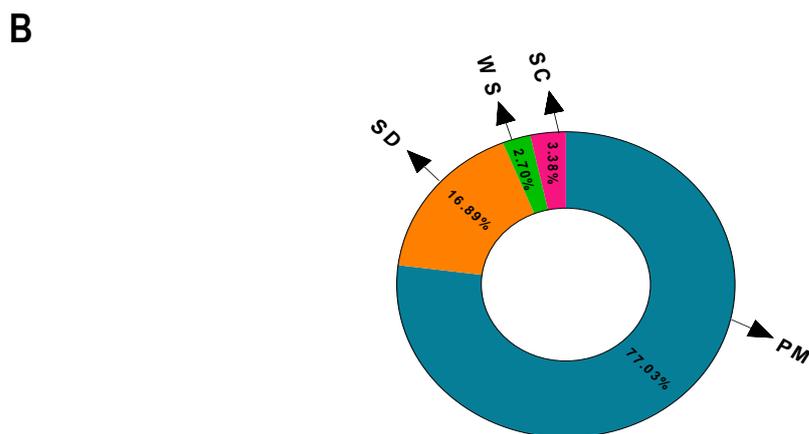
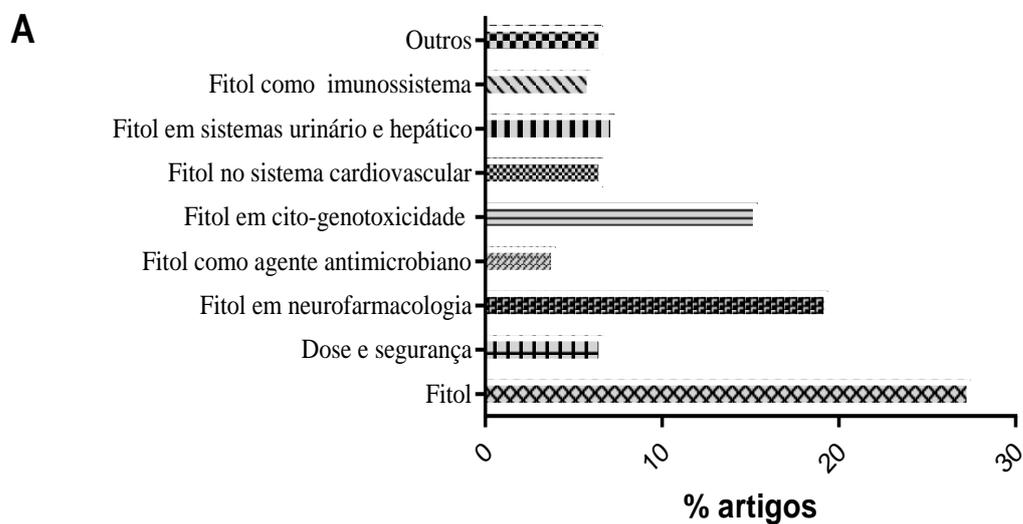
2.3 Fitol

O FIT (3,7,11,15-tetrametil hexadec-2-en-1-ol) é um isoprenoide caracterizado por ser um álcool acíclico de cadeia longa e ramificada, constituinte da molécula da clorofila (BLANKENSHIP, 2002) e é amplamente distribuído em algas (XIAO; YUAN; LI, 2013; ISHIBASHI et al., 2014) plantas, bactérias, especialmente cianobactérias (JUDAH; BURDICK; CARROLL, 1954; HANSEN, 1980; RONTANI; VOLKMAN, 2003; VAVILIN; VERMAAS, 2007; SCHOUTEN et al., 2008), presentes no intestino dos animais ruminantes (HANSEN, 1960) e em produtos derivados do leite e de pescados (BROWN et al., 1993). Quimicamente, o FIT é um diterpenoide (fórmula química: $C_{20}H_{40}O$, peso molecular 296,54 g/mol, densidade 0,8533 g/cm³, ponto de ebulição 132-202°C, índice de refração: 1,460-1,466, pressão de vapor: <0,001 mmHg a 20°C e solubilidade em água: 0,00327 mg/L a 25°C) (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

Através de prospecção científica e tecnológica do FIT, a partir de artigos publicados (**Figura 11**) e patentes (**Figura 12 e 13**), em diferentes bases de dados, foi possível evidenciar diversas atividades biológicas/farmacológicas deste diterpeno. Dentre os 149 artigos e 62 patentes, 27,52% de artigos e 87,09% patentes estavam relacionadas com o tópico de busca FIT, suas fontes, síntese e metabolismo; seguida por 15,44% e 14,77% acerca do FIT com citotoxicidade, câncer, mutagenicidade, teratogenicidade e FIT em doenças neurológicas, respectivamente.

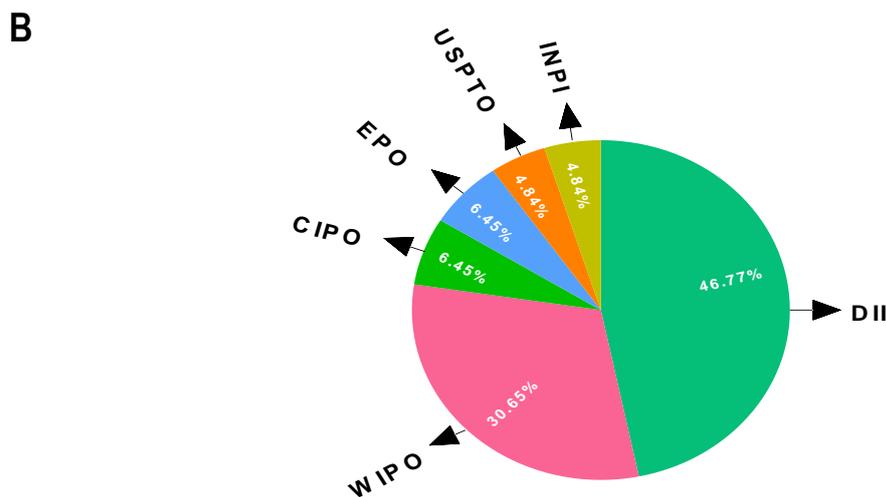
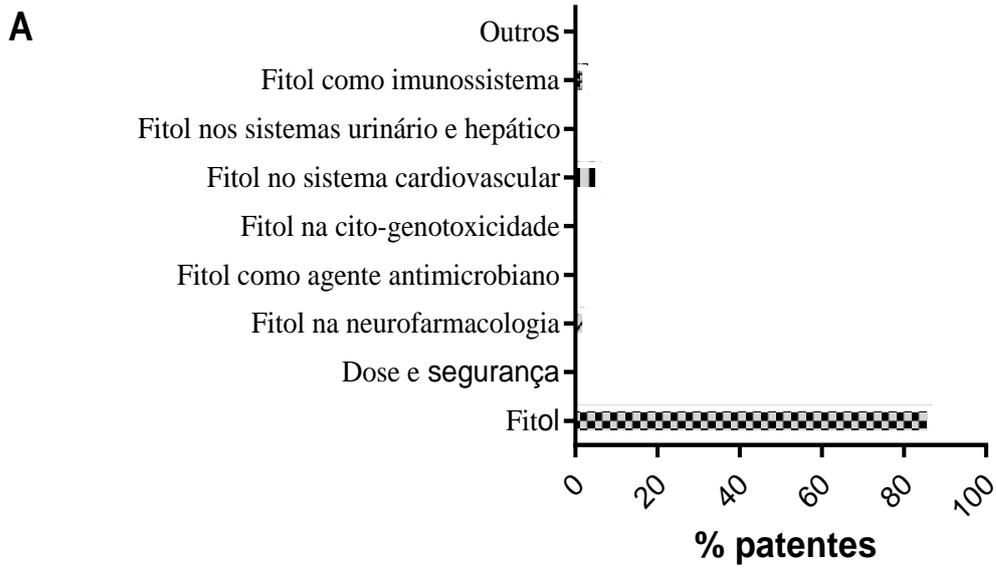
Do ponto de vista farmacêutico, o FIT e os seus derivados têm apresentado propriedades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, não mutagênica, antiteratogênica, antibiótica-quimioterapêutica, antidiabética, hipolipemiante, antiespasmódica, anticonvulsivante, antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica, antidepressiva, adjuvante imunológico, facilitador do crescimento de cabelo, defesa contra queda de cabelo e atividade anticaspa. O biometabólito importante do FIT é o ácido fitânico (AF). As evidências mostram que AF tem atividade citotóxica, anticancerígena, antidiabética e hipolipemiante. Além disso, pode ser considerado um biomarcador importante para algumas doenças, como a doença de Refsum, a síndrome de Sjögren-Larsson, a condrodisplasia punctata rizomélica, polineuropatia crônica, doença de Zellweger e doenças relacionadas. Assim, o fitol pode ser considerado um candidato a fármaco.

Figura 11. Compilação dos dados da prospecção científica. A: Artigos examinados em tópicos de busca; B: Artigos observados em bases de dados por porcentagem; C: Distribuição de artigos para o período de 1954 e 2015. PM: *PubMed*; SD: *Science Direct*; WS: *Web of Science*; SC: *Scopus*.



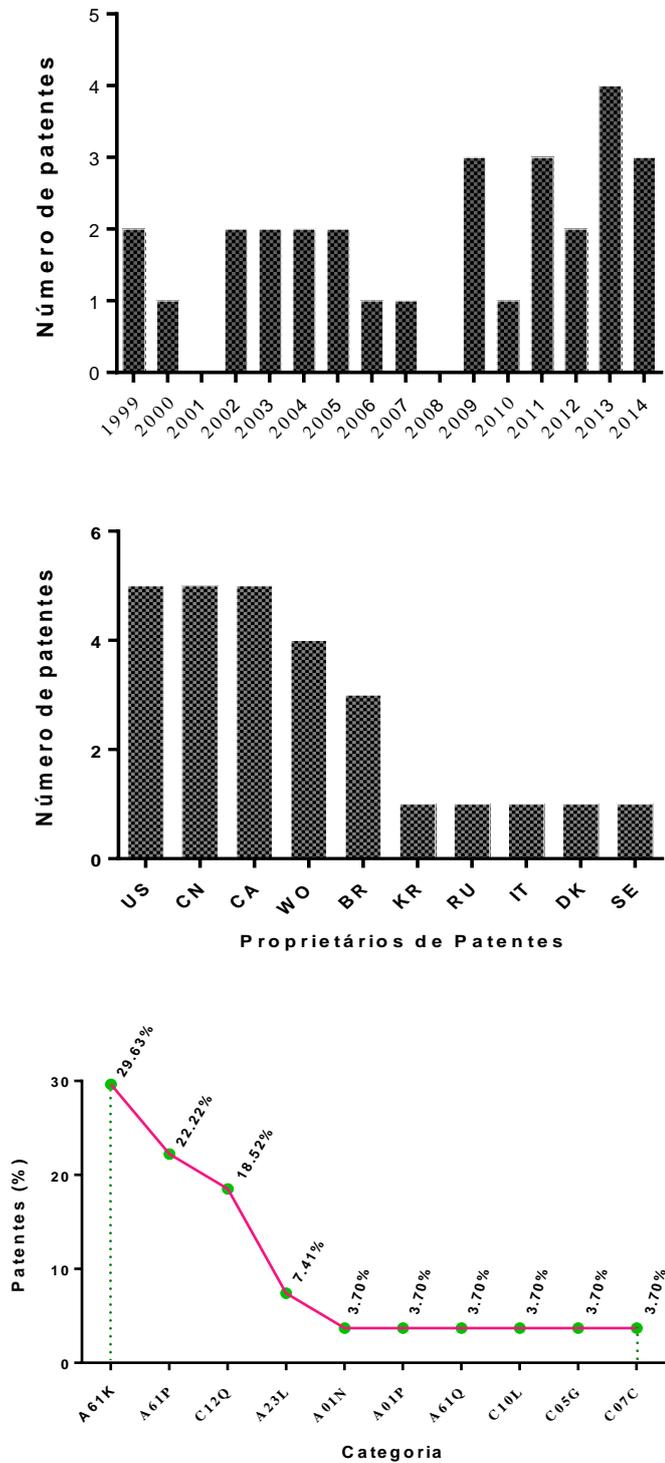
Fonte: ISLAM et al., 2015.

Figura 12. Prospecção tecnológica para o fitol. A: Patentes examinadas em tópicos de busca; B: Patentes observadas em bases de dados em percentagem. DII: Índice de Inovação Derwent®; WIPO: Organização Mundial de Propriedade Intelectual; CIPO: Organização Canadense de Propriedade Intelectual; EPO: Escritório Europeu de Patentes; USPTO: Organização de Propriedade Intelectual dos Estados Unidos; INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial.



Fonte: ISLAM et al., 2015.

Figura 13. Distribuição de patentes sobre o fitol, considerando o ano e país de origem. A: Patentes encontrados de 1999 a 2014 em tópicos de busca; B: País de origem da patente; C: Categoria de patentes observadas. US: Estados Unidos; CA: Canadá; CN: China; WO: PCT; BR: Brasil; KR: Coreia do Sul; RU: Rússia; IT: Itália; DK: Dinamarca; SE: Suécia.

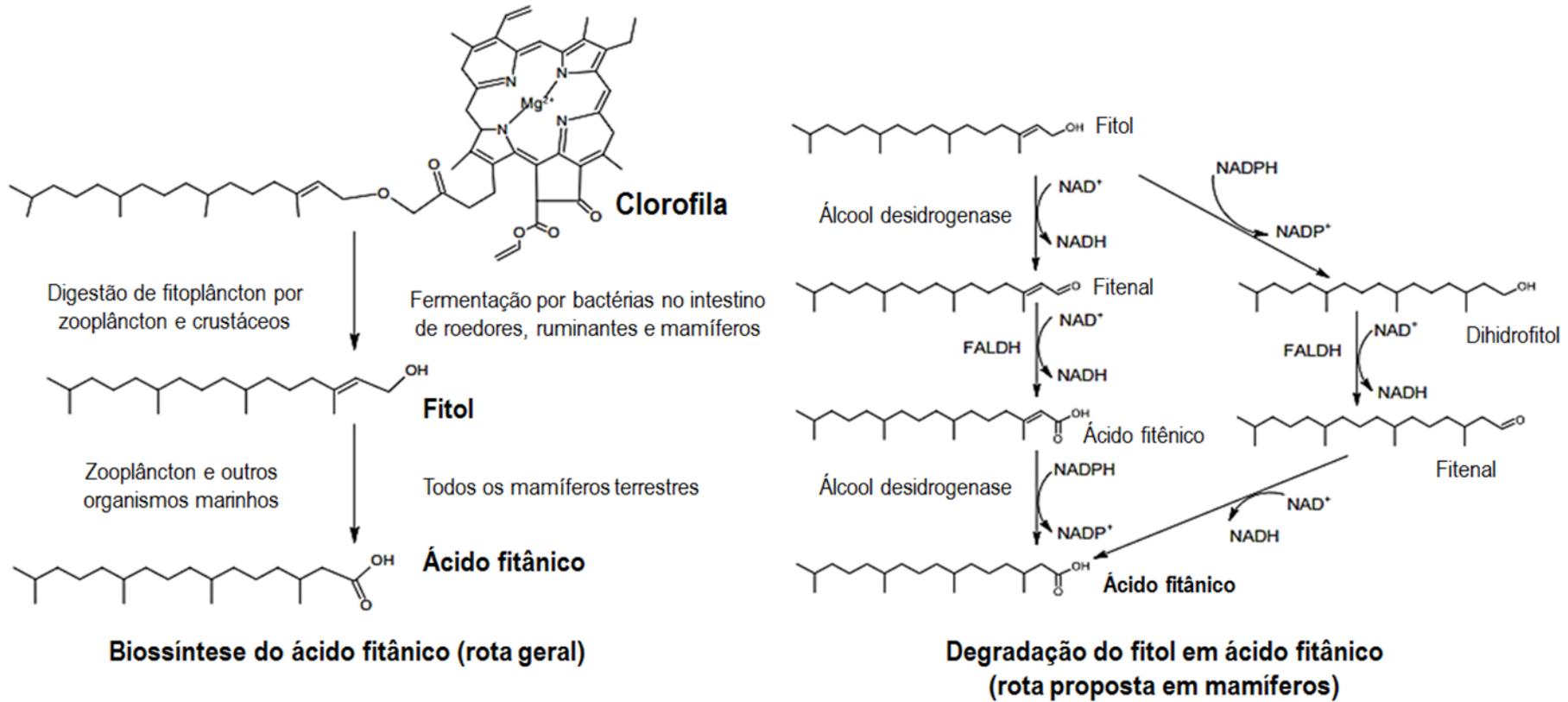


Fonte: ISLAM et al., 2015.

2.3.1 Biossíntese e metabolismo do fitol

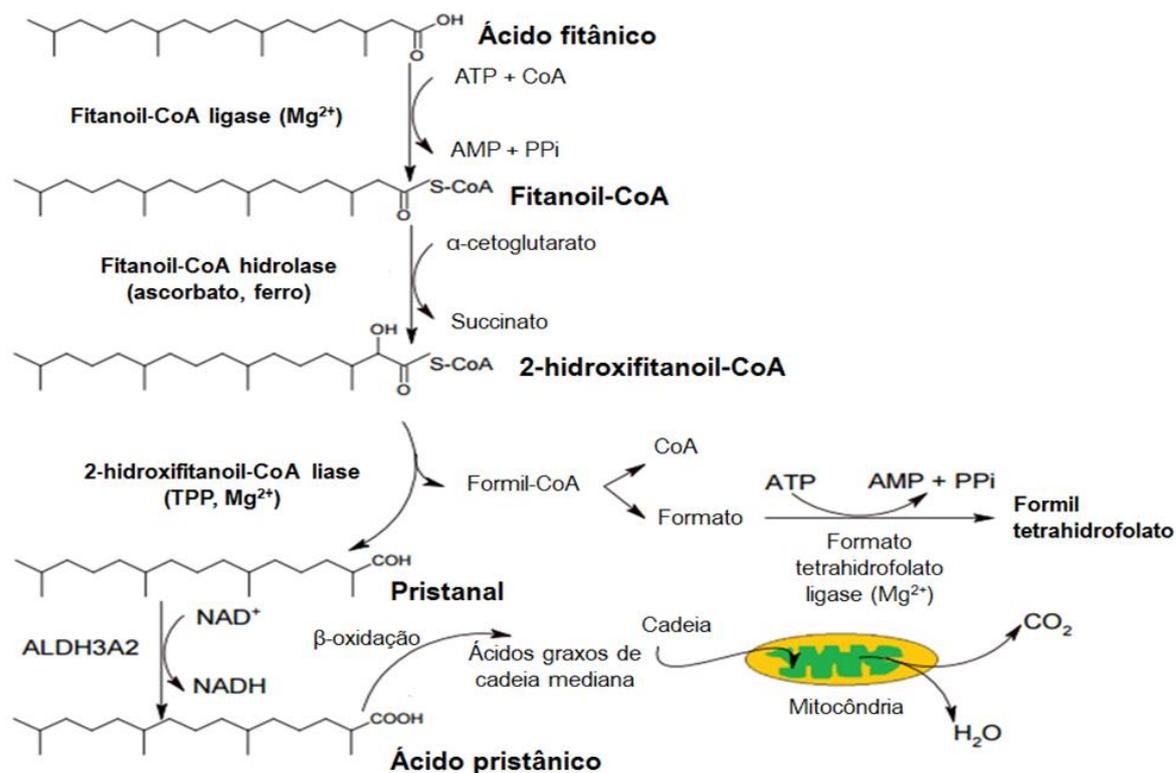
A biossíntese do FIT ocorre tanto por meio da via do ácido mevalônico (VAVILIN; VERMAAS, 2002; ECKHARDT; GRIMM; HORTENSTEINER, 2004; BOUVIER; RAHIER; CAMARA, 2005) como pelo 2-C-metileritritol-4-fosfato (RATLEDGE; WILKINSON, 1990; SCHOUTEN et al., 2008). Os caminhos para a biossíntese do fitol e de seus derivados estão apresentados nas **Figuras 14, 15, 16 e 17**. Existem relatos de que ovelhas tratadas com 4 mL de solução de etanol a 14% (14 [FIT]), em biópsias revelaram FIT no fígado após 96h, no pulmão após 24 e 120h, bem como em gordura, adrenal, baço, coração e músculos. No entanto, em ratos tratados com 0,5 mg de (14 [FIT]) em 0,5 mL de óleo de milho, o diterpeno foi encontrado em 43,9%, 33,1%, 3%, 1% e 0,6% em teores fecais/intestinais, linfa, CO₂ expirado, urina e fígado, respectivamente após 24h. Em contraste, 80% de FIT inalterado foi encontrado no plasma de camundongos alimentados com 2% de FIT após 48h de administração (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

Figura 15. Vias de biossíntese do ácido fitânico. FALDH: aldeído desidrogenase saturada; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídico fosfato oxidada; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida.



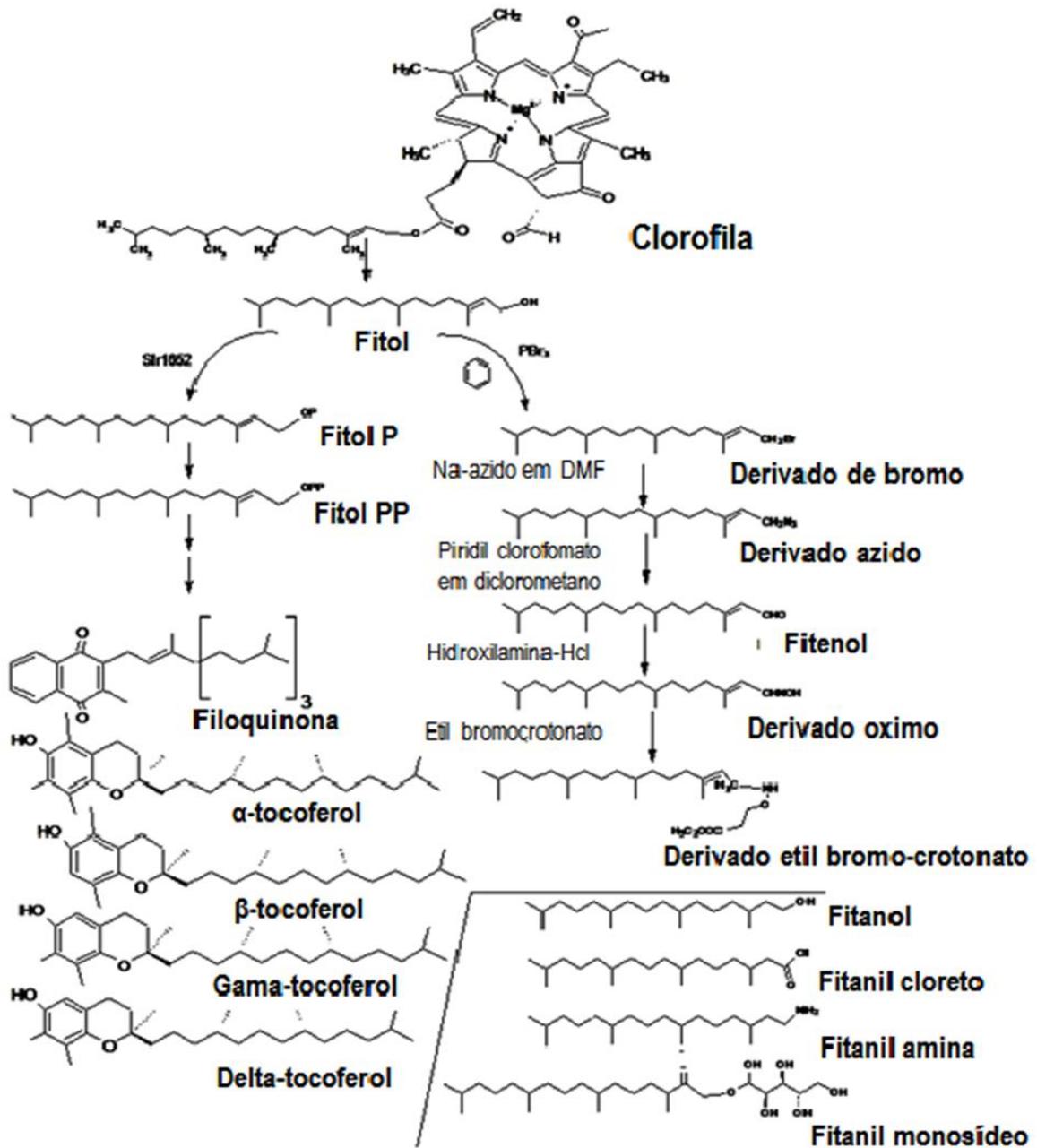
Fonte: ISLAM et al., 2015.

Figura 16. Via do metabolismo do ácido fitânico. TPP: Tiamina Pirofosfato; Pi: Fosfato inorgânico; ALDH3A2: Aldeído desidrogenase saturado; ATP: Adenosina trifosfato; AMP: Adenosina monofosfato; CoA: Co-enzima-A; PPI: Fosfato inorgânico.



Fonte: ISLAM et al., 2015.

Figura 17. Derivados do fitol (laboratório). Slr1652: isogênico *Synechocystis* sp; DMF: componente de reagente de Vilsmeier.



Fonte: ISLAM et al., 2015.

2.3.2 Propriedades biológicas do fitol

2.3.2.1 Indicações toxicológicas do fitol

Dados toxicológicos agudos revelaram que o FIT é bem tolerado em roedores (CHOI et al., 1993; ATSHAVES et al., 2004; SAIKIA et al., 2010). Para ratos albinos e normais, a DL₅₀ foi calculada acima de 5 g e 10 g, respectivamente (RIFM, 1977 e 1978). O FIT, em aproximadamente 250 mg/kg (10 mg/kg de peso corporal/dia), provocou alterações histopatológicas com lesões no fígado, ruptura do cordão hepático e pequenas áreas multifocais de necrose nos hepatócitos, com infiltração precoce de células inflamatórias em camundongos machos e fêmeas (C57BL/6J) (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). Além disso, o FIT foi considerado não mutagênico em *Salmonella typhimurium* (TA100), nas doses de 5,0 a 0,1% e antiteratogênico em 500 mg/kg em camundongos (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

2.3.2.2 Atividade antimicrobiana do fitol

O FIT apresenta atividade contra *Salmonella typhimurium* (ATSHAVES et al., 2004) e *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2005). Possui efeito antitripanossomal (IC₅₀: 19,1 µg/mL, em *Trypanosoma brucei*) (BERO et al., 2013) e antiesquistossomose (50, 75 e 100 µg/mL) (MORAES et al., 2014). Pejín e colaboradores (2014) demonstraram atividade antimicrobiana do FIT contra oito bactérias e oito espécies fúngicas, com MIC de 0,003-0,038 mg/mL e MBC de 0,013-0,052 mg/mL, MIC 0,008-0,016 mg/mL e MFC 0,090-0,520 mg/mL.

2.3.2.3 Atividade citotóxica do fitol

No ensaio MTT (*in vitro*), o FIT tem atividade citotóxica frente a sete células tumorais (adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de próstata PC-3, HL (leucemia), HT-29, A-549, Hs294T e MDA-MB-231) e uma célula normal de fibroblasto pulmonar (MRC-5), com citotoxicidade demonstrada em IC₅₀ de 8,79 ± 0,41 µM a 124,84 ± 1,59 µM (PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC, 2014).

2.3.2.4 Efeitos antitumoral, antimutagênico e antiteratogênico do fitol

Os estrogênios desempenham um papel crucial na fisiologia normal (HELDRING et al., 2007). A exposição exagerada a esse hormônio pode causar câncer de mama, ovário e endométrio (BULUN et al., 2005). A enzima aromatase cataliza a biossíntese de estrogênio (SIMPSON et al., 2002). De acordo

com GUO e colaboradores (2014), o trans-FIT atua como inibidor da aromatase corroborando com seu potencial anticancerígeno (IC₅₀: 1 µM), embora anteriormente o FIT tenha manifestado ser antimutagênico (120 mg/kg, v.o), especificamente por ativação da proteína p38 com ação na atividade da proteína quinase C (PKC) (KAGOURA; MATSUI; MOROHASHI, 1993); antiteratogênico (500 mg/kg, po e 100 mg/kg, v.o) com os efeitos inibitórios sobre os receptores RAR e RXR, para que os ácidos retinoicos se liguem de forma precisa e produzam efeitos teratogênicos em uma grande variedade de animais (ELMAZAR; NAU, 2004; TANG et al., 2007). Como antitumoral existem diversos relatos em ratos (LISKA et al., 2002; WALSH, 2004; THORNBURG et al., 2006; WRIGHT et al., 2012; HELLGREN, 2014). Há também evidências de sua ação frente ao câncer de próstata devido a níveis elevados de ácido fitânico, mas a conclusão é um pouco controversa (PRICE et al., 2010; WRIGHT et al., 2014; HELLGREN, 2014; KATARIA et al., 2015).

2.3.2.5 *Fitol como adjuvante imunológico*

Um dos populares e bem conhecidos suplementos imunitários são as vacinas, cuja eficácia depende, principalmente, do uso de antígeno(s) específico(s) e potencial(is) adjuvante(s). Recentemente, alguns derivados de FIT, nomeadamente: fitanol (40 mg/kg, i.p), fentolamina (2,5 e 5 mg/kg, i.p), fitanil manósido (2,5 e 5 mg/kg; i.p) 44 mg/kg, i.p) (AACHOUI et al., 2011a, b) e cloreto de fentanilo (44 mg/kg, i.p) (JELLUM; TRY, 1966; BAYLOR; EGAN; RICHMAN, 2002; GHOSH, 2005 e 2006; LIM et al., 2005, 2006 e 2007; GHOSH, 2012; CHOWDHURY; FITCH; GHOSH, 2013) demonstraram apresentar potenciais de imunovigilância em camundongos albinos isogênicos (mutantes). Existe uma demonstração de fitanol e fitanil manosídeo em aumentar as respostas dos anticorpos IgG1 e IgG2a, com aumento dos efeitos apoptóticos/necróticos em células tumorais alvo (AACHOUI et al., 2011b). Além disso, foi demonstrado que um derivado aldeído do fitol ((2E, 7R, 11R) -3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol) apresentou efeito farmacológico por meio da bomba de efluxo dependente de ATP (UPADHYAY et al., 2014).

2.3.2.6 *Fitol em diabetes mellitus insulino-dependente*

As tiazolidinedionas, comumente usadas no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2, atuam, principalmente, como sensibilizadores da insulina ativando receptores nucleares PPARs, seletivamente o subtipo PPAR γ (SPIEGELMAN, 1988). O FIT é transportado para o fígado, onde é metabolizado enzimaticamente para ácido fitânico (VAN DEN BRINK, 2005 e 2004). O FIT e o ácido fitânico estão relacionados com a ativação de PPARs (BERNHARD; MAIER; RITZEL, 1967; MCCARTY, 2001; HEIM

et al., 2002; ELMAZAR; NAU, 2004; GLOERICH et al., 2007; SCHAALAN et al., 2009; CHE et al., 2013; ELMAZAR et al., 2013) e RXR, que são responsáveis por ativar GLUT2 e mRNA de glucoquinase. Assim, ocorre a facilitação para o influxo de glicose hepática. Além disso, agonistas de RXR podem aumentar a expressão e translocação de GLUT4 em adipócitos, e o catabolismo de glicose, juntamente com a diminuição da produção de glicose hepática, o que demonstra atividade antidiabética (SCHAALAN et al., 2009; ELMAZAR et al., 2013). Além disso, há uma postulação de melhorar o perfil de glicose aumentando a sua captação hepática e diminuindo a gliconeogênese, suprimindo a produção de glicose hepática, mobilizando lipídios do músculo, aumentando a sensibilidade muscular à insulina, a partir da administração de FIT em dose oral de 250 mg/kg em ratos (SCHAALAN et al., 2009).

2.3.2.7 Fitol como mediador na redução de lipídios

Entre os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs), a forma alfa (PPAR α) é um fator de transcrição indispensável para a regulação do metabolismo lipídico (BERNHARD; MAIER; RITZEL, 1967; BRAISSANT; WAHLI, 1998). Embora os camundongos isogênicos alimentados com FIT (50 μ M) apresentassem aumento de fosfolípeos no fígado (PICCININI, 1962), ele exibe atividade na diminuição lipídica devido à sua interação com PPARs (TAKAHASHI et al., 2002a, b e 2003; GOTO et al., 2005; HOLMDAHL; HULTQVIST; OLOFSSON, 2009; OLOFSSON; HULTQVIST; HOLMDAHL, 2010; PETER, 2014).

2.3.2.8 Atividades neurofarmacológicas do fitol

Epilepsia e ansiedade são dois distúrbios neurológicos bastante conhecidos. Por suas atividades antiepiléptica (25, 50, 75 mg/kg; i.p) (COSTA et al., 2010), antinociceptivo (25, 50, 100 e 200 mg/kg; i.p) (SANTOS et al., 2013), antidepressivo (COSTA et al., 2011) e ansiolítico (25, 50 e 75 mg/kg; i.p) (COSTA et al., 2014), o FIT tem comprovadas atividades neurofarmacológicas em roedores, por sua possível ação mediada pelo receptor GABA, embora o mecanismo exato ainda não esteja esclarecido (COSTA et al., 2010 e 2014). Além disso, o FIT também apresentou atividade antiespasmódica (PONGPRAYOON et al., 1992).

2.3.2.9 Atividades antioxidante e anti-inflamatória

Foi relatado que o fitol possui efeito antioxidante *in vitro* pela eliminação de radical hidroxila (OH), radical ânion superóxido (25, 50, 100 e 200 mg/O $_2^{\bullet-}$), radicais metóxi (radical CH $_2$ O $^{\bullet-}$), radicais aniônicos

de dióxido de carbono, radicais de óxido nítrico e DPPH• (PEJIN et al., 2014). Além disso, possui atividade anti-inflamatória (7,5, 25, 50 e 75 mg/kg) em modelos com ratos (SILVA et al., 2014).

2.3.2.10 Fitol na fisiopatologia

O ácido fitânico, derivado do FIT, juntamente com o seu produto de α -oxidação, chamado ácido pristânico (AVIGAN et al., 1966; ELDJARN; TRY; STOKKE, 1966), ficam acumulados em pacientes que sofrem de doença renal (JANSEN et al., 2002; MUKHERJI et al., 2002), SSL (WILLEMSSEN et al., 2004; VAN DEN BRINK et al., 2004), CDPR (STOKKE et al., 1986; SKJELDAL et al., 1987; HOEFLER et al., 1988; TEN BRINK et al., 1991; SCHÖNFELD; KAHLERT; REISER, 2004), polineuropatia crônica com encurtamento bilateral das falanges proximais e lctiose (YAMAMOTO et al., 1995), ataxia progressiva e disartria (CLAYTON et al., 1996), DR infantil, DX ou adrenoleucodistrofia neonatal com incongruências (WISE et al., 1985; BUDDEN et al., 1986; WANDERS et al., 1987; SKJELDAL et al., 1987; WILLEMSSEN et al., 2004) e RBC em macacos (WATKINS et al., 2010). O ácido fitânico vem sendo indicado como um biomarcador importante para os pacientes mencionados (WIERZBICKI et al., 2003; KOMEN; DURAN; WANDERS, 2005; VAN DEN BRINK; WANDERS, 2006; WANDERS; KOMEN, 2007; WATKINS et al., 2010; MOSER et al., 2013).

O FIT pode aumentar os níveis plasmáticos de ácido fitânico (WERNER et al., 2011), o que indica risco aumentado de várias doenças linfomáticas, como linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma não Hodgkin (OLLBERDING et al., 2013) e complicações cardíacas ou mesmo morte cardíaca (YOUNG; JOHNSON; MULLER, 2001; MONNIG et al., 2004). O FIT também está relacionado com a diminuição da respiração mitocondrial e homeostase (SCHÖNFELD; KAHLERT; REISER, 2004; KOMEN et al., 2007; SCHÖNFELD; REISER, 2008; LEIPNITZ et al., 2010; KRUSKA; REISER, 2011; BUSANELLO et al., 2013; NAGAI, 2015), levando ao dano oxidativo (SCHÖNFELD; REISER, 2006; BUSANELLO et al., 2010).

2.3.2.11 Fitol como fonte de energia alternativa

A crise energética progressiva exige mais investigações na busca de fontes alternativas de energia; e os hidrocarbonetos são a primeira seleção. Os terpenoides se tornaram particularmente atraentes neste aspecto porque são abundantes na natureza (BRIESKORN; DÖMLING, 1969). De acordo com Guanyi (2007) e Tracy, Crunkleton e Price, (2010), o FIT possui alto índice de octanas e qualifica muitos dos requisitos como aditivo para gasolina, com potencial para se tornar uma nova fonte de combustíveis para motores. Além disso, há uma série de provas que revelaram o FIT como um auxiliar

sintético essencial de α -tocoferol e seus derivados (HYATT, 1999; AQUINO; BONRATH, 1999; AQUINO; BONRATH, 2000; FABRICE; WERNER, 2000; JEONG-SOO; HEUI-YOUNG; SIJOON, 2002; SIJOON et al., 2002; ODINOKOV et al., 2003).

2.4 Sistemas de vetorização e nanoemulsões

2.4.1 Sistemas de vetorização

Os compostos fenólicos, especialmente os óleos essenciais diterpênicos, são um dos principais micronutrientes em nossas dietas e são evidentes em seus papéis na prevenção de numerosas doenças, incluindo estresse oxidativo, inflamação, câncer, doenças humanas crônicas e doenças neurodegenerativas (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011; ISLAM et al., 2016a). Os fenólicos são principalmente classificados em compostos solúveis em água (por exemplo, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e insolúveis em água (por exemplo, taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos ligados à parede celular) (RAHMANIAN et al., 2014 e 2015). No entanto, a baixa biodisponibilidade de fenóis é a principal limitação de sua aplicação biológica. Portanto, a nanoencapsulação como um sistema de distribuição pode resolver as restrições de fenóis.

A nanotecnologia está se expandindo rapidamente em muitos setores, incluindo alimentos e ciências farmacêuticas (HUANG et al., 2010; NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011). Uma das principais aplicações da nanotecnologia é a nanoencapsulação de compostos bioativos para fins biológicos. Esses processos não só protegem as substâncias bioativas, mas também aumentam a sua biodisponibilidade com a melhoria e aumento da relação superfície-volume, reduzindo o tamanho de partícula (MEHRNIA et al., 2016). As nanopartículas podem também ser preparadas por polimerização de monômeros (SOPPIMATH et al., 2001) e método de polimerização aniônica (SUN et al., 2010). As nanopartículas de biopolímero podem ser fabricadas controlando a montagem de dois biopolímeros diferentes, tais como proteínas e moléculas de polissacarídeo (BOUYER et al., 2012). As nanomicelas poliméricas e os sistemas coloides são aplicados para a nanoencapsulação de fenólicos pouco solúveis em água e anfífilos. Nesta ocasião, é possível utilizar vários polímeros hidrofóbicos biodegradáveis, tais como poli (b-benzil-1-aspartato), poli (ácido dl-láctico) ou poli (e-caprolac) (BAE; KATAOKA, 2009).

Os nanocarreadores são classificados como poliméricos e não poliméricos. As nanopartículas poliméricas biodegradáveis podem ser produzidas a partir de proteínas (tais como proteínas de gelatina e de leite), polissacarídeos (tais como quitosana, alginato de sódio e amido) e polímeros sintéticos (poli (D, Lactídeo), PLA, Poli (D, L-glicolídeo), PLG, poli (lactídeo-co-glicolídeo), PLGA e poli (cianoacrilato) PCA) (JACKANICZ et al., 1973; FARRUGIA; GROVES, 1999). Os métodos comuns utilizados são:

método de evaporação de solventes (SONG et al., 2008), emulsificação/difusão de solventes (REIS et al., 2006), método de gelação iônica (KONECSNI et al., 2012), automontagem (LI et al., 2011), técnica de separação de fase de coacervação (KARTHIKEYAN et al., 2013).

A fabricação de nanomicelas de polímero pode ser feita por métodos físicos e químicos. A conjugação química ocorre pela formação de uma ligação covalente, tal como uma ligação amida, entre grupos específicos dos compostos encapsulados e o polímero hidrofóbico do núcleo. Enquanto o aprisionamento físico de compostos bioativos é geralmente ocorrido pelos procedimentos de diálise ou emulsificação em condições físicas (BAE; KATAOKA, 2009). Alguns exemplos de nanomicelas são: resveratrol com poli-caprolactona (LU et al., 2009), curcumina-nano-micelas preparadas por um método de dispersão sólida em uma etapa com monometil poli (etilenoglicol) -poli (ϵ -caprolactona) (GONG et al., 2013).

Os fenólicos podem ser carregados em nanocristais. Neste último caso, podemos utilizar água, soluções aquosas ou meios não aquosos (por exemplo, polietilenoglicol líquido, óleos) como meio de dispersão (KAKRAN et al., 2012; DAS et al., 2014, PINHO et al., 2014). Os outros nanocarreadores, popularmente utilizados para os nutracêuticos, incluindo os fenólicos, é a caseína, que é uma proteína do leite (HOLT; SAWYER, 1993). As tecnologias de nanoencapsulamento recentes, amplamente utilizadas, incluem: eletrofição (modo: eletricidade para fição) (FORMHALS, 1934), eletropulverização (TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2015) e nanospray (MAHDAVI et al., 2014).

2.4.2 Nanoemulsões

As nanoemulsões são as dispersões líquido-em-líquido cineticamente estáveis com tamanhos de gotículas submicron. Geralmente, as suas gamas de tamanhos conduzem a propriedades úteis tais como elevada área superficial por unidade de volume, estabilidade, aparência opticamente transparente e reologia. Atualmente, as nanoemulsões estão presentes em diversas áreas, incluindo entrega de fármacos, alimentos, cosméticos, fármacos e síntese de materiais (GUPTA et al., 2016). Além disso, nanoemulsões podem ser usadas como blocos de construção para a preparação de materiais mais complexos, como a síntese de polímeros (ASUA, 2002). A homogeneização a alta pressão, a ultrasonografia, a temperatura de inversão de fase, o ponto de inversão da emulsão e algumas abordagens recentemente desenvolvidas, tais como o método de ruptura de bolhas, são comumente utilizadas na preparação de nanoemulsões (GADHAVE, 2014).

As nanopartículas podem também ser preparadas por polimerização de monômeros (SUN et al., 2010). A preparação de nanoemulsões segue tipicamente um processo de dois passos: (i) preparação de macroemulsão através de um método de alta/baixa energia, e (ii) conversão em nanoemulsão. O

método de alta energia é aplicado no caso da preparação de nanoemulsão de tipo óleo/água, enquanto o método de baixa energia para óleo/água (MASON et al., 2006). No entanto, a ruptura de bolhas na interface óleo/água (FENG et al., 2014), a maturação por evaporação (RAO; MCCLEMENTS, 2010) e a microfluidização (FRYD; MASON, 2010) são alguns outros métodos usados na preparação de nanoemulsões. O tamanho das gotas é influenciado pelos surfactantes utilizados. A concentração e o comprimento dos surfactantes são as duas preocupações principais neste contexto. Os tensoativos, utilizados como emulsionantes, reduziram principalmente a tensão interfacial e o tamanho das gotículas. No entanto, podem estabilizar nanoemulsões através de interações eletrostáticas repulsivas e impedimento estérico (MASON et al., 2006).

Os mecanismos comuns de desestabilização das nanoemulsões são: floculação, coalescência, maturação de Ostwald e creme/sedimentação. A seleção do meio de dispersão adequado, tempo de conservação e temperatura são as três principais soluções de problemas de desestabilização das nanoemulsões (RAHN-CHIQUÉ et al., 2012). As nanoemulsões têm vários modos de administração de fármaco no corpo humano, nomeadamente administração tópica, ocular, intravenosa, interna e oral. As nanoemulsões óleo/água aumentam a solubilidade de fármacos lipofílicos na fase oleosa, enquanto que a fase contínua proporciona um ambiente suave, que pode dissolver biopolímeros, tais como alginato, para ajustar a reologia, aparência e textura da formulação (BABOOTA et al. 2007). Algumas outras aplicações de nanoemulsões incluem: ultrassom (RAPOPORT et al., 2011), entrega de materiais alimentares (YUAN et al., 2008), bem como terapêutica (AHMED et al., 2012). O tempo de ultrassons também tem uma influência no tamanho das gotas das nanoemulsões (MASON et al., 2006).

Estes são os principais componentes comumente encontrados em muitas plantas, alimentos e bebidas diferentes. Os fenólicos são, principalmente, classificados em ácidos solúveis em água (por exemplo, fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e compostos insolúveis em água (por exemplo, taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicínâmicos ligados à parede celular) (RAHMANIAN et al., 2014 e 2015).

Os nanocarreadores poliméricos biodegradáveis podem ser produzidos a partir de proteínas (tais como gelatina e proteínas de leite), polissacarídeos (tais como quitosano, alginato de sódio e amido) e polímeros sintéticos (tais como poli (D, lactídeo), poli (L, lactídeo), PLA, poli (D, L-glicolídeo), PLG, poli (lactídeo-co-glicolídeo), PLGA e poli (cianoacrilato) PCA) (JACKANICZ et al., 1973; FARRUGIA; GROVES, 1999). Os métodos comumente utilizados são: método de evaporação de solventes (SONG et al., 2008), emulsificação/difusão de solventes (REIS et al., 2006), automontagem (LI et al., 2011), método de gelificação iônica (KONECSNI et al., 2012), técnica de separação de fase de coacervação (KARTHIKEYAN et al., 2013).

2.5 Genotoxicidade e biomarcadores toxicogenéticos

A genotoxicidade ao material genético é induzida por agentes químicos e/ou físicos que interagem com o DNA, bem como por outros caminhos celulares, podendo ocasionar adutos, quebras de fitas, mutações de ponto e alterações estruturais e numéricas aos cromossomos (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Cabe enfatizar que essas alterações podem iniciar o desenvolvimento do câncer e também ocasionar impactos na fertilidade, contribuir para alterações hereditárias e prejudicar a saúde do ecossistema (SINGH et al., 2009; AHN et al., 2009; BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010). Essas alterações no material genético podem ser detectadas com aplicação de biomarcadores citogenéticos e/ou moleculares.

As análises para detecção de danos ao material genético, geralmente, são realizadas com aplicação de diversos testes não clínicos, em estudos *in vitro* e *in vivo*, a exemplo do teste em *Salmonella typhimurium* (teste de AMES), cometa, micronúcleos, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas e mutações de genes em roedores (AHN et al., 2009). Na avaliação de citotoxicidade, o teste com *Artemia salina*, um minicrustáceo, pode trazer respostas na detecção de estresses celulares em populações humanas (GAJARDO; BEARDMORE, 2012). Compostos químicos que são positivos nos testes citados anteriormente são diretamente reativos ao DNA, levando a mutações como, por exemplo, substituições de pares de bases, o que indica que são, potencialmente, causadores de câncer (KITAGAWA et al., 2015).

As plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos para estudos de monitoramento ambiental e de químicos e agentes biológicos indutores de danos ao material genético. Além de muitas espécies, o *Allium cepa* vem sendo usado na avaliação de danos ao DNA. O teste *Allium cepa* é capaz de avaliar diferentes alterações no material genético com base em marcadores macroscópicos e microscópicos, a exemplo da toxicidade pela inibição de crescimento de meristemas de raízes, das alterações cromossômicas, que vêm sendo identificadas como consequências de danos genotóxicos. Além da possibilidade de detectar efeitos tóxicos, citotóxicos, por alterações no índice mitótico; e mutagenicidade, pela formação de micronúcleos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; YILDIZ et al., 2009; LIMAN et al. 2011). Em raízes de *A. cepa* também é possível aplicar o Ensaio Cometa, em gel de agarose, para evidenciar genotoxicidade, bem como atividades de reparo de DNA (YILDIZ et al. 2009; VENTURA et al., 2013; SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015). Cabe também enfatizar que o teste *A. cepa* tem reconhecida correlação com os resultados em outros sistemas teste em células procarióticas e eucarióticas (FISKESJO, 1985; YILDIZ et al. 2009).

As células, especialmente as eucarióticas, são constantemente confrontadas pela ação de agentes químicos endógenos e exógenos, bem como por agentes físicos que podem ser responsáveis

por alterações genômicas levando a alterações genéticas e/ou mutações que envolvem variações no ciclo mitótico. Assim, os testes com *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe* são importantes para mensurar os mecanismos de alterações na fidelidade de replicação, sensibilidade a lesões no DNA bem como os mecanismos de respostas celulares a esses danos (SKONECZNA; KANIAK; SKONECZNY, 2015).

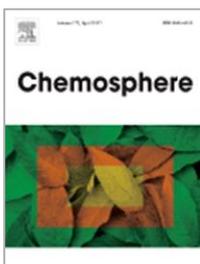
Algumas mutações aparecem de forma espontânea durante os mecanismos moleculares de replicação, durante o metabolismo pela geração de espécies reativas de oxigênio, segregação de cromossomos e por erros durante o ciclo celular. Assim, diferentes tipos de mutações podem ocorrer; dentre elas, as alterações em sequências de DNA e bloqueios da DNA polimerase, mecanismos moleculares que podem ser evidenciados em leveduras, com dados extrapolados para humanos (FORTUNE et al., 2005). A resposta celular a danos oxidante/antioxidante ao DNA desses fungos é semelhante à resposta de células de mamíferos e 30% dos genes relacionados a doenças humanas apresentam genes homólogos funcionais em leveduras (DANI et al., 2008; DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAN, 2015).

Diversos estudos nacionais e internacionais também apontam que os testes para detecção de genotoxicidade apresentam correlações positivas para carcinogenicidade. O Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos são indicados na avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente de forma associada (KANG et al., 2013). O Ensaio Cometa vem sendo aplicado na medicina em estudos de biomonitoramento de patogêneses, incluindo as doenças crônicas, predição de tumores e doenças neurodegenerativas, bem como na avaliação dos níveis de danos e mecanismos de reparo de DNA (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). O princípio básico do ensaio é a migração de fragmentos de DNA durante a eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos migram e formam uma cauda similar ao cometa (TICE et al., 2000; DUSINSKA; COLLINS, 2008). Na sua versão alcalina, pode detectar sítios alcali lábeis, quebras de fitas e danos oxidativos em células eucarióticas e procarióticas (SINGH et al., 1988, FAIRBAIRN; OLIVE; NEILL, 1995).

A identificação de químicos genotóxicos é importante para a saúde humana. Para tanto, é necessário a aplicação de uma bateria de testes, dos quais, o teste de micronúcleos assume importância para detectar agentes mutagênicos (RIM; KIM, 2015). Os micronúcleos são formados por pedaços de cromossomos e/ou por perdas de cromossomos inteiros, durante o ciclo celular (SCOTT; EVANS, 1967). A aplicação do teste de micronúcleos tem importância toxicológica devido ao seu potencial em detectar efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos, assim como problemas epigenéticos e, especialmente, por ser um teste preditivo para mutagênese e câncer.



Artigo submetido ao periódico:



Evaluation of toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of phytol and its nanoemulsion.

Chemosphere.

[IF: 3.69; QUALIS A2 para Biotecnologia] Apêndice C.

Islam MT, Streck L, de Alencar MV, Mata AM, Silva-Júnior AS, Melo-Cavalcante AA.

3 CAPÍTULO 1. Avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do fitol livre e em nanoemulsão

3.1 Resumo

O diterpenoide fitol é importante por suas atividades biológicas. No entanto, é um composto não solúvel em água. Este estudo visa à preparação de nanoemulsão de fitol e avaliação das suas atividades tóxicas, citotóxicas, genotóxicas do fitol livre e em nanoemulsionado. O fitol em nanoemulsão foi preparado com adaptação do método de inversão de fase. O teste de citotoxicidade foi realizado em *Artemia salina*, enquanto a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa* nas concentrações 2, 4, 8 e 16 mM. O dicromato de potássio e o sulfato de cobre foram os controles para os testes em *A. salina* e *A. cepa*, respectivamente. Adicionalmente, a capacidade de genotoxicidade e de respostas adaptativas e/ou reparo do DNA foi detectada em *A. cepa*, com o Ensaio Cometa. Os resultados revelaram que tanto o fitol livre como nanoemulsionado exibiram citotoxicidade em *A. salina* (4, 8 e 16 mM); e toxicidade, citotoxicidade em *A. cepa*, nas concentrações de 8 e 16 mM, como também genotoxicidade em todas as concentrações testadas. Entretanto, foi possível observar decréscimo no índice de danos ao DNA, especialmente para o fitol em 2 mM, após 48 e 72 h, sugerindo respostas adaptativas e/ou reparo de DNA. O fitol nanoemulsionado apresentou atividades similares ao fitol, mas possivelmente pode atravessar as membranas biológicas com melhor biodisponibilidade. Os dados sugerem estudos não clínicos e clínicos com o fitol, especialmente o nanoemulsionado, para possíveis formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: Fitol, nanoemulsão, genotoxicidade, respostas adaptativas e reparo do DNA.

3.2 Introdução

O diterpenoide fitol (3,7,11,15-tetrametil hexadec-2-en-1-ol), aqui denominado por FIT, tem propriedades antioxidantes, citotóxicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, neuroprotetoras, antidiabéticas e muitas outras atividades biológicas e industriais (ISLAM et al., 2016a). Por ser um óleo essencial (OE), o FIT pode atuar com efeitos antagônicos e/ou contraditórios, pois, em altas concentrações, tem ação como pró-oxidante; e, em menores concentrações, tem atividades antioxidantes e citoprotetores em diversos sistemas teste (BAKKALI et al., 2008). O FIT é um agente com toxicidade tolerada em roedores (ISLAM et al., 2015). No entanto, a avaliação do potencial genotóxico em seres humanos de um composto é crucial para compreender os níveis e mecanismos de toxicidades em relação ao material genético e à carcinogênese (GUZMAN et al., 2008).

É importante destacar que o FIT é uma molécula não solúvel em água, o que dificulta a sua aplicação e formulação para o consumo humano. Assim, sua vetorização em nanoemulsões, lipossomas, micelas e nanopartículas pode favorecer suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, com viabilidade oral e diversos benefícios biotecnológicos, com ênfase para os seus possíveis potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos (ONOUÉ; YAMADA; CHAN, 2014; FARCAL et al., 2015). Os fármacos podem causar danos genotóxicos e/ou efeitos carcinogênicos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2010; DOWNES; FOSTER, 2015). Assim, os produtos naturais e/ou sintéticos candidatos a insumos farmacêuticos devem ser avaliados quanto à exclusão dos riscos do composto apresentar potenciais tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (WATERS; JACKSON; LEA, 2010), frente à mensuração de riscos para instabilidade genética, mutações em genes, danos em cromossomos, bem como para efeitos carcinogênicos (ZEIGER et al., 2015).

Os testes com *A. cepa* e *A. salina* se apresentam como biomarcadores toxicogênicos de importância para avaliação de riscos ao material genético. A *A. salina* é um sistema teste comumente aplicado na avaliação de toxicidade e citotoxicidade de uma variedade de substâncias químicas naturais e/ou sintéticas (BARAVALIA et al., 2012). O teste em *Allium cepa* detecta efeitos citogenéticos com biomarcadores para estudos de cito/genotoxicidade de contaminantes químicos ambientais e de fármacos (O'ZKARA et al., 2015). Os meristemas de raízes de *A. cepa* também podem ser avaliados quanto à genotoxicidade e respostas celulares adaptativas e estudos de reparo de DNA (ACHARY; PANDA, 2010). O estudo teve por objetivo incluir o FIT em nanoemulsão (FNE) e avaliar os potenciais tóxicos, citotóxicos e mutagênicos do FIT e do FNE em *A. salina* e *A. cepa*, bem como sua genotoxicidade e respostas adaptativas e/ou reparo de DNA em meristemas de raízes de *A. cepa*, com aplicação do Ensaio Cometa na versão alcalina.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Reagente e produtos químicos

O dicromato de potássio e o sulfato de cobre foram utilizados como padrões para os testes de *A. salina* e *A. cepa*, respectivamente. O FIT, padrões e todos os reagentes e produtos químicos necessários foram obtidos, comercialmente, da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

3.3.2 Obtenção dos cistos de *A. salina* e bulbos de *A. cepa*

Os cistos de *A. salina* foram cedidos pelo Laboratório de Cancerologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; e os bulbos médios de *A. cepa* (cebola) foram obtidos no mercado local de Teresina, Brasil, 2016.

3.3.3 Preparação da amostra teste

O FIT e o FNE foram dissolvidos em tween-80 a 0,05% e em solução salina (NaCl a 0,9%), para obtenção das concentrações finais de 2, 4, 8 e 16 mM, conforme Islam e colaboradores (2016b). Utilizou-se água destilada para dissolver a solução de sulfato de cobre para 0,0006 mg/mL e dicromato de potássio para as concentrações de 2-16 mM para os testes de *A. cepa* e *A. salina*, respectivamente.

3.3.4 Preparação da nanoemulsão

A nanoemulsão foi preparada pelo método de inversão de fase, de acordo com Islam e colaboradores (2016b). A fase oleosa foi composta por triglicerídeos de cadeia média (1% p/p) em uma mistura de surfactante (5% p/p) contendo fosfatidilcolina de soja e oleato de sódio (1:7 p/p). Este foi titulado, lentamente, numa solução aquosa de 2-metilpirrolidona (2% p/v) a 70°C sob agitação magnética constante (1.500 rpm). A emulsificação foi realizada utilizando um Ultra-Turrax T18 básico equipado com a ferramenta de dispersão S 18 N-19 G a 11.000 rpm durante um minuto e seguido por quatro minutos a 7.000 rpm. A mistura de tensoativos, que produziu dispersões coloidais transparentes, foi selecionada a partir de um diagrama de fases pseudoternário (OSTERTAG et al., 2012).

3.3.5 Análise da distribuição de tamanhos e medições do potencial zeta

O diâmetro médio das gotas foi calculado utilizando o método de análise cumulativo, baseado na intensidade da dispersão de luz em um analisador de tamanho de partícula (*Brookhaven Instruments*, EUA), com comprimento de onda de 659 nm com ângulo de detecção de 90° a uma temperatura de 25°C. A correlação funcionou em modo paralelo e os dados foram analisados usando o software Zeta Plus® Particle Sizing versão 3.95. As medições de potencial zeta foram realizadas com o mesmo equipamento utilizando uma intensidade de campo de cerca de 5,9 V cm⁻¹. Foram realizadas cinco corridas para cada amostra para determinar o valor do potencial zeta com o software PALS Zeta Potential

Analyzer, utilizando a mobilidade eletroforética de acordo com a equação de Helmholtz-Smoluchowski. As amostras foram diluídas em 1:100 (v/v) com água purificada.

3.3.6 Incorporação e dispersão de FIT na nanoemulsão

O percentual de dispersão do FIT, na fase externa, foi testado adicionando um excesso de fármacos à fase oleosa antes de realizar a emulsificação descrita. As amostras foram armazenadas num banho termostático a 25°C com agitação durante um minuto, seguido por 15 minutos num banho de ultrassons a cada 12h, durante 72h. Logo após as amostras foram centrifugadas (1000 g durante 15 min) e filtradas com membrana de acetato (0,45 µm) e o FIT carregado foi determinado, analiticamente, por espectrofotometria UV-vis a 239 nm, utilizando a equação para um gráfico de curva padrão do fitol ajustado e previamente construído.

3.3.7 Teste de citotoxicidade por bioensaio de letalidade em *Artemia salina*

Os ovos de *A. salina* foram incubados em água salgada artificial (23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl₂.6H₂O, 4,0 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O, ou 1,3 g de CaCl₂.6H₂O e 0,7 g de KCl em 1000 mL de água) entre 25-30°C. Utilizou-se bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) como agente tampão para manter o pH da solução em 9,0. Após 48h, incubaram-se náuplios vivos (*A. salina*) para este bioensaio. O teste foi conduzido de acordo com o método descrito por Meyer e colaboradores (1982). Resumidamente, 10 (dez) *A. salina* vivas foram transferidas para cada tubo de ensaio. O volume final de cada amostra foi ajustado para 5 mL com água salina artificial (solução de salmoura) e água mineralizada (1:1). As amostras foram mantidas sob a mesma condição de incubação por mais 48h. Os náuplios vivos foram contados para determinar o número de mortes por amostra. A água salina artificial e o KDCr foram utilizados como controle negativo (CN) e positivo, respectivamente. Os resultados foram expressos como porcentagem da mortalidade.

3.3.8 Avaliação da toxicidade/citotoxicidade e mutagenicidade pelo teste de *A. cepa*

As camadas exteriores e o parênquima de brotamento da coroa central dos bulbos de *A. cepa* frescos, de tamanho médio, foram, cuidadosamente, removidos fazendo uma pequena incisão circular para facilitar o crescimento radicular. Os bulbos foram então enxaguados com água da torneira durante 20 minutos e a porção de raiz foi embebida em água destilada, em tubos de vidro (capacidade: 5-7 mL) previamente esterilizado, durante as primeiras 48h a 25 ± 1°C no escuro. Apenas os bulbos com

crescimento de raízes satisfatório foram transferidos para os tubos de vidro (cinco para cada concentração e controles), para uma exposição de 48 horas às substâncias teste. Após o período de exposição, as raízes foram contadas e medidas com paquímetro em mm. As raízes com comprimento < 10 mm foram fixadas com uma solução de carnoy (etanol: ácido acético glacial (3:1; v/v)) durante 24h a 4°C e foram armazenados em etanol a 70% até o teste. Para a preparação das lâminas, as raízes foram submetidas a três banhos em água destilada durante 5 minutos, hidrolisadas com ácido clorídrico 1 Mol (HCl) à temperatura ambiente durante 11 minutos, seguindo-se com o tratamento com corante de Schiff durante 2h, em recipiente de cor âmbar. O corante foi removido com água corrente e a região meristemática foi seccionada e submetida a um tratamento com solução de carmim acético a 2% para observação fotomicroscópica com aumento de 400X. Foram contadas cinco mil células para cada concentração teste. Um grupo controle negativo (CN) foi também feito com o veículo utilizado para diluir as amostras teste. Para analisar as atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas foram calculados o crescimento de raízes e o número de divisões celulares para cada fase mitótica. Foram analisadas 1.000 células por bulbo, totalizando 5.000 células por grupo de estudo. As concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) foram calculadas para inspecionar a porcentagem de inibição de crescimento de raízes (FISKESJÖ, 1993).

3.3.9 Determinação da genotoxicidade em meristemas de raízes de *A. cepa*

A genotoxicidade foi determinada com a aplicação do Ensaio Cometa em meristemas de raízes de *A. cepa*, segundo Panda e Achary (2010) e Achary e Panda, (2014). Os bulbos de *A. cepa* (cinco cebolas em cada grupo) foram tratados como descritos anteriormente. Após tratamento com solução de carnoy, as regiões meristemáticas das raízes foram cortadas em pedaços pequenos e tratadas com Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) durante uma noite para obter o extrato nuclear. Em seguida, utilizando-se 1% de agarose de baixo ponto de fusão 1:1 (ABPF: 35 ° C). O extrato nuclear foi espalhado em lâminas previamente preparadas com agarose de ponto de fusão normal 2,25% (50°C) em tampão fosfato salino (PBS; pH: 7,4). As lâminas foram então secas em uma estufa a 37°C durante 1,5h e a eletroforese em gel simples foi realizada a 300 mA durante 15 minutos. As lâminas foram secas e depois fixadas em solução de carnoy durante 10 minutos. Após três banhos em água destilada, as lâminas foram coradas e seguidas para observação por fotomicrografia em aumento de 400X. O perfil genotóxico foi determinado com base no nível de danos no DNA, que foi classificado de zero (0) a quatro (4) de acordo com os níveis de migração de fragmentos de DNA danificado em duas lâminas, com leitura de 100 células por lâmina. A fim de observar a capacidade de reparo do DNA, o teste foi repetido por 48h e 72h. Deve

ser observado que, exceto para a incubação e observação microscópica, toda a operação foi realizada no escuro (TURKOGLU, 2012).

3.3.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pela média da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey de duas vias e do teste de Bonferroni de uma via, usando o software GraphPad Prism (versão 6.0), considerando $p < 0,05$ significativo e nível de confiança em 95%.

3.4 Resultados

3.4.1 Características da nanoemulsão com FIT

As dispersões coloidais exibiram tamanho pequeno e uniforme, distribuídas em gotículas, com nanoveículo mostrando um diâmetro médio de $130,20 \pm 17,17$ nm com um índice de polidispersão (PDI) de 0,185. No FNE, o tamanho da gota aumentou, ficando com diâmetro médio de 245,50 nm e PDI de 0,384. Tanto o FIT como o FNE apresentaram valor de PZ elevado. A carga do fármaco foi calculada utilizando a equação de regressão linear $A = 0,0045C + 0,005$, que foi extraída da curva padrão. A absorbância obtida foi substituída por "C" na equação, e a concentração de FIT ($\mu\text{g/mL}$) foi calculada. O coeficiente de correlação da linha reta foi de 0,99. A carga máxima de FIT na nanoemulsão Óleo/Água foi de $1,55 \pm 0,012\%$ ($n = 3$), o que permitiu a preparação de nanoemulsão contendo FIT a 1% p/v (10 mg/mL). Esses dados estão sumarizados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Efeitos do FIT no tamanho (diâmetro) e potencial zeta (PZ) do veículo para nanoemulsão e FNE.

Código da formulação, composição	Diâmetro (nm) \pm DP	PDI	PZ (mV) \pm DP	Quantidade do bioativo (%)
(NMP, Miglio®812, mistura de surfactantes, fitol)				
VE- 0,2:0,1:0,5:0	$130,20 \pm 17,17$	0,185	$-108 \pm 3,01$	-
FNE- 0,2:0,1:0,5:0,10	$245,50 \pm 25,02$	0,384	$-77,8 \pm 2,83$	1,55

Média \pm desvio padrão. VE: veículo para nanoemulsão; FNE: fitol em nanoemulsão; PDI: índice de polidispersão. NMP: N-metil pirrolidona.

3.4.2 Toxicidade/citotoxicidade do FIT e da FNE em *Artemia salina*

Os dados de toxicidade e citotoxicidade em *A. salina* estão apresentados na **Tabela 2**. O FNE a 8 e 16 mM exibiu maior letalidade em náuplio vivo do que o FIT. As maiores porcentagens de mortalidade (% M) observadas foram de 16,67%, 20% e 50% de FIT, FNE e dicromato de potássio, respectivamente. O padrão, dicromato de potássio, em todas as concentrações, induziu maiores percentuais de mortalidade em náuplios quando comparado com os grupos teste. Não foi observada mortalidade nos tubos marcados com CN do grupo. No entanto, em todos os casos houve uma relação dose-resposta.

Tabela 2. Atividade citotóxica do FIT, FNE em *A. salina*.

Parâmetros	Percentual de mortalidade (%M)		
	FIT	FNE	Dicromato de potássio
CN		3,3 ± 0,50	
2 (mM)	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5	16,6 ± 0,5 ^a
4 (mM)	6,6 ± 0,5 ^a	6,6 ± 0,5 ^a	23,3 ± 0,5 ^a
8 (mM)	10,0 ± 0,0 ^a	13,3 ± 0,5 ^a	33,3 ± 0,5 ^a
16 (mM)	16,6 ± 0,5 ^a	20,0 ± 1,0 ^a	50,0 ± 1,0 ^a

Média ± desvio padrão. ^ap <0,05 comparado ao CN (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl); FIT: fitol livre; FNE: fitol em nanoemulsão. (ANOVA, *one way* e teste de Tukey, nível de confiança de 95%); Cada concentração foi testada em 3 tubos (10 náuplios vivos/tubo).

3.4.3 Toxicidade/citotoxicidade e genotoxicidade do FIT e do FNE em *A. cepa*

O FIT e o FNE inibiram, significativamente, o crescimento de raízes em *A. cepa* nas duas maiores concentrações após 48h, especialmente por 16mM, com percentuais de crescimento similares ao observado para o sulfato de cobre, que reduziu em 73,65% o crescimento de raízes. Os dados apresentados na **Tabela 3** indicam que tanto o FIT como o FNE tiveram efeitos mais tóxicos nas raízes de *A. cepa* nas concentrações 8 e 16 mM. No entanto, FNE em todas as concentrações reduziu o crescimento de raízes, observado em dias e em concentrações diferentes. Em relação às alterações no índice mitótico em meristemas de *A. cepa*, observou-se um aumento de células em intérfase e uma diminuição no índice mitótico (IM), também nas maiores concentrações para o FIT e FNE (**Tabela 4**).

Tabela 3. Toxicidade em raízes de *A. cepa* expostas a diferentes tratamentos (n = 5 bulbos/grupo).

Tratamentos		Média do comprimento das raízes (mm)			Crescimento (%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CN	-	19,0 ± 2,54	22,4 ± 3,20	27,2 ± 4,61	100	100	100
SC	0,0006 (mg/mL)	3,0 ± 1,12 ^a	7,4 ± 2,60 ^a	7,8 ± 0,10 ^a	15,7	33,0	29,77
FIT	2 (mM)	14,6 ± 2,50 ^b	15,8 ± 1,50 ^{b,c}	17,2 ± 2,16 ^b	76,8	70,5	65,6
	4 (mM)	13,4 ± 2,50 ^b	14,9 ± 4,50 ^b	16,0 ± 1,88 ^b	70,5	66,5	61,1
	8 (mM)	2,6 ± 2,88 ^a	7,4 ± 2,60 ^a	9,4 ± 4,30 ^a	13,6	33,0	35,8
	16 (mM)	1,6 ± 1,82 ^{a,b}	2,2 ± 6,10 ^{a,b}	5,2 ± 1,92 ^a	8,4	9,8	23,2
	24 h	EC₅₀: 6,11 ± 0,03 mM; IC: 4,24 – 8,81 mM; r²: 0,98					
	48 h	EC₅₀: 7,98 ± 0,02 mM; IC: 6,36 – 10,01 mM; r²: 0,99					
	72 h	EC₅₀: 9,85 ± 0,04 mM; IC: 6,38 – 15,21 mM; r²: 0,97					
FNE	2 (mM)	14,8 ± 2,38 ^b	15,4 ± 1,68 ^b	16,0 ± 1,78 ^{a,b}	77,9	68,8	61,1
	4 (mM)	13,0 ± 2,34 ^b	14,2 ± 10,88 ^b	14,2 ± 3,70 ^b	68,4	63,4	54,2
	8 (mM)	2,2 ± 1,92 ^a	8,8 ± 2,58 ^a	10,4 ± 3,14 ^a	11,6	39,3	39,7
	16 (mM)	1,4 ± 0,90 ^a	4,6 ± 1,68 ^a	7,8 ± 8,32 ^a	7,4	20,5	29,8
	24 h	EC₅₀: 5,79 ± 0,03 mM; IC: 4,26 – 7,88 mM; r²: 0,98					
	48 h	EC₅₀: 10,04 ± 0,03 mM; IC: 7,15 – 14,09 mM; r²: 0,98					
	72 h	EC₅₀: 14,35 ± 0,06 mM; IC: 8,12 – 25,36 mM; r²: 0,96					

Média ± desvio padrão. ^ap <0,05 comparado ao CN (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl); ^bp <0,05 comparado ao SC. CN (controle negativo); SC (sulfato de cobre) FIT: fitol livre; FNE: fitol em nanoemulsão. (ANOVA, *one way* e teste de Tukey, nível de confiança de 95%); Cada concentração foi testada em 3 tubos (10 náuplios vivos/tubo).

Tabela 4. Perfil citotóxico do FIT, FNE e controles em *A. cepa*.

Tratamentos		Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
CN	-	166,80 ± 23,50	250,00 ± 12,65	190,00 ± 1,58	229,80 ± 2,38	189,80 ± 3,96	85,96 ± 2,05
SC	0,0006 (mg/mL)	840,20 ± 6,08 ^a	80,60 ± 4,98 ^a	39,20 ± 3,03 ^a	20,00 ± 4,74 ^a	20,00 ± 6,32 ^a	15,98 ± 1,90 ^a
FIT	2 mM	217,20 ± 19,68	459,40 ± 33,91 ^a	128,60 ± 18,42 ^a	112,00 ± 13,49 ^a	106,00 ± 15,86 ^a	80,60 ± 8,16
	4 mM	194,00 ± 8,15	392,00 ± 17,89 ^a	150,40 ± 9,20	126,40 ± 0,02 ^a	114,00 ± 0,04 ^a	78,28 ± 2,71
	8 mM	503,60 ± 43,3 ^a	167,00 ± 21,59 ^a	147,80 ± 25,09	104,60 ± 8,53 ^a	77,00 ± 20,06 ^a	49,64 ± 0,002 ^a
	16 mM	634,20 ± 37,14 ^a	105,00 ± 21,59 ^a	92,80 ± 11,17 ^a	87,60 ± 6,10 ^a	80,20 ± 9,44 ^a	36,56 ± 0,002 ^a
FNE	2 mM	172,60 ± 19,59	465,60 ± 67,06 ^a	131,60 ± 29,10 ^a	118,00 ± 34,96 ^a	112,20 ± 14,44 ^a	82,90 ± 13,89
	4 mM	171,00 ± 19,49	422,00 ± 60,17 ^a	164,00 ± 32,09 ^a	139,00 ± 19,70 ^a	104,00 ± 27,02 ^a	83,68 ± 14,55
	8 mM	582,00 ± 47,64 ^a	128,00 ± 23,87 ^a	124,00 ± 35,78 ^a	92,00 ± 19,24 ^a	74,00 ± 27,02 ^a	41,80 ± 10,59 ^a
	16 mM	649,60 ± 36,92 ^a	111,00 ± 24,08 ^a	97,00 ± 10,90 ^a	84,00 ± 13,40 ^a	58,40 ± 22,10 ^a	35,04 ± 7,04 ^a

Média ± desvio de 5000 células, 1000 células por bulbo de *A. cepa*. SC: sulfato de cobre; FIT: fitol livre; FNE: fitol em nanoemulsão; IM: índice mitótico (razão entre as células em divisão e células em intérfase); % IM em comparação ao CN. ^ap < 0,001 comparado ao CN; ^bp < 0,05 comparado ao SC (ANOVA, *Two Way* e teste de Tukey, nível de confiança de 95%); CN: controle negativo (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl).

3.4.4 Genotoxicidade por Ensaio Cometa em *A. cepa*

O FIT e o FNE em meristemas de raízes *A. cepa* induziram genotoxicidade nas concentrações testadas, como observado pelos significantes aumentos do índice e frequência de danos ao DNA (ID e FD) em relação ao observado no controle negativo. Entretanto, nas duas menores concentrações, foram observados diminuição nesses parâmetros de genotoxicidade, especialmente para ID, na concentração de 2 mM, onde os dados foram significantes após 48 e 72 h, em relação aos danos observados em 24 h de exposição dos bulbos ao FIT e ao FNE (**Tabela 5**).

Tabela 5. Atividade genotóxica do FIT, FNE e possíveis respostas adaptativas e/ou de reparo de danos ao DNA, em *A. cepa*.

Tratamentos		% ID			% FD		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CN	-	49,5 ± 5,0	49,5 ± 9,0	50,0 ± 7,0	29,0 ± 12,0	30,5 ± 3,0	31,0 ± 2,0
SC	0.0006 (mg/ml)	259,5 ± 0,1 ^a	273,5 ± 3,0 ^a	281,5 ± 7,0 ^a	81,5 ± 3,0 ^a	85,0 ± 2,0 ^a	96,0 ± 8,0 ^a
FIT	2 (mM)	121,0 ± 21,0 ^a	59,5 ± 5,0 ^{bc}	49,5 ± 3,5 ^{bc}	44,0 ± 2,0 ^b	43,5 ± 0,5 ^b	33,0 ± 2,0 ^b
	4 (mM)	159,5 ± 5,0 ^a	141,0 ± 2,0 ^a	108,0 ± 10,0 ^a	64,5 ± 1,0 ^{ab}	56,0 ± 8,0 ^{ab}	42,0 ± 6,0 ^{ab}
	8 (mM)	196,5 ± 1,0 ^a	205,0 ± 6,0 ^a	198,5 ± 3,5 ^a	64,0 ± 2,0 ^a	76,0 ± 14,0 ^a	58,0 ± 2,0 ^a
	16 (mM)	207,5 ± 7,5 ^a	215,0 ± 4,0 ^a	210,0 ± 4,0 ^a	70,0 ± 4,0 ^a	77,0 ± 2,0 ^a	64,5 ± 4,5 ^a
FNE	2 (mM)	169,5 ± 1,0 ^a	60,5 ± 11,5 ^{b, c}	55,0 ± 2,0 ^{bc}	54,5 ± 3,0 ^a	45,5 ± 3,0 ^b	33,5 ± 7,0 ^b
	4 (mM)	195,5 ± 9,0 ^a	175,0 ± 2,0 ^a	158,0 ± 12,0 ^a	55,0 ± 2,0 ^a	62,5 ± 1,0 ^a	56,5 ± 1,0 ^a
	8 (mM)	222,0 ± 4,0 ^a	232,0 ± 2,0 ^a	227,0 ± 2,0 ^a	66,5 ± 1,0 ^a	74,5 ± 1,0 ^a	64,5 ± 1,0 ^a
	16 (mM)	241,0 ± 15,0 ^a	262,5 ± 3,0 ^a	251,0 ± 2,0 ^a	85,5 ± 1,0 ^a	78,0 ± 4,0 ^a	65,5 ± 5,0 ^a

Média ± desvio padrão de danos em 100 células por bulbo (5 bulbos); ^ap <0,05 comparado ao controle; ^bp <0,05 comparado ao SC. ^cp <0,05 comparado aos danos observados em 24h de exposição. (ANOVA *one way* e teste de Bonferroni, nível de confiança de 95%); ID: índice de danos; FD: frequência de danos; CN: controle negativo (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl); SC: sulfato de cobre (0,0006 mg/mL); FIT: fitol livre; FNE: fitol nanoemulsionado.

3.5 Discussão

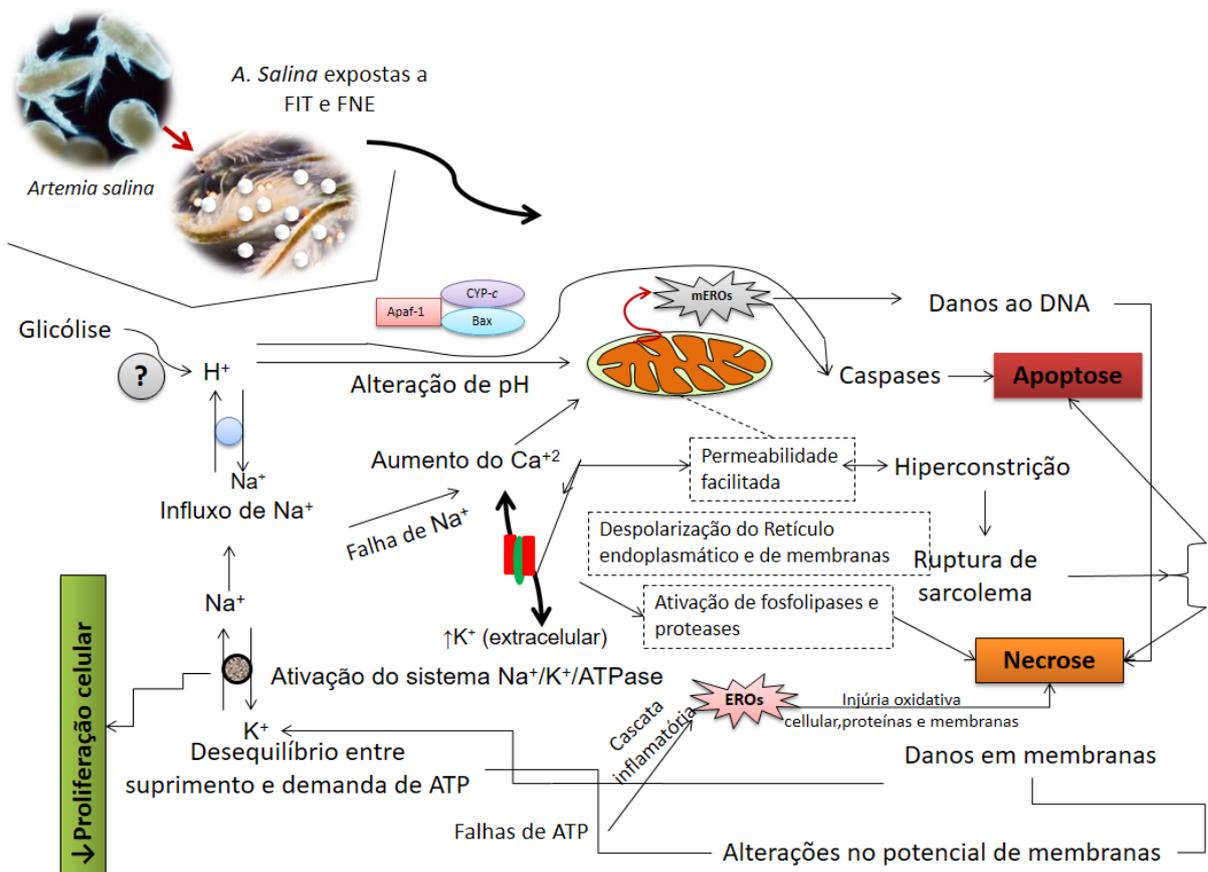
Os OEs devido à sua lipofilicidade podem penetrar nas membranas biológicas (CARSON et al., 2002) causando danos à membrana. Além disso, reduzem o potencial de membrana mitocondrial e afetam o ciclo iônico de Ca^{2+} (VERCESI et al., 1997) e outros canais iônicos, e, assim, diminuem o gradiente de pH e afetam a bomba de prótons e o *pool* de ATP. Essas alterações são associadas ao estresse oxidativo devido à permeabilidade anormal da membrana e vazamento de radicais, citocromo C, íons cálcio e proteínas, levando à morte celular por apoptose e necrose (ARMSTRONG, 2006). Assim, é importante a preparação de nanoemulsões. As nanoemulsões são, normalmente, estabilizadas por uma quantidade relativamente grande de surfactantes para produzir dispersões transparentes (AMANI et al., 2008), como observado para o FIT em nanoemulsão. A nanoemulsão com FIT estava transparente e com tamanhos de gotículas na gama de 130 a 250 nm utilizando tensoativos de cerca de 5% p/p (fosfatidilcolina de soja: oleato de sódio (1:7 p/p) associado ao co-solvente 2-metilpirrolidona (2% p/v) (**Tabela 1**). Os efeitos da composição do surfactante (OSTERTAG et al., 2012) e razão do cosolvente, tanto no tamanho das gotas quanto na sua distribuição, foram medidos. A composição da fase oleosa, surfactante e cosolvente utilizados neste trabalho produziu nanoemulsão estável PZ altamente negativo, garantindo, assim, uma estabilidade eletrostática adequada contra a floculação (SABERI et al., 2013).

Os OEs contendo grupos OH fenólicos, a exemplo do FIT e do FNE, são de natureza citotóxica (SACCHETTI et al., 2005). O FIT e FNE exibiram % de mortalidade <50 na maior concentração testada (16 mM), sugerindo efeitos tóxicos. Oliva e colaboradores (2008) relataram que a citotoxicidade dos OEs pode ser avaliada em *A. salina*. Em *A. salina*, o FIT e o FNE foram citotóxicos nas concentrações testadas (4, 8 e 16 mM), mas com percentuais de mortalidade abaixo do dicromato de potássio (**Tabela 2**), que é um agente oxidante forte e inibidor de captação de aminoácidos para a síntese de macromoléculas. Além disso, pode causar a destruição de macromoléculas de células induzindo efeito oxidativo (ATSDR, 2000). O teste de *A. Salina* é um teste toxicológico para análises de extratos brutos, drogas e produtos químicos (SANGIAN et al., 2013) e nanomateriais (RAJABI et al., 2015).

Geralmente, o índice de toxicidade em *A. salina* é avaliado pela concentração letal (CL_{50}): acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ são não tóxicas; 500 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ são tóxicas. Substâncias com CL_{50} de 100 - 500 $\mu\text{g/mL}$ são de toxicidade média, enquanto que as substâncias com CL_{50} de 0 - 100 $\mu\text{g/mL}$ são altamente tóxicas (CLARKSON et al., 2004). Além disso, o cálculo da dose letal pode ser facilmente realizado através da determinação da CL_{50} da *A. salina*, uma vez que permite uma correlação com o teste de toxicidade aguda realizado em roedores (SHARMA et al., 2013; NAIDU et al., 2014). A diminuição da atividade mitótica indica que estas substâncias têm um efeito antimitótico, permitindo-lhes interferir com o ciclo mitótico normal e aumentar a duração das fases G2 e S (YILDIZ et al., 2009).

Diversos mecanismos podem ser sugeridos para as atividades tóxicas e citotóxicas do FIT e do FNE em *Artemia salina* (Figura 1). O descompasso entre a oferta de ATP e a sua procura provoca falhas de ATP, que por sua vez provocam alteração do potencial de membrana e danos crônicos na membrana e fugas. Além disso, através da estimulação da cascata inflamatória, pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio celular (EROs), bem como morte celular necrótica. Uma alteração no suprimento de ATP e/ou sobrecarga extracelular de K^+ pode ativar o sistema $Na^+/K^+/ATPase$, resultando em influxo de Na^+ e sobrecarga de Ca^{+2} . O último caso, juntamente com a alteração do gradiente de pH, pode aumentar a geração de EROs mitocondrial e a morte celular apoptótica mediada por ativação de caspase. Por outro lado, a sobrecarga de Ca^{+2} despolariza o retículo endoplasmático e a membrana plasmática, ativam fosfolipases e proteases dependentes de Ca^{+2} . Também aumenta a transição de permeabilidade, resultando em hiperconstricção e apoptose mediadas por ruptura sarcoplasmática e necrose em células eucarióticas. Além disso, uma ativação aguda do sistema $Na^+/K^+/ATPase$ pode diminuir a proliferação celular.

Figura 1. Sugestões de mecanismos citotóxicos postulados para o FIT e FNE em *Artemia salina*. CYP-c: citocromo-c; RE: retículo endoplasmático; EROs: espécies reativas de oxigênio; mEROs: Espécies Reativas de Oxigênio mitocondrial.



Em *A. cepa*, o comprimento da raiz é um parâmetro importante para a avaliação de toxicidade, devido ao fato de que a zona de alongamento de meristemas de *A. cepa* pode servir como um sinal externo sensível de eventos celulares internos contínuos (ADEYEMO; FARINMADE, 2013). Qin e colaboradores (2015) sugeriram que o cobre iônico (2 e 8 μM), acumulado nas raízes de *A. cepa*, inibiu o crescimento radicular resultando em aberrações cromossômicas devido à acumulação de cobre na ponta da raiz, interferindo nos arranjos dos microtúbulos. Em *A. cepa*, os efeitos tóxicos e citotóxicos, que causam uma inibição no crescimento radicular geralmente se relacionam com o alongamento do ciclo celular durante a diferenciação (FUSCONI et al., 2006), atividade meristemática apical (WEBSTER; MACLEOD, 1996), e a inibição da síntese proteica (SETH et al., 2007). O sulfato de cobre, significativamente ($p < 0,05$), reduziu o comprimento da raiz em *A. cepa*. Por outro lado, tanto FIT quanto FNE reduziram o comprimento da raiz em *A. cepa*, sugerindo um efeito tóxico nas duas mais altas concentrações (**Tabela 3**).

O FIT e FNE (8 e 16 mM) inibiram a divisão celular nas regiões meristemáticas das raízes de *A. cepa*. As substâncias citotóxicas também podem inibir o crescimento de órgãos vegetativos em algumas plantas (YILDIZ et al., 2009), por exemplo, em *A. cepa* (HERRERO et al., 2012). Geralmente, o IM pode identificar, de forma confiável, a presença de efeitos citotóxicos de uma substância. Considera-se que uma redução de 50% no IM, quando comparado com o CN, é um valor limitante: a redução $< 50\%$ induz um efeito subletal e $< 22\%$ provoca um efeito letal (MESI; KOPLIKU, 2013), como observado para FIT e FNE (**Tabela 4**). Com algumas exceções, quando comparadas com os grupos controle (CN e SC), ambas as formulações de FIT exibiram efeitos citotóxicos (redução de IM $> 50\%$) significativos ($p < 0,05$), como também efeitos tóxicos. A divisão celular foi reduzida significativamente após o tratamento com as doses crescentes de FIT. O IM, um parâmetro confiável, que permite estimar a frequência de divisão celular, é geralmente usado para rastreio de agentes citotóxicos (FERNANDES et al., 2007).

Uma redução significativa do IM pode ser devida à ação antimitótica de substâncias. Os agentes utilizados para interferir no ciclo celular normal podem causar uma diminuição do número de células em divisão (SHARMA; VIG, 2012). Pode ser devido à inibição da síntese de DNA ou bloqueio de G1, inibição da formação de microtúbulos e síntese de supressão de DNA ou efeito do composto de teste na fase G2 do ciclo celular (MAJEWSKA et al., 2003). No entanto, alguns agentes podem atuar como inibidores da prometáfase que podem atrasar ou parar a célula no estágio de metáfase, devido às interações agente-microtúbulo (PANDEY, 2008).

Outras explicações de mecanismos celulares para citotoxicidade podem ser relacionadas com os relatos de que os OEs podem ser ativados pela luz, que pode corroborar para as atividades citotóxicas e mutagênicas. De outro modo, tendo alta lipofilia e em altas concentrações, os OEs penetram facilmente nas membranas celular e mitocondrial e formam adutos covalentes com macromoléculas

celulares, resultando, assim, em suas atividades pró-oxidantes, citotóxicas e genotóxicas (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, o FIT apresenta atividades citotóxicas, mas também tem ação antioxidante em pequenas concentrações (ISLAM et al., 2016a, b).

Cabe enfatizar que os OEs fenólicos em alta concentração devido aos seus efeitos pró-oxidantes podem aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e malondialdeído. De outra forma, as EROs, principalmente o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), eventualmente, liga-se aos íons metálicos distribuídos aleatoriamente no DNA, conduzindo, em última instância, à SSB (SAGE; HARRISON, 2011), o que também pode ser explicado pela modificação do DNA oxidativo (RUCINSKA et al., 2004). O FIT tem um grupo OH no seu carbono α (C1); e, conforme Shah et al. (2014), os compostos com grupos OH ativos, tais como diterpenoides, podem matar micro-organismos devido ao aumento da atividade citotóxica (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). Existem evidências de que alguns OEs (por exemplo, eugenol, isoeugenol, metileugenol e safrol) causam síntese de DNA não programada. Assim, suas atividades citotóxicas e genotóxicas são, provavelmente, devido à liberação da lactato desidrogenase (LDH). No entanto, o FIT, possivelmente, pode ativar receptores hormonais nucleares e influenciar a expressão gênica e a diferenciação celular semelhantes ao retinol e a outras substâncias bioativas lipossolúveis, incluindo os compostos fenólicos (ISLAM et al., 2015).

Vários diterpenos e seus derivados foram relatados para atividades citotóxicas e genotóxicas em sistemas de teste biológicos. Por exemplo, o manool, o diterpeno e o mais abundante micrometabólito encontrado em *Salvia officinalis* são evidentes para atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Também o manool em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) e em células de hepatoma humano (HepG2) apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos de uma forma dependente da concentração (NICOLELLA et al., 2014). Em concentração alta, atividade citotóxica e genotóxica, enquanto antígenotóxico em baixa concentração em células HepG2. Exemplos de alguns outros diterpenos ou seus derivados indicados como de potenciais citotóxicos e genotóxicos são os – *trans*-dehidrocrotonina (AGNER et al., 1999), 13-miristato de forbol-12-acetato (WESTPHAL et al., 2009), paclitaxel (TURKEZ et al., 2010), 3,4-secoisopimar-4 (18), ácido 7,15-trien-3-óico (DI SOTTO et al., 2012), taxodiona (KUŽMA et al., 2016).

Estudos de genotoxicidade são importantes para determinar agentes que podem perturbar o material genético causando mutações genéticas ou cromossômicas. Em geral, os resultados do teste de genotoxicidade são usualmente tomados como indicadores de efeitos mutagênicos (ADEYEMO; FARINMADE, 2013). Como relatado no presente estudo, o FIT e o FNE induziram toxicidade e citotoxicidade nas maiores concentrações em *A. salina*; e genotoxicidade em meristemas de *A. cepa* nas concentrações testadas (2, 4, 8, e 16 mM). Entretanto, nas duas concentrações menores (2 e 4mM), após 48 e 72h de exposição, foi observado diminuição para os índices de danos (**Tabela 5**), por prováveis

mecanismos de respostas adaptativas e/ou reparo de DNA. Em outros estudos de genotoxicidade em *A. cepa* foram relatados que o Al^{3+} induz dano ao DNA em alta concentração (200-800 μM). Mas, respostas adaptativas para proteção genômica, em baixa concentração (5 ou 10 μM) (PANDA; ACHARY, 2010; ACHARY; PANDA, 2014). As lesões de DNA, principalmente as rupturas de dupla cadeia (DSB), além das quebras de uma única cadeia, são lesões de DNA prejudiciais que não são necessariamente em locais adjacentes, tornando-as difíceis de reparo (SAGE; HARRISON, 2011). De acordo com Lopez-Camarillo e colaboradores (2009), as DSBs podem ser reparadas pelas vias de reparo de recombinação homóloga (HRR) e união de extremidade não-homóloga (NHEJ).

Entretanto, estudos indicam que as proteínas MAPK podem induzir respostas adaptativas em *A. cepa*. Existem relatos de que as fosfatases MAPK (MKP) estão envolvidas em resposta aos danos ao DNA mediada pela via MAPK (ULM et al., 2001), pois atuam sobre fatores transcricionais em células eucarióticas (YANG et al., 2003). Em células vegetais, o dano ao DNA ativa quinases ATM e ATR, via a serina/treonina quinase WEE1, interrompendo, transitoriamente o ciclo celular e permitindo que as células reparem danos ao DNA, antes do início da mitose (DE SCHUTTER et al., 2007). Yen e colaboradores (2005) relataram que os flavonoides dos resíduos de café torrado exibiam capacidade de reparo do DNA através de vias dependentes de ATM e ATR quinases. Entretanto, o FIT (10 $\mu g/mL$) em células granulosas de ovário humano pode regular, negativamente, a expressão de aromatase por inibição de p38 MAPK (GUO et al., 2014). A ativação de quinase, durante rupturas de dupla cadeia de DNA (DSBs), foi relatada para ativar as vias de sinalização a jusante que conduzem à parada transitória do ciclo celular e inibição da replicação de DNA, facilitando a reparação do DNA (MANNUSS et al., 2012).

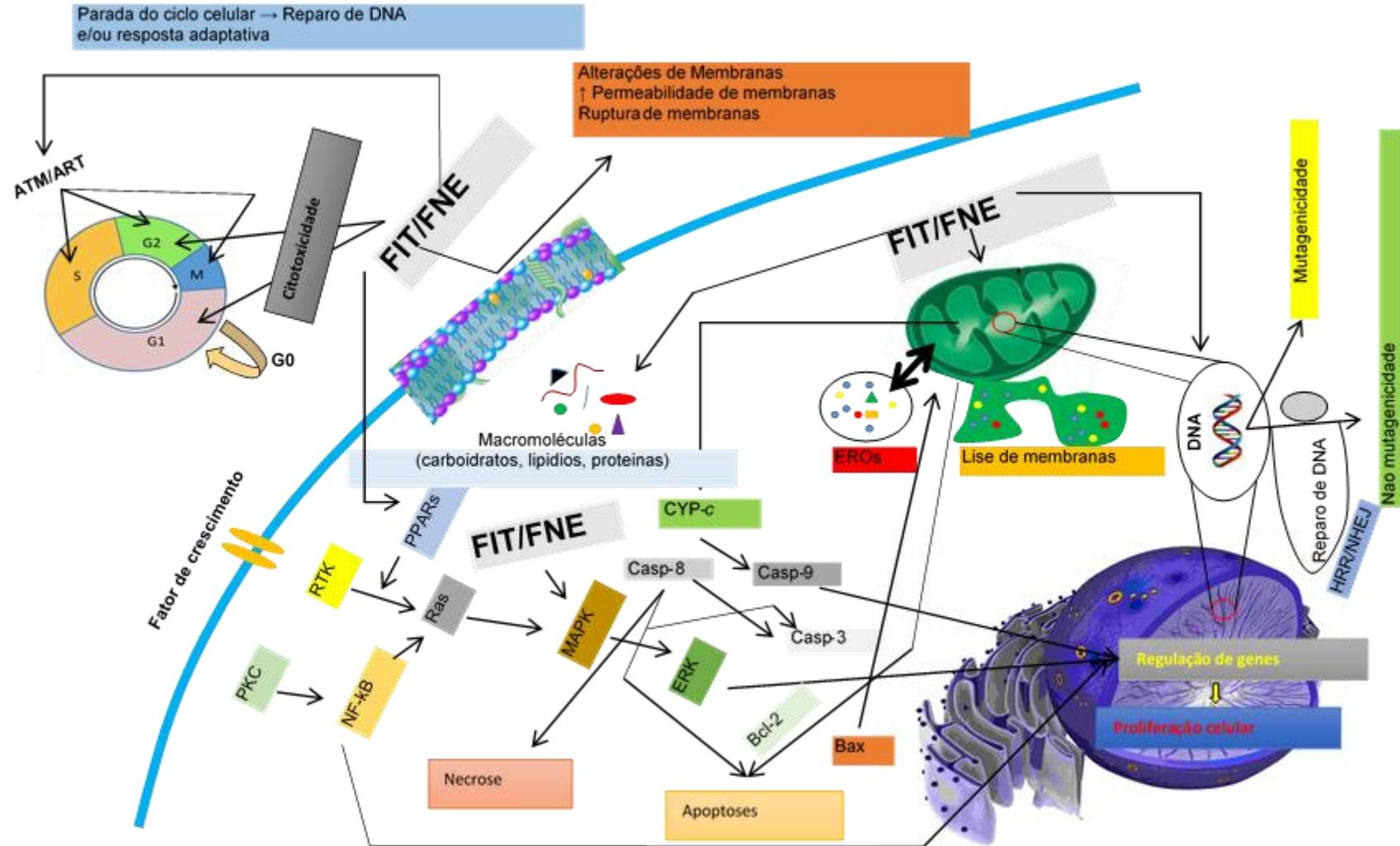
As respostas aos danos de DNA também podem ser relacionadas com a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e a proteína quinase DNA-dependente (DNA-PK) que também são sensores de danos ao DNA, uma vez que estas enzimas desempenham papéis importantes na tolerância ao estresse genotóxico, apoptose, necrose, transcrição e controle do ciclo celular em células eucarióticas (ADAMS-PHILLIPS et al., 2010). Matsuda e colaboradores (2013) descobriram que o fitol, em baixas concentrações (0,5% e 1%), diminuiu a expressão de mRNA de ACO (um gene alvo de PPAR α) no fígado e nos hepatócitos primários de rato.

Em síntese, o FIT/FNE, em baixa concentração, podem, possivelmente, a exemplo de outros flavonoides (YEN et al., 2005) e para o FIT (GUO et al., 2014), influenciar na expressão da ataxia telangiectasia-mutado (ATM) e ATM-Rad3-relacionadas (ATR) quinases, o que pode retardar G1, M e S, fases do ciclo celular, sugerindo uma resposta adaptativa e / capacidade de reparação do DNA. No entanto, em alta concentração, podem inibir a síntese de DNA ou bloquear G1, inibindo a formação de microtúbulos e suprimindo a síntese de DNA, juntamente com a detenção do ciclo celular na fase G2. Além disso, a alta concentração FIT/FNE pode alterar o potencial de membrana aumentando a sua

permeabilidade, rompendo as membranas da célula e mitocôndrias. A baixa concentração FIT/FNE também pode estimular a recombinação homóloga e / ou não-homóloga para reparo de DNA, regulação de gene e proliferação celular em células eucarióticas. Adicionalmente, a estimulação de sistemas antioxidantes fisiológicos e de reparação pode também ser ligada a uma concentração FIT/FNE baixa. Por outro lado, em alta concentração, FIT/FNE, através de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), proteína cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), citocromo c (CYP-c) e fator nuclear kappa B (NF-κB), como já relatado para o FIT (MATSUDA et al., 2013), as vias podem interferir na regulação de genes, levando à interrupção da proliferação celular.

O evento de necrose em células eucarióticas induzida por FIT/ FNE pode ser devido à alteração do potencial de membrana, à ruptura da membrana bem como às vias dependentes de caspase (Casp)-8. Por outro lado, Bax, Bcl-2, Casp-8 e -9 podem estar ligados à morte celular apoptótica por FIT/FNE. O FIT/FNE, em alta concentração, pode produzir efeitos pró-oxidativos e, eventualmente, causar a destruição de macromoléculas celulares, incluindo carboidratos, proteínas, lipídeos e materiais genéticos (DNA, RNA). Se a capacidade de reparação parar e/ou o dano continuar sem ser reparado poderá ocorrer eventos mutagênicos (**Figura 2**).

Figura 2. Sugestões de mecanismos postulados para os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do fitol (FIT) livre e nanoemulsionado (FNE) em *Allium cepa*.
 ATM: Ataxia telangiectasia mutada; PPARs: Proliferadores de peroxissoma; RTK: receptor tirosina cinases; PKC: proteína cinase C; ERK: quinase extracelular;
 MAPKs: proteína cinases ativadas por mitógeno; CYP-c: citocromo c; NF-κB: fator nuclear kappa B.



3.6 Conclusão

O FIT livre e nanoemulsionado, em *Artemia salina* e *Allium cepa*, apresentaram atividades tóxicas e citotóxicas nas concentrações 4, 8 e 16 mM e de 8 e 16 mM, respectivamente, possivelmente por mecanismos citogenéticos indutores de apoptoses e de anormalidades nucleares em células eucarióticas e/ou por efeitos pró-oxidantes. Efeitos genotóxicos também foram observados em *A. cepa*, pelo aumento do índice e frequência de danos, nas concentrações testadas. Entretanto, os efeitos genotóxicos para as concentrações de 2 e 4 mM foram reduzidos após 48 e 72h de exposição dos bulbos de *A. cepa* ao FIT e FNE, significativamente para 2 mM, com sugestão de respostas adaptativas e/ou reparo dos danos ao DNA em meristemas de raízes de *A. cepa*. O FIT e, especialmente o FNE, por sua maior biodisponibilidade em nanoemulsão, em concentrações adequadas, são potenciais candidatos a formulações farmacêuticas antitumorais.

Referências

- ACHARY, V.M.M.; PANDA, B.B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, v. 25, p. 201-209, 2010.
- ADAMS-PHILLIPS, L.; BRIGGS, A.G. BENT, A.F. Disruption of poly(ADPribosyl) at ion mechanisms alters responses of *Arabidopsis* to biotic stress. **Plant Physiology**, v. 152, p. 267-280, 2010.
- ADEYEMO, O.A.; FARINMADE, A.E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 1459-1466, 2013.
- AGNER, A.R.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; PAMPLONA, S.G.; CÓLUS, I.M. Investigation of genotoxic activity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 19, p. 377-384, 1999.
- AMANI, R.; YORK, P.; CHRYSSTYN, H.; CLARK, B.J.; DO, D.Q. Determination of factors controlling the particle size in nanoemulsions using Artificial Neural Networks. **European Journal of Pharmaceutical**, v. 35, p. 42-51, 2008.
- ARMSTRONG, J.S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **BioEssays**, v. 28, p. 253-260, 2006.
- ATSDR. 2000. Toxicological profile for chromium. Link:<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Brine shrimp cytotoxicity, anti-inflammatory and analgesic properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 851-861, 2012.

- CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.
- CLARKSON, C.; MAHARAJ, V.J.; CROUCH, N.R.; GRACE, O.M.; PILLAY, P.; MATSABISA, M. G.; BHAGWANDIN, N.; SMITH, P.J.; FOLB, P.I. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 177-191, 2004.
- DE SCHUTTER, K., JOUBES, J., COOLS, T., VERKEST, A., CORELLOU, F., BABIYCHUK, E., et al. *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity check point. *Plant Cell*, v.19, p. 211-225, 2007.
- DI SOTTO, A.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MAZZANTI, G. Anticlastogenic effect in human lymphocytes by the sodium salt of 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oic acid. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1294-1298, 2012.
- DOWNES, N.; FOSTER, J. Regulatory Forum Opinion Piece: Carcinogen Risk Assessment: The Move from Screens to Science. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 1064-1073, 2015.
- FARCAL, L.; TORRES ANDÓN, F.; DI CRISTO, L.; ROTOLI, B. M.; BUSSOLATI, O.; BERGAMASCHI, E.; et al. Comprehensive *in vitro* toxicity testing of a panel of representative oxide nanomaterials: first steps towards an intelligent testing strategy. **PLoS One**, v. 10, p. 127-174, 2015.
- Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A. (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test – potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: Gorsuch, J. W. (Ed.), ASTM (American Society of Testing Materials) Special Technical Publication 1216. **Environmental Toxicology and Risk Assessment**, p. 331-345, 1993.
- FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv, Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 253-260, 2006.
- GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J *et al.* Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, p. 23-32, 2014.
- GUZMAN, A.; GARCIA, C.; MARIN, A.P.; PROUDLOCK, R.J.; FERNANDEZ DE HENESTROSA, A.R.; RUIZ, M.T.; et al. Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand candidates. **Mutation Research**, v. 653, p. 91-98, 2008.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J.M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M.J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, p. 20-24, 2012.
- ISLAM, M.T., STRECK, L., PAZ, M.F.C.J., SOUSA, J.M.C., ALENCAR, M.V.O.B., MATA, A.M.O.F., CARVALHO, R.M., SANTOS, J.V.O., SILVA-JUNIOR, A.A., FERREIRA, P.M.P., MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-15, 2016a.

ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M.T.; SANTOS, J.V.O.; FERREIRA, J.R.O.; SOUSA, J.M.C.; PAZ, M.F.C.J.; CARVALHO, R.M.; et al. A Possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v.9, p. 1-11, 2016b.

KUŹMA, Ł.; WYSOKIŃSKA, H.; SIKORA, J.; OLSZEWSKA, P.; MIKICIUK-OLASIK, E.; SZYMAŃSKI, P. Taxodione and Extracts from *Salvia austriaca* Roots as Human Cholinesterase Inhibitors. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 234-242, 2016.

LÓPEZ-CAMARILLO, C.; LOPEZ-CASAMICHANA, M.; WEBER, C.; GUILLEN, N.; OROZCO, E.; MARCHAT, L.A. DNA repair mechanisms in eukaryotes: special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. **Infection, Genetics and Evolution**, v 9, p. 1051-1056, 2009.

MAJEWSKA, A.E.; WOLSKA, E.; SLIWINSKA, M.; FURMANOWA, N.; URBANSKA, A.; PIETROSIUK, A.; ZOBEL, A.; KURAN, M. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. **Caryology**, v. 56, p. 337-351, 2003.

MANNUSS, A.; TRAPP, O.; PUCHTA, H. Gene regulation in response to DNA damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 154-165, 2012.

MATSUDA, H.; GOMI, R.T.; HIRAI, S.; EGASHIRA, Y. Effect of Dietary Phytol on the Expression of alpha-Amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde Decarboxylase, a Key Enzyme of Tryptophan-niacin Metabolism, in Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, p. 1416-1419, 2013.

MESI, D. A.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, v. 8, p. 19-26, 2013.

MEYER, B.N.; FERRINGNI, N.R.; PUAM, J.E.; LACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

NAIDU, J.R.; ISMAIL, R.; SASIDHARAN, S. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 101-107, 2014.

NICOLELLA, H.D.; DE OLIVEIRA, P.F.; MUNARI, C.C.; COSTA, G.F.; MOREIRA, M.R.; VENEZIANI, R.C.; TAVARES, D.C. Differential effect of manool--a diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 8-12, 2014.

O'ZKARA, A.; AKYIL, D.; YASIN EREN, Y.; ERDOĞMUS, S.F. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, v. 67, p. 783-791, 2015.

OLIVA, M.M.; GALLUCCI, N.; ZYGADLO, J.A.; DEMO, M.S. Cytotoxic Activity of Argentinean Essential Oils on *Artemia salina*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 259-262, 2008.

ONOUE, S.; YAMADA, S.; CHAN, H.K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. **International Journal of Nanomedicine**, v. 20, p. 1025-1037, 2014.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D.J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, p. 95-102, 2012.

- PANDA, B.B.; ACHARY, M.M. Mitogen-activated protein kinase signal transduction and DNA repair network are involved in aluminum-induced DNA damage and adaptive response in root cells of *Allium cepa* L. **Frontiers in Plant Sciences**, v. 5, p. 1-10, 2014.
- PANDEY, R.M. Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. **Cytology and Genetics**, v. 42, p. 373-377, 2008.
- QIN, R.; WANG, C.; CHEN, D.; BJÖRN, L.O.; LI, S. Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. involves disturbances in cell division and DNA damage. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, p. 1045-1055, 2015.
- RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 20, 2015.
- RUCINSKA, R.; SOBKOWIAK, R.; GWOZDZ, E.A. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 519-528, 2004.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, v. 1, 621-632, 2005.
- SAGE, E.; HARRISON, L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell Survival. **Mutation Research**, v. 711, p. 123-133, 2011.
- SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 539-549, 2007.
- SHAH, M.A.; BOSCO, S.J.D.; MIR, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21-33, 2014.
- SHARMA, N.; GUPTA, P.C.; SINGH, A.; RAO, C.V. Brine shrimp Bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. and *Ipomoea carnea* Jacq. leaves. **Der Pharmacia Lettre**, v. 5, p. 162-167, 2013.
- SHARMA, S.; VIG, A.P. Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diuron and quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. **Terrestrial Aquatic and Environmental Toxicology**, v. 6, p. 90-95, 2012.
- TURKEZ, H.; TATAR, A.; HACIMUFTUOGLU, A.; OZDEMIR, E. Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. **Acta Biochimica Polonia**, v. 57, p. 95-97, 2010.
- TURKOGLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 224-230, 2012.
- ULM, R.; REVENKOVA, E.; DI SANSEBASTIANO, G.-P.; BECHTOLD, N.; PASZKOWSKI, J. Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. **Genes and Developments**, v. 15, p. 699-709, 2001.
- WATERS, M.D.; JACKSON, M.; LEA, I. Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. **Mutation Research**, v. 705, p. 184-200, 2010.
- WATTERS, D.J. Oxidative stress in ataxia telangiectasia. **Redox Report**, v. 8, p. 23-29, 2003.
- WEBSTER, P.L.; MACLEOD, R.D. The root apical meristem and its margin. In: Waishel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) Plant roots. **The hidden half**, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, p. 51-76, 1996.

WESTPHAL, G.A.; BÜNGER, J.; LICHEY, N.; TAEGER, D.; MÖNNICH, A.; HALLIER, E. The benzene metabolite para-benzoquinone is genotoxic in human, phorbol-12-acetate-13-myristate induced, peripheral blood mononuclear cells at low concentrations. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 721-729, 2009.

YANG, J.; YU, Y.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. **Mutation Research**, v. 543, p. 31-58, 2003.

YEN, W.J.; WANG, B.S.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, 2005.

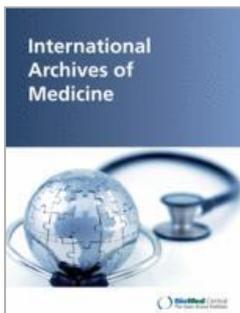
YILDIZ, M.; CIG̃ERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, p. 934-938, 2009.

ZEIGER, E.; GOLLAPUDI, B.; AARDEMA, M.J.; AUERBACH, S.; BOVERHOF, D.; CUSTER, L.; et al. Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: an ILSI-HESI workshop report. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, p. 277-285, 2015.



Capítulo 2

Artigo publicado no periódico:



A possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway.

International Archives of Medicine, v. 9, p. 1-11, 2016.

[IF: 0.97; QUALIS B2 para Biotecnologia] Apêndice D.

Islam MT, Santos JVO, Sousa JMC, Paz MFCJ, Carvalho RM, Lima RMT, Silva MBS, Alencar MVOB, Ferreira PMP, Dantas SMM, Melo-Cavalcante AA.

4 CAPÍTULO 2: Efeito citoprotetor do fitol na inibição de estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio

4.1 Resumo

Este estudo teve por objetivo avaliar possíveis vias de citotoxicidade e /ou de efeitos citoprotetor do fitol, um óleo essencial diterpenoide. O bioensaio de letalidade em *Artemia salina* e o teste de hemólise foram os sistemas teste. O fitol foi testado nas concentrações de 40, 80 e 160 µM e 2, 4 e 8 mM, de forma isolada e em cotratamento com: (1) ácido etileno diamino tetra-acético (lise de membranas); (2) dicromato de potássio (oxidante); (3) sulfato de cobre (citogenotóxico) e (4) ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (antioxidante celular). Para verificar a atividade citotóxica dependente do tempo de ação do fitol, a mortalidade da *A. salina* foi mensurada às 24 e 48h de exposição. O teste de hemólise foi realizado em eritrócitos de ratos tendo o trolox como um padrão. Os resultados sugerem que o fitol não é citotóxico em baixas concentrações (40, 80 e 160 µM), mas tóxico/citotóxicos em altas concentrações (4 e 8 mM) para *A. salina* e eritrócitos de ratos. Foi observada uma citotoxicidade aumentada durante de 24 a 48h de exposição em *A. salina*. Em ambos os sistemas teste, os grupos cotratados com citotóxicos, oxidantes, citogenotóxicos e antioxidantes sugerem que o fitol, em altas concentrações, pode agir como oxidante/pró-oxidante, induzir lise de membranas e citotoxicidade. Entretanto, em baixas concentrações, pode ser considerado como citoprotetor, possivelmente associado a mecanismos antioxidantes, via remoção de radicais. Os dados apontam que o fitol, dependendo de suas concentrações, pode ser constituinte químico para formulações farmacêuticas como antitumoral e na prevenção de estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Artemia salina*; Citoprotetor; Estresse oxidativo; Fitol; Toxicidade.

4.2 Introdução

Frequentemente, os óleos essenciais (EOs) são mais antioxidantes e citotóxicos do que genotóxicos. Os OEs diterpênicos também são bem conhecidos com esse tipo de atividade. No entanto, eles muitas vezes não têm alvos celulares específicos, provavelmente devido à sua elevada hidrofobicidade, o que torna as membranas celulares facilmente permeáveis (BAKKALI et al., 2008). O fitol (FIT) (3,7,11,15-tetrametil-1-hexadeceno-2-ol) é um diterpenoide com diversos efeitos farmacológicos, tais como antioxidante, antimicrobianos, citotóxicos e genotóxicos (ISLAM et al., 2015).

O bioensaio de letalidade em *Artemia salina*, um artrópode, vem sendo aplicado na avaliação tóxica/citotóxica de uma grande variedade de substâncias sintéticas, semi-sintéticas e naturais de origens inorgânicas e orgânicas, devido à sua rapidez, confiabilidade, economia, simplicidade, conveniência e aplicabilidade (MEYER et al., 1982; BARAVALLIA; VAGHASIYA; CHANDA, 2012). Artificialmente, os cistos do microcrustáceos são submetidos à produção de náuplios em solução salina. Os náuplios vivos entre 24 e 48h de formação são considerados os mais suscetíveis às substâncias teste. Finalmente, a porcentagem da letalidade é determinada por meio da comparação da média de sobrevivência das larvas nas amostras testadas e controladas (MEYER et al., 1982).

O teste de hemólise em eritrócitos de ratos também é um método para testar citotoxicidade e capacidade antioxidante de uma grande variedade de substâncias (GIRISH; VASUDEVARAJU; PRASADARAO, 2012). A estabilidade do teste é fortemente afetada por um número de fatores externos ou internos, como temperatura, tipo e quantidades de substâncias químicas. Em busca de atividades antioxidantes, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um forte indutor de radical hidroxila ($\bullet OH$), podendo ser usado para induzir estresse oxidativo sobre *A. salina*. O $\bullet OH$, eventualmente, liga-se com íons metálicos aleatoriamente distribuídos no DNA, ocasionando danos nessa molécula por meio de oxidações e quebras de fitas simples (SAGE; HARRISON, 2011). O objetivo do estudo foi de avaliar as possíveis vias de citotoxicidade e/ou citoproteção do FIT em cotratamento com agentes químicos citotóxicos, oxidantes, citogenotóxicos e antioxidantes, com aplicação dos sistemas teste *A. salina* e hemólise em eritrócitos de ratos.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Reagentes e produtos químicos

O Tween-80 (0,05%), dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%), serviu como veículo para FIT e para o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), enquanto que água destilada foi utilizada como solvente para outros reagentes. O FIT, ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), dicromato de potássio, sulfato de cobre e todos os reagentes e produtos químicos necessários utilizados neste estudo foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.3.2 Cistos de Microcrustáceos

Para a preparação dos experimentos com *Artemia salina*, os cistos de microcrustáceos foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de cancerologia experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

4.3.3 Preparação de amostras para o bioensaio de letalidade em *A. salina*

No teste com *A. salina*, o FIT, os citotóxicos (EDTA, KD, CS) e o trolox foram preparados em 40, 80 e 160 μM na etapa 1; enquanto que, na etapa 2, foram preparados em 2, 4 e 8 mM. Na etapa 3, as concentrações do FIT foram de 40, 80 e 160 μM e 2, 4 e 8 mM, como descrito o quadro a seguir.

Quadro 1. Cotratamento do FIT com agentes químicos citotóxicos, oxidantes, citogenotóxicos e antioxidantes.

ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
Citoproteção em <i>A. salina</i> 40, 80 e 160 μM	Citoproteção em <i>A. salina</i> 2, 4 e 8 mM	Citotoxicidade dependente do tempo e concentração
Tratamento/grupo	Tratamento/grupo	Tratamento/grupo
I: FIT*	XII: FIT**	I: FIT*
II: EDTA*	XIII: FIT**+EDTA	XII: FIT**
III: DK*	XIV: FIT**+DK	
IV: SC*	XV: FIT**+SC	
V: FIT*+EDTA	XVI: FIT**+TRO	
VI: FIT*+DK	XVII: FIT**+TRO+DK	
VII: FIT*+SC	XVIII: FIT**+TRO+SC	
VIII: TRO*+DK		
IX: TRO*+SC		
X: DK*+FIT+TRO		
XI: SC*+FIT+TRO		

*concentrações 40-160 μM ; **concentrações 2-8 mM; ausência de asterisco indica concentração de 80 μM (exceto CN); FIT: fitol; EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético; DK: dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$); SC: sulfato de cobre ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); TRO: Trolox.

A mortalidade de *A. salina* foi quantificada após 24h nas etapas 1 e 2; e, após 24 e 48h, para a etapa 3. Os experimentos foram conduzidos juntamente com um controle negativo (veículo, CN), diferentes concentrações das substâncias teste num conjunto de três tubos por concentração. Junto com a letalidade percentual, os valores de CL₅₀ (concentração que causa 50% de mortalidade) foram obtidos a partir da linha traçada com a melhor relação entre os valores de letalidade.

4.3.4 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina*

Este ensaio foi realizado de acordo com MEYER e colaboradores (1982), com algumas modificações. Resumidamente, foram incubados cistos do microcrustáceo (*A. salina*) em um béquer contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada, sob pH de 8,5 utilizando Na₂CO₃ 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48h a 27 ± 3°C. Após incubação, os náuplios ativos, livres de conchas do microcrustáceo, foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. Em cada experimento, adicionou-se 0,5 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão, sob a luz os náuplios sobreviventes foram contados.

4.3.5 Teste de hemólise em eritrócitos de ratos

O teste de hemólise foi realizado com FIT e/ou TRO com as concentrações de 40, 80 e 160 µM e 2, 4 e 8 mM. Em todos os casos, todos os cotratamentos foram feitos na concentração de 80 µM. O teste de inibição da HL foi realizado em ratos *Wister* albinos de oito semanas de idade (*Rattus norvegicus*, com peso corporal entre 180 e 220 g), obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam livre acesso a alimentos (Purina, Brasil) e água *ad libitum* e foram mantidos sob iluminação controlada (12 H de luz / luz) a 24 ± 2 °C. Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal do Piauí sob nº 109/14.

4.3.6 Indução de hemólise em eritrócitos de ratos por peróxido de hidrogênio

Para testar a inibição de hemólise induzida por H₂O₂, recolheu-se o sangue do plexo retro-orbital de ratos *Wistar* anestesiados (35 mg/kg pentobarbital sódico, intraperitoneal). Os sistemas-teste de RBCs foram preparados em 10% de suspensão em solução tampão fosfato (PBS) PH 7,4). Em seguida,

adicionou-se 0,15 mL de H₂O₂ (200 mM em PBS, pH 7,4) e 0,2 mL de solução da amostra foi adicionada em 0,5 mL de suspensão RBCs a 10%. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 30 minutos e imediatamente centrifugada a 2500 rpm durante 3 minutos. Em seguida, foram misturados 0,2 mL do sobrenadante com 2,8 mL de PBS (pH 7,4) e a absorbância foi medida a 475 nm (GIRISH; VASUDEVARAJU; PRASADARAO, 2012). Para o CN, adicionou-se 0,2 mL do veículo. A taxa percentual de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula, tendo em conta que 100% de hemólise foi induzida por H₂O₂ (branco):

$$\text{Inibição da hemólise (\%)} = \frac{[(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) \times 100]}{\text{Abs branco}}$$

Onde, “Abs branco” é a absorbância de controle com 100% de hemólise induzida por H₂O₂; e “Abs amostra” é a absorvância de alíquotas contendo várias concentrações da amostra a ser estudada. Este experimento foi conduzido com os grupos como - FIT *, TRO * e FIT * + TRO. O asterisco (*) indica tratamento com 40-160 µM e 2-8 mM; enquanto a ausência de (*), indica 80 µM.

4.3.7 Estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Para a determinação das diferenças, os dados foram comparados pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls (p <0,05).

4.4 Resultados

4.4.1 Atividades citotóxica/citoprotetora do FIT em *A. salina*

A **Tabela 1** indica a etapa 1 do tratamento em que os grupos (Grupos-I a XI) são tratados com FIT, com um desestabilizador de membrana (EDTA), com um oxidante (KD), com um composto citotóxico e genotóxico (CS) e um citoprotector (TRO). A mortalidade foi contada após uma exposição de 24h, indicando que o FIT (Grupo I), em todas as doses testadas, não foi citotóxico. O EDTA (Grupo II), o desestabilizador de membrana gerou 3,33% de mortalidade sob a dose de 160 µM. A maior citotoxicidade foi observada no Grupo III, tratado com KD. A KD a 40, 80 e 160 µM exibiu percentual de mortalidade 13,33 ± 0,58, 23,33 ± 0,58 e 26,67 ± 0,58, respectivamente.

O grupo tratado com CS (Grupo IV) também produziu citotoxicidade sobre os náuplios. No entanto, a atividade foi menor que a Grupo III. O CS produziu a maior porcentagem de mortalidade, 20,00

$\pm 1,00$, na dose de 160 μM . Os grupos FIT tratados com 80 μM de EDTA (Grupo V), KD (Grupo VI) e CS (Grupo VII) aumentaram o percentual de mortalidade, respectivamente na ordem de Grupos: VI > VII > V, onde Grupo V foi quase semelhante ao grupo tratado apenas com EDTA (Grupo II). TRO a 40-160 μM , quando cotratado com 80 μM de KD (Grupo VIII), apresentou um maior efeito citoprotetor do que CS (Grupo IX). O KD (Grupo X) e o CS (Grupo XI) foram cotratados com FIT (80 μM) + TRO (80 μM), onde o Grupo XI, diferente de Grupo X, permaneceu inalterado quanto à taxa de mortalidade dos náuplios, levando-se em conta a comparação aos grupos VII e IX.

Tabela 1. Efeitos citoprotetores do FIT em baixas concentrações em *A. salina*.

Tratamento/grupo	% mortalidade			CL ₅₀ [IC, r ²]
	40 μM	80 μM	160 μM	
I: FIT*	0,0 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	-
II: EDTA*	0,0 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,3 \pm 0,5	104,4 [-,-]
III: DK*	13,3 \pm 0,5	23,3 \pm 0,5	26,6 \pm 0,5	40,0 \pm 0,2 [28,8-55,7, 0,99]
IV: SC*	3,3 \pm 0,5	13,3 \pm 1,1	20,0 \pm 1,0	64,6 \pm 0,5 [35,2-118,6, 0,99]
V: FIT* + EDTA	0,0 \pm 0,0	3,3 \pm 0,5	6,6 \pm 0,5	80,1 \pm 1,0 [very wide, 1,00]
VI: FIT* + DK	6,6 \pm 0,5	10,0 \pm 1,0	16,6 \pm 0,5	53,6 \pm 0,9 [3,0-943,0, 0,89]
VII: FIT* + SC	3,3 \pm 0,5	10,0 \pm 1,0	16,6 \pm 0,5	66,8 \pm 0,7 [20,7-215,5, 0,98]
VIII: TRO* + DK	3,3 \pm 0,5	6,6 \pm 0,5	13,3 \pm 0,5	70,5 \pm 1,2 [6,5-765,9, 0,98]
IX: TRO* + SC	3,3 \pm 0,5	6,6 \pm 0,5	16,6 \pm 0,5	82,8 \pm 2,1 [7,8-872,8, 0,92]
X: DK* + FIT+TRO	3,3 \pm 0,5	3,3 \pm 0,5	10,0 \pm 1,0	78,0 \pm 2,0 [0,5-1198,6, 0,72]
XI: SC* +FIT+TRO	3,3 \pm 0,5	6,6 \pm 0,5	16,6 \pm 0,5	82,8 \pm 2,1 [7,8-872,8, 0,92]
CN (0,5 mL de veículo)		0,0 \pm 0,0		-

*concentrações 40, 80, 160 μM ; ausência de asterisco indica concentração de 80 μM (exceto CN); FIT: fitol; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; DK: dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$); SC: sulfato de cobre ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); TRO: Trolox; CN: controle negativo (0,05% tween-80 dissolvido em 0,9% de NaCl). Valores representam média \pm desvio padrão; CL₅₀: concentração com 50% de letalidade; IC: intervalo de confiança (95%); r²: coeficiente de determinação.

Na etapa 2, o Grupo XII, tratado com FIT em 2, 4 e 8 mM, apresentou porcentagem de mortalidade em 10,00 \pm 1,00, 23,33 \pm 0,58 e 43,33 \pm 1,15, respectivamente, às 24h. Com uma exceção com a dose de 8 mM, o FIT no Grupo XIII cotratado com 80 μM de EDTA, produziu taxas de mortalidade semelhantes ao Grupo XII. No entanto, o FIT, quando cotratado com KD (80 μM) (Gr-XIV), diminuiu as taxas de mortalidade, onde a porcentagem de mortalidade foi calculada como 6,67 \pm 0,58, 20,00 \pm 1,00 e 33,33 \pm 0,58 com o 2, 4 e 8 MM de FIT, respectivamente. O Grupo XV sugere que o FIT (2, 4 e 8 mM) cotratado com CS (80 μM) produz as taxas de mortalidade semelhantes (com uma exceção com a dose

4 mM) às do Grupo XIII, tratadas com EDTA. O FIT cotratado com TRO (80 µM) (Grupo XVI) aumentou as taxas de mortalidade da *A. salina* em todas as doses; a maior porcentagem de mortalidade foi observada a 8 mM por $46,67 \pm 0,58$. Grupo XVII refere o cotratamento de FIT com TRO (80 µM) + KD (80 µM) em que a mortalidade foi encontrada entre o Grupo XIV e o Grupo XII. No entanto, o FIT quando cotratado com TRO (80 µM) + CS (80 µM) (Grupo XVIII) provoca um aumento da mortalidade em concentrações de 2 e 4 mM, mantendo-se inalterado a 8 mM em comparação com o Grupo XII. Uma taxa de mortalidade aumentada em Gr-XVIII também foi observada quando comparada com Grupo XV (FIT tratado com CS) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos citoprotetores do FIT em altas concentrações em *A. salina*.

Tratamentos	% mortalidade			CL ₅₀ [IC, r ²]
	2 mM	4 mM	8 mM	
XII: FIT**	10,0 ± 1,0	23,3 ± 0,5	43,3 ± 1,1	3,4 ± 1,0 [0,5-22,5, 0,95]
-XIII: FIT** + EDTA	10,0 ± 0,0	23,3 ± 0,5	40,0 ± 1,0	3,2 ± 0,8 [0,6-17,1, 0,96]
-XIV: FIT** + DK	6,6 ± 0,5	20,0 ± 1,0	33,3 ± 0,5	3,3 ± 0,7 [1,0-10,7, 0,98]
-XV: FIT** + SC	10,0 ± 1,0	26,6 ± 0,5	40,0 ± 1,0	3,0 ± 0,6 [1,1-8,2, 0,99]
-XVI: FIT** + TRO	16,6 ± 0,5	33,3 ± 0,5	46,6 ± 0,5	3,1 ± 1,2 [0,08-118,6, 0,84]
-XVII: FIT** + TRO+DK	13,3 ± 0,5	30,0 ± 1,0	36,6 ± 0,5	2,4 ± 0,2 [1,6-3,5, 0,99]
-XVIII: FIT** + TRO+SC	13,3 ± 0,5	30,0 ± 1,0	43,3 ± 0,5	2,7 ± 0,5 [0,9-8,3, 0,98]
CN (0,5 mL de veículo)		3,3 ± 0,5		-

**concentrações 2, 4 e 8 mM; ausência de asterisco indica concentração de 80 µM (exceto CN); FIT: fitol; EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético; DK: dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇); SC: sulfato de cobre (Cu₂SO₄.5H₂O); TRO: Trolox; CN: controle negativo (0,05% tween-80 dissolvido em 0,9% de NaCl). Valores representam média ± desvio padrão; CL₅₀: concentração com 50% de letalidade; IC: intervalo de confiança (95%); r²: coeficiente de determinação.

Os dados apresentados na Tabela 3 são para a etapa 3, no qual Grupo I e Grupo XII foram prolongados por mais 24h para contar a mortalidade dos náuplios. Os dados sugerem que o FIT, em baixas concentrações (40, 80 e 160 µM, Gr-I), não induz a mortalidade de náuplios. No entanto, as concentrações de 2, 4 e 8 mM de FIT aumentaram as taxas de mortalidade, respectivamente em 33,3, 66,7 e 33,4%. Não houve mortalidade observada em *Artemia salina* no CN tratado apenas com o veículo por 24 e 48h.

Tabela 3. Citotoxicidade do fitol, tempo e concentração dependente em *A. salina*.

Tratamentos/h	% mortalidade			CL ₅₀ [IC, r ²]
	40 µM	80 µM	160 µM	
FIT 24 h	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0.0 ± 0.0	-
FIT 48 h	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0.0 ± 0.0	-
	% mortalidade			
	2 mM	4 mM	8 mM	
FIT 24 h	10,0 ± 1,0	23,3 ± 0,5	43.3 ± 1.1	3.4 ± 1.0 [0.5-22.5, 0.95]
FIT 48 h	13,3 ± 0,5	30,0 ± 1,0	46.6 ± 0.5	2.9 ± 0.7 [0.7-12.0, 0.97]
	% mortalidade			
CN (0,5 mL de veículo) 24 h		0,0 ± 0,0		-
CN (0,5 mL de veículo) 48 h		0,0 ± 0,0		-

FIT: fitol; CN: controle negativo (0,05% tween-80 dissolvido em 0,9% de NaCl). Valores representam a média ± desvio padrão; CL₅₀: concentração com 50% de letalidade; IC: intervalo de confiança (95%); r²: coeficiente de determinação.

4.4.2 Citotoxicidade e atividade antioxidante do FIT em eritrócitos de ratos

Os dados apresentados na **Tabela 4** indicam que todos os grupos de tratamento inibem a lise dos glóbulos vermelhos. No grupo FIT (*), a maior inibição de HL foi observada com 160 µM por 58,85 ± 0,01; enquanto a menor, com 8 mM por 10,61 ± 0,01. A inibição da lise pelo FIT foi observada pelas concentrações na ordem 160 µM > 2 mM > 80 µM > 4 mM > 40 µM > 8 mM. Caso contrário, TRO * mostrou inibição da lise na ordem de 160 µM > 2 mM > 4 mM > 80 µM > 40 µM > 8 mM. O FIT, quando co-tratado com TRO (80 µM), exibiu a maior porcentagem de inibição de HL com 160 µM por 69,46 ± 0,01 seguida por 49,91 ± 0,01, 46,93 ± 0,01, 28,31 ± 0,01, 26,26 ± 0,01 e 15,27 ± 0,01 com 2 mM, 80 µM, 4 mM, 40 µM e 8 mM, respectivamente.

Tabela 4. Hemólise em eritrócitos induzida por estresse oxidativo.

Tratamentos	Inibição de hemólise					
	40 µM	80 µM	160 µM	2 mM	4 mM	8 mM
FIT* e FIT**	22,9 ± 0,01 ^a	30,5 ± 0,01 ^a	58,8 ± 0,01 ^a	40,4 ± 0,01 ^a	25,5 ± 0,01 ^a	10,6 ± 0,01 ^a
	CE ₅₀ : 58,7 ± 1,2 [CE: 1,2-270, r ² : 0,83]			CE ₅₀ : 5,2 ± 0,7 [CE: 1,3-20,0, r ² : 0,97]		
TRO*	32,2 ± 0,01 ^{a, b, d}	40,6 ± 0,01 ^{a, b}	64,8 ± 0,01 ^{a, b}	60,8 ± 0,01 ^{a, b, d}	48,0 ± 0,01 ^{a, b, d}	21,7 ± 0,01 ^{a, b, d}
	CE ₅₀ : 44,3 ± 1,0 [CE: 0,7-249, r ² : 0,83]			CE ₅₀ : 6,4 ± 0,3 [CE: 3,7-11,2, r ² : 0,99]		
FIT* + TRO FIT** + TRO	26,2 ± 0,0 ^{a, b}	46,9 ± 0,01 ^{a, b, c}	69,4 ± 0,01 ^{a, b, c}	49,9 ± 0,01 ^{a, b}	28,3 ± 0,01 ^a	15,2 ± 0,01 ^{a, b}
	CE ₅₀ : 51,9 ± 0,7 [CE: 9,5-282, r ² : 0,96]			CE ₅₀ : 5,1 ± 1,0 [CE: 0,5-50,8, r ² : 0,93]		
CN (veículo)	3,5 ± 0,01					

*concentrações 40, 80 e 160 µM; **concentrações 2, 4 e 8 mM; ^ap<0,05 comparado ao CN (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl); ^bp<0,05 comparado ao Grupo I; ^cp<0,05 comparado ao Grupo II; ^dp<0,05 comparado ao Grupo III (ANOVA e *t*-Student-Newman-Kewls); FIT: fitol; TRO: trolox; CE₅₀: concentração efetiva mínima 50%; IC: intervalo de confiança (95%); r²: coeficiente de determinação; valores representam a média ± desvio padrão (n=5).

4.5 Discussão

O teste com *A. salina* é amplamente utilizado como sistema de teste para avaliação primária da toxicidade de compostos brutos, bem como de isolados. Além disso, os compostos citotóxicos, com sensibilidade significativa para os náuplios, podem ser recomendados como guias para a detecção de compostos antitumorais e pesticidas (MEYER et al., 1982) e têm uma grande correlação com as linhagens celulares de tumor sólido humano. O teste também pode ser aplicado para avaliação de estágios de desenvolvimento embrionário, uma vez que os agentes testados, neste sistema, são considerados como tendo propriedades ovicidas e larvicidas. A mortalidade dos náuplios em *A. salina* refere-se: a) a atividade de detergente/desestabilizadora das substâncias de teste, que podem causar a lise ou protrusão da membrana celular, b) superprodução de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs), dano oxidativo e/ou efeitos pró-oxidativos, causando a destruição de proteínas, lípidos, DNA e outros fenômenos relacionados (MANILAL et al., 2009).

Nesta pesquisa, primeiramente realizou-se um estudo citotóxico do FIT em *A. salina*. Além disso, também foi realizado estudo de hemólise em eritrócitos, que pode ser aplicado para estudos de danos oxidativos/antioxidantes. Pela indução de •OH é possível avaliar a capacidade antirradical de substâncias. Esse mecanismo provavelmente pode ser sugerido para as atividades antimicrobiana e citotóxica do FIT (ISLAM et al., 2015).

Para uma melhor compreensão dos prováveis mecanismos de ação do FIT foram realizados estudos de cotratamento do FIT com agentes químicos citotóxicos, oxidantes, citogenotóxicos e

antioxidantes, como descrito no **Quadro 1**. Na Etapa 1 (dados apresentados na **Tabela 1**), o FIT (Grupo I), em baixas concentrações (40, 80 e 160 μM), não produziu mortalidade para *A. salina*. No Grupo II, o EDTA exibiu baixa mortalidade apenas na concentração mais elevada (160 μM), enquanto que no Grupo V, observou-se com 80 e 160 μM .

O EDTA age, principalmente, através da desestabilização da membrana por efeitos de fluidização e expansão. A intercalação de EDTA na membrana lipídica induz a curvatura da membrana. A perda de material da membrana lipídica facilita a instabilidade da membrana, levando à permeabilização de membrana e à lise celular (PRACHAYASITTIKUL et al., 2007). Embora a ação de EDTA em náuplios vivos tenha sido insignificante, o FIT a 80 μM , cotratado com EDTA, não inibiu o evento. O FIT pode não ter qualquer interação antagonista com EDTA. Além disso, um aumento insignificante nas taxas de mortalidade pode ser devido a efeitos não tóxicos do FIT a 80 μM , uma vez que o potencial de membrana é um parâmetro importante para ilustrar o mecanismo de ação das moléculas citotóxicas. Tratamentos que alteram o potencial de membrana também podem alterar funções celulares. Existem agentes que podem fazer com que os potenciais de membranas se aproximem ou tornem-se zero (ZHANG; LIU; WANG, 2016), tendo como resultado final a perda de materiais celulares, o metabolismo celular irregular e, finalmente, a morte celular. EDTA, diferente de FIT, pode agir através desta via.

O dicromato de potássio apresenta potencial oxidante. Os compostos de cromo (VI) são relatados como sendo tóxicos e carcinogênicos, uma vez que podem passar facilmente através das membranas celulares. Uma vez dentro da célula, o cromo (VI) é reduzido aos seus estados de oxidação inferiores [Cr (V)] e [Cr (IV)] e depois Cr (III), por moléculas de baixo peso molecular, redutores enzimáticos e não enzimáticos. Estes intermediários reativos de cromo são capazes de gerar um espectro completo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em excesso, podem causar danos às proteínas celulares, lipídeos, DNA e levar a um estado conhecido como estresse oxidativo (PATLOLLA et al., 2009).

Num estudo recente, Rasool e colaboradores (2014) sugerem que o dicromato de potássio produz alto nível de malondialdeído e baixos níveis de enzimas antioxidantes [catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx)] em camundongos machos, levando a danos ao DNA em células testiculares e anormalidades reprodutivas adversas em animais. Os OEs podem implicar danos sobre o DNA; um deles é o radical hidroxila que, eventualmente, liga-se a íons metálicos aleatoriamente distribuídos no DNA, tendo como consequência a indução de quebras do tipo fita simples no material genético (SAGE; HARRISON, 2011), o que também é evidente para a oxidação modificativa sobre o DNA (RUCINSKA; SOBKOWIAK; GWOZDZ, 2004). Pejın e colaboradores (2014) sugeriram que o FIT é um poderoso eliminador de radicais hidroxila, ânion superóxido, metóxi, ânion dióxido de carbono,

óxido nítrico e DPPH•. Em nosso estudo, no Grupo III tratado com KD, foram observadas maiores taxas de mortalidade em todas as concentrações testadas. No entanto, o KD em Grupo VI, Grupo VIII e Grupo X, quando cotratados com FIT (80 µM), TRO (80 µM) e FIT (80 µM) + TRO (80 µM), foi observado redução nas taxas de mortalidade dos náuplios. A atividade observada foi mais proeminente na seguinte ordem: FIT + TRO > TRO > FIT. O TRO é um conhecido antioxidante devido à sua capacidade de captura de espécies reativas de oxigênio. Assim, FIT e TRO podem, provavelmente, apresentar mecanismos antioxidantes similares.

Vale ressaltar que a formação de EROs, em sistemas biológicos, pode ser realizada por catálise de Cu²⁺, com consequente resposta citotóxica (SANS et al., 1999). O sulfato de cobre (SC) em células de *A. cepa* em cometa alcalino (pH 12,3) induziu genotoxicidade por quebras de cadeias de DNA (YILDIZ et al., 2009). Cu²⁺ é também um mediador inflamatório para as células (CLAYTON; CLAYTON, 1981). Um estudo realizado com nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) e SC, em artrópode e *Drosophila*, indicou que ambos CuONPs e SC são genotóxicos. Existe uma sugestão para estresse oxidativo mediado por danos às macromoléculas celulares (CARMONA et al., 2015). Em nosso estudo, considerando Grupos V, VII, IX e XI, deve-se dizer que SC tem efeitos tóxicos em *A. salina*. Embora haja uma taxa de mortalidade reduzida, observada no Grupos VII, IX e XI cotratados com FIT (80 µM), TRO (80 µM) e FIT (80 µM) + TRO (80 µM), mas a atividade foi quase semelhante, exceto para doses de 40 e 80 µM tratadas com 80 µM de FIT no Grupo VII. Desse modo, as atividades de FIT e TRO podem estar mais relacionadas com a neutralização de oxidantes fortes, efeitos oxidantes mediados por KD.

Na Etapa 2 (dados apresentados na **Tabela 2**), concentrações elevadas de FIT, bem como o seu cotratamento com substâncias citotóxicas, demonstraram citotoxicidade concentração-dependente. Grupo XIII (FIT + EDTA), Grupo XIV (FIT + KD), Grupo XV (FIT + CS) e Grupo XVII (FIT + TRO + KD) diminuíram a mortalidade de *A. salina*. A ordem decrescente da taxa de mortalidade foi crescente para os grupos XIV > XVII > XIII > XV. Entretanto, o FIT, cotratado com 80 µM de TRO (Grupo XVI), exibiu uma porcentagem aumentada de mortalidade dos náuplios, provavelmente devido a efeitos pró-oxidantes do FIT em altas concentrações. Evento similar foi observado no caso do Grupo XVIII, onde o FIT a 2 mM e 4 mM exibiu taxas de mortalidade elevadas, permanecendo inalteradas com 8 mM em comparação com o Grupo XII. Os OEs terpenoides também são bons exemplos de antioxidantes. Em doses baixas, estes tipos de OEs podem atuar como protetores celulares à medida que eliminam espécies reativas prejudiciais à membrana celular. Os OEs são hidrofóbicos na natureza, e, em altas concentrações, são capazes de atravessar a célula, bem como a membrana mitocondrial podendo destruir as moléculas celulares essenciais e material genético (BAKKALI et al., 2008).

Bakkali e colaboradores (2008) também sugerem que, em células eucarióticas, os EOs podem provocar despolarização das membranas mitocondriais, diminuindo o potencial da membrana. Isto afeta

o ciclismo iônico de Ca^{++} e outros canais iônicos, eventualmente reduzindo o gradiente de pH, afetando a bomba de prótons, o estoque de ATP, e alterando a fluidez das membranas. Este último efeito faz com que as membranas se tornem anormalmente permeáveis, resultando em fuga de radicais, citocromo C, Ca^{++} e proteínas, resultando, assim, em estresse oxidativo e falha bioenergética. A permeabilização das membranas mitocondriais externas e internas leva à morte celular por apoptose e necrose. Como Grupo XIII e Grupo XV foram tratados com o oxidante KD, a redução da mortalidade dos náuplios pode ser devido às capacidades antioxidantes e pró-oxidantes do FIT. Além disso, os resultados do Grupo XIV são a confirmação do efeito pró-oxidativo em altas concentrações.

No entanto, considerando o Grupo IV e o XI, podemos dizer que o SC produz efeitos tóxicos sobre náuplios, o que pode estar relacionado à sua citotoxicidade mediada pelo estresse oxidativo. De acordo com López-Camarillo e colaboradores (2009), quebras de fitas duplas em eucariontes (DSBs) podem ser reparadas por recombinação homóloga e por união não homóloga. Assim, os grupos VII, IX, XI e XV, cotratados com FIT e/ou TRO, podem proteger as células de *A. salina* contra o estresse oxidativo mediado por este tipo de evento. Contudo, as atividades citotóxicas dos OEs ou dos seus componentes principais são por vezes ativadas pela luz e podem induzir a formação de adutos. Os OEs fototóxicos são capazes de atravessar a membrana celular sem causar danos a ela ou às macromoléculas celulares. No entanto, podem reagir e formar radicais dentro da célula, após exposição à luz. A fototoxicidade dos OEs depende dos tipos de compostos presentes neles, concentração e sua localização na célula, bem como se eles produzem ou não diferentes tipos de radicais após a exposição à luz (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Ghaneian e colaboradores (2015), o FIT produziu toxicidade dependente de tempo em ratos albinos. É bem sabido que o teste em *A. salina* é um sistema de teste dependente da luz como para a manutenção contínua da luz e da temperatura é essencial junto com o balanço do eletrólito e o pH para a suscetibilidade dos náuplios. Neste estudo, os Grupos I e XII na Etapa 3 (**Tabela 3**) apontam que o FIT, em concentrações mais elevadas, é citotóxico; e a toxicidade depende do tempo de exposição deste OE diterpênico. Assim, nossos resultados podem estar relacionados à atividade citotóxica observada em *Schistosoma mansoni* por Moraes e colaboradores (2014) e Ghaneian e colaboradores (2015). No entanto, a exposição a OEs poderia induzir danos mitocondriais e ao DNA, formação de deficiência respiratória devido a pequenas mutações citoplasmáticas em que, exponencialmente, aumentam em células mais sensíveis (BAKKALI et al., 2008). Dessa maneira, o FIT pode também ocasionar a mortalidade dos náuplios.

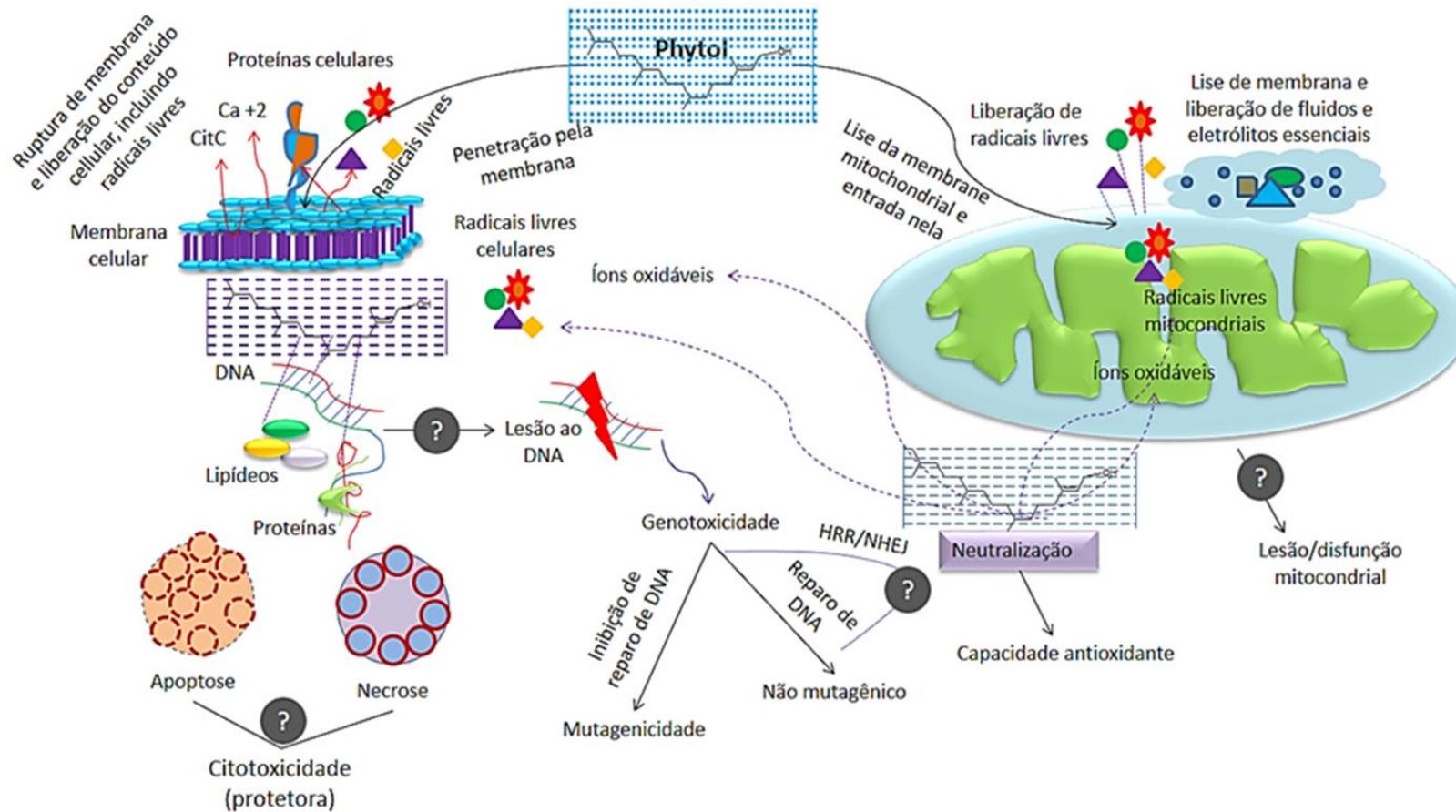
De outra forma, o FIT a 80 μM como cotratamento com o Grupos VI, VII, X e XI, diferente do isolado, reduziu a porcentagem de mortalidade dos crustáceos; o que também foi observado em Grupos XIV e XVII, cotratados com KD (80 μM) e TRO (80 μM) + KD (80 μM), respectivamente. O FIT tem um

grupo hidroxila (-OH) na sua posição C1. De acordo Gyawali e Ibrahim (2014), as substâncias com grupamento -OH ativo apresentam potencial antioxidante, mas também podem causar citotoxicidade. Os OEs terpenoides são os melhores exemplos (BAKKALI et al., 2008). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um oxidante forte bem conhecido, uma vez que, potencialmente, produz •OH, e que pode estar causando estresse aos RBCs no ensaio de hemólise (GIRISH; VASUDEVARAJU; PRASADARAO, 2012). Em nossos estudos, o FIT possui potencial redutor significativo (p <0,05) de •OH até 4 mM. Embora a atividade observada seja inferior à tratada com TRO em concentrações semelhantes, mas o FIT, quando cotratados com TRO (80 µM), aumentou, significativamente, a porcentagem de inibição de HL com todas as concentrações de ensaio em comparação com os grupos CN e FIT.

Interessantemente, o FIT, em adição ao TRO (80 µM) em concentrações de 2-8 mM, produziu taxa de inibição dentro dos grupos FIT e TRO. Considerando a inibição de hemólise, os tratamentos com 40 µM apontam que o FIT, em concentração muito baixa, é incapaz de combater o potencial do OH proveniente do H₂O₂, diminuindo a proteção de *A. salina* da lise mediada pelo estresse oxidativo. No entanto, o FIT, em concentrações elevadas (4 e 8 mM), também reduz a proteção. Isto pode estar relacionado com a alta concentração mediada pela lise de membrana e citotoxicidade observada em *A. salina*. Por fim, ao considerar o Grupo VI em comparação aos Grupos IX, X, XI, XVI a GXVIII e todos os grupos-teste apresentados no ensaio de hemólise, pôde-se assegurar que o FIT produziu atividade semelhante ao TRO.

Em síntese, o FIT (**Figura 1**), em baixa concentração, atua como um redutor de radicais, protegendo a célula contra efeitos prejudiciais induzidos pelo estresse oxidativo, demonstrando, assim, sua atividade antioxidante. Mas, em alta concentração, devido à alta hidrofobicidade, atravessa facilmente as membranas celulares e mitocondriais, causando a perda de elementos essenciais à célula, alterando o potencial de membrana, neutralizando espécies reativas e, eventualmente, causando autodestruição de estruturas celulares, como proteínas, lípidos e DNA; o que leva à cito/genotoxicidade e à disfunção mitocondrial, bem como eventos mutagênicos (ISLAM et al. 2016b).

Figura 1. Eventos toxicológicos do fitol. [*FIT em baixa concentração*: atua como neutralizador de radicais livres e protetor celular contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo, portanto, possuindo ação antioxidante. *FIT em alta concentração*: devido sua elevada lipofilicidade, poderá atravessar a membrana celular e mitocondrial, desencadeando perda de constituintes celulares essenciais e permitindo entrada de toxinas externas; neutraliza espécies reativas de oxigênio e, eventualmente, ocasiona autodestruição de macromoléculas celulares como – proteínas, lipídeos e DNA; Portanto, induz cito-/genotoxicidade e disfunção mitocondrial. Danos genotóxicos, se permanecerem não reparados, podem desencadear eventos mutagênicos.]



4.6 Conclusão

A citotoxicidade foi induzida pelo FIT em *A. salina* e em eritrócitos de ratos em concentrações mais elevadas. No entanto, a atividade citoprotetora em baixas concentrações, que, provavelmente, pode ser sugerida por mecanismos antioxidantes. Entretanto, a citotoxicidade, possivelmente pode ser relacionada a eventos de lise e a alterações de potenciais de membranas, aumento permeabilidade celular, indução de apoptoses e necroses, alterações no ciclo celular e/ou efeitos pró-oxidantes. O efeito citoprotetor do FIT é dependente da concentração, enquanto a citotoxicidade parece ser devido não apenas à concentração, mas também ao tempo de exposição, como identificado nos sistemas teste aplicados. As atividades citotóxica/citoprotetoras e oxidante/antioxidantes são relevantes para formulações farmacêuticas.

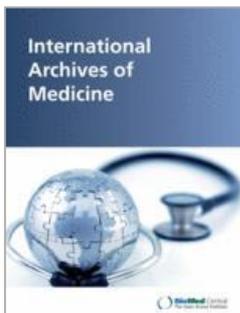
Referências

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARAVALLIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Brine Shrimp Cytotoxicity, Anti-inflammatory and analgesic properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz Flowers. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 851-861, 2012.
- CARMONA, E.R.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; OBANDO, V.; RUBIO, L.; MARCOS, R. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 791, p. 1-11, 2015.
- CLAYTON, G. D.; CLAYTON, F.E. **Patty's industrial hygiene and toxicology**. Third edition. Vol. 2, Part 6 Toxicology. NY: John Wiley and Sons, ISBN 0-471-01280-7, 1981.
- GHANEIAN, M.T.; EHRAMPOUSH, M.H.; JEBALI, A.; HEKMATIMOGHADDAM, S.; MAHMOUDI, M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, v. 2, p. 13-16, 2015.
- GIRISH, T.K.; VASUDEVARAJU, P.; PRASADARAO, U.J.S. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vignamungo* L.) husk extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1690-1696, 2012.
- ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.
- ISLAM, M.T.; STRECK, L.; PAZ, M.F.C.J.; SOUSA, J.M.C.; ALENCAR, M.V.O.B.; MATA, A.M.O.F.; CARVALHO, R.M.; SANTOS, J.V.O.; SILVA-JUNIOR, A.A.; FERREIRA, P.M.P.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-15, 2016.
- LO'PEZ-CAMARILLO, C.; LOPEZ-CASAMICHANA, M.; WEBER, C.; GUILLEN, N.; OROZCO, E.; MARCHAT L.A. DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoebahistoltytica* and

- related protozoan parasites. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1051-1056, 2009.
- MANILAL, A.; SUJITH, S.; SEGHAL, K.G.; SELVIN, J.; SHAKIR, C. Cytotoxic potentials of red alga, *laurenciabrandenii* collected from the Indian coast. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 90-94, 2009.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSON, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MORAES, J.; OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.G.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S.M.; PINTO, P.L.S. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e2617, 2014.
- PATLOLLA, A.K.; BARNES, C.; HACKETT, D.; TCHOUNWOU, P.B. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. **International Journal of Environmental Research, Public Health**, v. 9, p. 63-653, 2009.
- PEJIN, B.; SAVIC, A.; SOKOVIC, M.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; NIKOLIC, M.; RADOTIC, K.; MOJOVIC, M. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. **Natural Product Research**, v. 28, p. 372-376, 2014.
- PRACHAYASITTIKUL, V.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; TANTIMONGCOLWAT, T.; NANTASENAMAT, C.; GALLA, H.J. EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: biophysical studies on artificial lipid membranes. **Acta Biochimica e Biophysica Sin (Shanghai)**, v. 39, p. 901-913, 2007.
- RASOOL, M.; ZAIGHAM, K.; MALIK, A.; NASEER, M.I.; UMM-E-HABIBA, A.; MANAN, A.; QAZI, M.H.; ASIF, M. Potential reproductive health effects and oxidative stress associated with exposure to potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) and magnesium sulphate ($MgSO_4$) in male mice. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 30, p. 819-823, 2014.
- RUCINSKA, R.; SOBKOWIAK, R.; GWOZDZ, E.A. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 519-528, 2004.
- SAGE, E.; HARRISON, L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell Survival. **Mutation Research**, v. 711, p. 123-133, 2011.
- SANS, J.; AGUILERA, A.M.; FAUNDEZ, P.; TRONCOSO, P.; FERNANDEZ, V.; VIDELA, L.A. Influence of copper-(II) on colloidal carbon-induced Kupffer cell-dependent oxygen uptake in rat liver: relation to hepatotoxicity. **Free Radical Research**, v. 30, p. 489-498, 1999.
- YILDIZ, M.; CIĞERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Hemosphere**, v. 75, p. 934-938. 2009.
- ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.

Capítulo 3

Artigo publicado no periódico:



Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity.

International Archives of Medicine, v. 9, p. 1-13, 2016.

[IF: 0.97; QUALIS B2 para Biotecnologia] Apêndice E.

Islam MT, Streck L, Paz MFCJ, Sousa JMC, Alencar MVOB, Mata AM, Carvalho RM, Santos JVO, Silva-Junior AA, Ferreira PMP, Melo-Cavalcante AA.

5 CAPÍTULO 3: Avaliação da capacidade antioxidante do fitol e de sua formulação em nanoemulsão

5.1 Resumo

O diterpenoide fitol ($C_{20}H_{40}O_1$) é um isoprenoide derivado da molécula da clorofila-a. Existem relatos de diversas atividades farmacológicas como: anti-inflamatória, citotóxica, antitumoral, antiteratogênica, antidiabética, antianciolítica, antidepressiva e antioxidante. São escassos os estudos sobre o fitol em formulações farmacêuticas. Assim, o estudo teve os objetivos de desenvolver nanoemulsão à base de fitol e de avaliar suas propriedades antioxidantes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. As substâncias teste foram avaliadas nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μ M. A nanoemulsão, carregada com fitol, foi feita pelo método de inversão de fase. O fitol livre e nanoemulsionado foram testados quanto à atividade antiradical (DPPH•: radical 1,1-difeni-picrilidrazil; ABTS•+: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico); •OH: radical hidroxila; NO•: radical de óxido de nitrito, peroxidação lipídica, potencial redutor e inibição da hemólise em eritrócitos de ratos em comparação com um análogo de α -tocoferol (Trolox - controle positivo). *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas antioxidantes, para superóxido dismutase, catalase e duplos mutantes foram tratadas com as substâncias teste e com peróxido de hidrogênio. Os resultados sugerem que o fitol livre e nanoemulsionado exibiram significantes atividades antioxidantes antirradicais livres, *in vitro* e *ex vivo*, em eritrócitos de ratos em dose-dependente. Em *S. cerevisiae*, as concentrações mais elevadas foram citotóxicas e/ou oxidativas. Entretanto, em baixas concentrações apresentaram atividades antioxidantes frente ao peróxido de hidrogênio. O fitol livre e nanoemulsionado exibiram similares e significantes potenciais antioxidantes dependendo da concentração. Os dados do estudo sugerem que o FIT livre e nanoemulsionado apresentam potencial para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas frente a possíveis danos genéticos relacionados ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: antioxidantes; radicais; nanoemulsão; fitol; *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 Introdução

O Fitol (3, 7, 11, 15-tetrametilhexadec-2-en -1-ol), no estudo denominado por FIT, além de antioxidante, possui inúmeras atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antiespasmódica, antimutagênica, antibiótico-quimioterapêutica, anticancerígena, antiteratogênica, antidiabética, hipolipemiante, anticonvulsivante, imunoadjuvante, antinociceptiva, anti-inflamatória, ansiolítica, antidepressiva, antiqueda capilar e assim por diante (ISLAM et al., 2015). Segundo Andrade e Fasolo

(2012), compostos com atividades antioxidantes e antimicrobianas podem promover a saúde geral (ANDRADE; FASOLO, 2014). O FIT ainda é usado como fragrância em uma série de produtos cosméticos e não cosméticos (ISLAM et al., 2015).

Atualmente, pesquisas extensivas estão focando nos produtos naturais derivados das plantas, apesar dos medicamentos sintéticos. O uso de compostos antioxidantes naturais, em terapia para doenças relacionadas com o estresse oxidativo, ganhou interesse maciço por suas habilidades de extinguir os radicais livres e proteger o corpo contra a patogênese induzida pelo estresse oxidativo. Por outro lado, sendo um óleo essencial, o FIT é uma molécula não solúvel em água, o que limita a sua aplicação e uso em produtos para humanos. Assim, a importância do desenvolvimento de nanoemulsões para avaliação de atividades antioxidantes do fitol livre e nanoemulsionado em estudos *in vitro* (captura de radicais livres), *ex vivo* (hemólise em eritrócitos de hemólises) e em *Saccharomyces cerevisiae*.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Reagentes e químicos

O Tween-80 (0,05%), dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%), foi utilizado como veículo. Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico, TRO), como padrão para todos os ensaios antioxidantes *in vitro* e *ex vivo*. O FIT, todos os reagentes e produtos químicos necessários, utilizados neste estudo, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

5.3.2 Preparação do FNE

O FNE foi preparado pelo método de inversão de fase de emulsão. Resumidamente, titulou-se, lentamente, uma fase oleosa constituída por triglicerídeos de cadeia média (1% p/p) e um tensoativo (5% p/p) composto de fosfatidilcolina de soja e oleato de sódio (1: 7 p/p) com uma solução aquosa de 2-metilpirrolidona (2% p/v) a 70 °C sob agitação magnética constante (1.500 rpm). Este foi emulsionado utilizando um Ultra-Turrax T18 básico equipado com a ferramenta de dispersão S 18 N-19 G a 11.000 rpm, durante um minuto, seguido por quatro minutos a 7.000 rpm. A mistura de tensoativos que produziu dispersões coloidais transparentes foi selecionada num estudo anterior utilizando um diagrama de fase pseudoternário (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012).

5.3.3 Análise da distribuição do tamanho das nanopartículas de FIT e medição do potencial zeta

O diâmetro médio das gotas das nanopartículas foi calculado utilizando o método cumulativo de análise baseado na intensidade da luz dispersa, num analisador de tamanho de partícula (*Brookhaven Instruments*, EUA) a 25°C, usando um comprimento de onda de 659 Nm e ângulo de detecção de 90°. A correlação foi realizada em modo paralelo e os dados foram analisados utilizando o software *Zeta Plus® Particle Sizing* versão 3.95. As medições de potencial Zeta (PZ) foram realizadas utilizando o mesmo equipamento e mesma intensidade de campo (aproximadamente 5,9 V/cm). Utilizaram-se cinco corridas para cada amostra para determinação do valor de PZ, utilizando o software *PALS ZP Analyzer* e a mobilidade eletroforética de acordo com a equação de *Helmholtz-Smoluchowski*. As amostras foram diluídas a 1: 100 (v/v) com água purificada.

5.3.4 Carga de fármaco nas nanoemulsões

A capacidade das nanoemulsões para complexar o FIT foi testada por adição de um excesso do fármaco na fase oleosa antes do passo de emulsificação já descrito. As amostras foram armazenadas em banho termostático a 25°C e submetidas ao vórtex durante um minuto, seguido por 15 minutos em banho de ultrassons a cada 12 h, durante 72 h. Após centrifugação (1000 x g durante 15 minutos), as amostras foram filtradas através de uma membrana de acetato (0,45 µm); e o FIT complexado foi determinado, analiticamente, por espectrofotometria UV-Vis a 239 nm utilizando a equação do gráfico de curva padrão ajustada, anteriormente construída.

5.3.5 Teste de inibição de hemólise

O teste foi realizado em um rato albino Wister (*Rattus norvegicus*, peso corporal: 220 g), proveniente do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, Brasil. O animal recebeu livre acesso aos alimentos (Purina, Brasil) e água e foi mantido sob iluminação controlada (12 h de luz/escuro) a 24 ± 2°C. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal do Piauí, com aprovação de nº 109/14.

5.3.6 Preparação da amostra

Para os ensaios *in vitro* e *ex vivo*, FIT e FNE foram emulsionados em Tween-80 a 0,05% dissolvido em NaCl a 0,9%, nas concentrações finais que variaram de 2, 4, 8 e 16 μM , conforme Islam et al. (2016b). O TRO padrão foi também dissolvido no mesmo veículo para dar as mesmas diluições que FLNE e FNE. Para o ensaio de *S. cerevisiae*, o FIT e FNE foi ajustado para a mesma dose e no mesmo veículo. O H_2O_2 (10 mM) foi utilizado como estressor (STR) neste estudo *in vivo*.

5.3.7 Teste de inibição de DPPH•

O teste para a atividade de inibição de DPPH• foi feito utilizando o método descrito por Manzocco, Anese e Nicoli (1998). Resumidamente, amostras de 0,3 mL com concentrações de 2, 4, 8 e 16 μM foram adicionadas a 2,7 mL de solução etanólica de DPPH (0,5 mM). Após 30 minutos, a absorvância foi medida utilizando um espectrofotômetro a 517 nm. Uma concentração semelhante de TRO serviu como controle positivo, enquanto que apenas 0,3 mL de veículo foi adicionado à solução de DPPH para o controle negativo (CN). O branco não continha nenhuma amostra. O potencial de eliminação de radical DPPH• foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição de DPPH} \bullet = \left[\frac{\text{Abr} - \text{Aar}}{\text{Abr}} \right] \times 100$$

Onde “Abr” é a absorvância dos radicais livres de DPPH• antes da reação; e “Aar” é a absorvância dos radicais livres de DPPH• após a reação.

5.3.8 Atividade de descoloração do ABTS•+

O ensaio de descoloração de ABTS•+ foi feito como descrito por Seeram e colaboradores (2006), com modificações. Os radicais ABTS•+ foram produzidos por adição de dióxido de manganês sólido (80 mg) a uma solução aquosa de ABTS a 5 mM em tampão Na^+/K^+ 75 mM (pH 7,0). Em seguida, adicionaram-se 2,8 mL da amostra a 0,2 mL de solução de ABTS•+. A absorvância foi lida a 750 nm após 5 minutos. A percentagem de capacidade de eliminação foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de descoloração ABTS} \bullet + = \left[\frac{Abr - Aar}{Abr} \right] \times 100$$

Onde “Abr” é a absorbância dos radicais livres de ABTS•+ antes da reação; e “Aar” é a absorbância dos radicais livres ABTS•+ após reação com as amostras do teste.

5.3.9 Atividade de eliminação de •OH

A capacidade das amostras de ensaio para purificar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada de acordo com o método descrito por Ruch, Cheng e Klaunig (1989). Resumidamente, preparou-se uma solução de H₂O₂ 40 mM em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A concentração de H₂O₂ foi medida por espectrofotometria a 230 nm. As amostras de teste (2-16 μM) e padrões foram adicionados ao H₂O₂ e a absorbância a 230 nm foi determinada após 10 minutos. Uma solução contendo tampão fosfato, sem H₂O₂, serviu como o branco. A percentagem de eliminação de H₂O₂ foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de eliminação de H}_2\text{O}_2 = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] \times 100$$

Onde “A₀” é a absorbância do controle; e “A” é a absorbância da amostra de teste.

5.3.10 Atividade de eliminação do radical óxido nítrico (NO•)

Para testar a atividade de eliminação de NO•, foram misturados 0,375 mL da amostra teste (FIT, FNE e trolox), 1,5 mL de nitroprussiato de sódio (10 mM) e 0,375 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4). Em seguida, depois a absorbância (Abr) foi lida a 546 nm. Após incubação da mistura reacional a 37°C, durante 1 hora, misturou-se 1 mL da solução com 1 mL de reagente de Griess. A mistura reacional foi então incubada à temperatura ambiente, durante 30 minutos; e a absorbância final (Aar) foi medida a 546 nm. O controle negativo continha apenas 0,375 mL do veículo (MARCOCCI et al., 1994). A quantidade de inibição de NO• foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição de NO} \bullet = \left[\frac{Abr - Aar}{Abr} \right] \times 100$$

Onde “Abr” é a absorbância dos radicais livres de NO• antes da reação; e “Aar” é a absorbância dos radicais livres de NO• após a reação com o reagente de Griess.

5.3.11 Atividade de inibição da peroxidação lipídica

O ensaio TBARS (radicais de ácido tiobarbitúrico) foi utilizado para medir a quantidade de atividade de peroxidação lipídica. Resumidamente, foram adicionados 0,1 mL de amostra (FIT/FNE/TRO/CN) a 1 mL de gema de ovo homogeneizada (1% p / v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). A oxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH: 0,12 M). A mistura reacional foi incubada a 37°C durante 15 minutos. Após arrefecimento, centrifugaram-se 0,5 mL da amostra, após adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200g, durante 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de TBA (0,67%) e aquecida a 95°C, durante 30 minutos. Após arrefecimento, a absorbância foi medida a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os níveis de peróxidos lipídicos foram expressos como nM de TBARS/mg de gema de ovo utilizando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5$ mL/cm. Finalmente, os resultados foram expressos como a percentagem de inibição da peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

5.3.12 Capacidade de potencial redutor

O teste de potencial foi conduzido utilizando um método descrito por Oyaizu (1986) com as seguintes modificações. Uma amostra de 0,2 mL foi adicionada a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 0,5 mL de K₃Fe (CN) 6 (1% p / v) e a mistura reacional foi aquecida a 50°C, durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de ácido tricloroacético (10% p / v) com agitação constante, seguido por adição de 1,175 mL de água destilada e 0,125 mL de FeCl₃ (0,1% p/v), após 5 minutos. A absorbância da amostra foi tomada a 700 nm em relação a um branco (sem amostra). Para o CN, apenas 0,2 mL do veículo foram adicionados e as amostras foram tratadas de forma semelhante. A atividade de potência de redução foi calculada como descrito:

$$\% \text{ de PR} = \left[\frac{Ats - Abs}{Ats} \right] \times 100$$

Onde “Ats” é a absorbância da amostra de teste; e “Abs” é a absorbância do branco.

5.3.13 Capacidade de inibição de hemólise em eritrócitos de ratos

Para testar a inibição de HL, induzida por H₂O₂, foi coletado o sangue do plexo retro-orbital de ratos *Wistar* anestesiados (pentobarbital sódico 35 mg/kg, intraperitoneal) e os eritrócitos foram preparados para suspensão a 10% em PBS (pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 0,15 mL de peróxido de hidrogênio (200 mM em PBS, pH 7,4) e 0,2 mL da solução de amostra a 0,5 mL da suspensão de eritrócitos a 10%. A mistura reacional foi incubada a 37°C, durante 30 minutos e, imediatamente, centrifugada a 2.500 rpm, durante 3 minutos. Em seguida, misturou-se 0,2 mL do sobrenadante com 2,8 mL de PBS (pH 7,4) e mediu-se a absorbância a 475 nm (GIRISH; VASUDEVARAJU; PRASADA RAO, 2012). Para o CN, foram adicionados 0,2 mL do veículo. A taxa percentual de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula, tendo em conta que a hemólise 100% foi induzida por H₂O₂ (branco):

$$\% \text{ de inibição de HL} = [Absbranco - Absteste] \times 100 / Absbranco$$

Onde “Absbranco” é a absorbância do controle com 100% de hemólise induzida por H₂O₂; e “Absteste” é a absorbância de alíquotas contendo várias concentrações da amostra estudada.

5.3.14 Testes oxidantes/antioxidantes com *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de levedura, previamente subcultivadas, foram linearmente semeadas em meio YEPD estéril (extrato de levedura a 0,5%, peptona a 2%, dextrose a 2% e ágar bacteriológico a 2%). Em seguida, aplicaram-se 0,01 mL de uma amostra de produtos em teste e/ou controle em discos de papel estéril conforme o tratamento. Para os grupos cotratados e sozinhos, as amostras de teste (FIT e FNE) e as amostras com peróxido de hidrogênio foram adicionadas, respectivamente. Os grupos CN e peróxido de hidrogênio foram tratados com veículo estéril (tween-80 a 0,05% dissolvido em NaCl a 0,9%) e H₂O₂, respectivamente. Os tratamentos foram feitos imediatamente após semeio dos organismos sobre as placas de Petri. As placas foram então invertidas e mantidas numa incubadora a 35 ± 1°C durante 72 h. Os halos de inibição (em mm) foram então medidos. Eles variaram de 0 mm (crescimento completo)

a 40 mm (sem crescimento), com base no raio nas placas de petri. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata (FRAGOSO et al., 2008).

5.3.15 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (DP). Para os testes antioxidantes *in vitro* e *ex vivo*, os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de *t-Student-Newman-Keuls*. Para *S. cerevisiae*, o teste de Bonferoni e dois pós-testes de *Tukey* foram realizados usando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0), valores significantes para $p < 0,05$.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Caracterização do fitol em nanoemulsão (FNE)

A **Tabela 1** resume as características físico-químicas das nanoemulsões óleo-em-água transparentes produzidas com sucesso na ausência ou presença de fitol. As dispersões coloidais apresentaram tamanhos pequenos e, uniformemente, distribuídos de gotículas, com veículo (VE) mostrando um diâmetro médio de 130,20 nm e índice de polidispersidade (Pdl) de 0,185. A carga do fármaco fez com que o tamanho da gota de FNE aumentasse para um diâmetro médio de 245,50 nm (Pdl = 0,384). As nanoemulsões do VE e FNE apresentaram valores de (potencial zeta) PZ negativos elevados. A carga do fármaco foi calculada utilizando a equação de regressão linear, $A = 0,0045C + 0,005$, que foi extraída da curva padrão. A absorbância medida foi substituída por "C", expressa em $\mu\text{g/mL}$ (FIT). O coeficiente de correlação da reta foi de 0,9999. A carga máxima de FIT nas nanoemulsões óleo-em-água (O/A) foi de $1,55 \pm 0,012\%$ ($n = 3$), o que permitiu produzir nanoemulsões contendo FNE a 1% p/v (10 mg/mL).

Tabela 1. Efeitos do FIT no tamanho (diâmetro) e potencial zeta (PZ) do veículo para nanoemulsão e FNE.

Código da formulação, composição	Diâmetro (nm) ± DP	IPd	PZ (mV) ± DP	Quantidade do bioativo (%)
(NMP, Migliol®812, mistura de surfactantes, fitol)				
VE, 0,2:0,1:0,5:0	130,20 ± 17,17	0,185	-108 ± 3,01	-
FNE, 0,2:0,1:05:0,10	245,50 ± 25,02	0,384	-77,8 ± 2,83	1,55

Média ± desvio padrão. VE: veículo para nanoemulsão; FNE: fitol em nanoemulsão; IPd: índice de polidispersão. NMP: N-metil pirrolidona.

As nanoemulsões são comumente estabilizadas por quantidades relativamente grandes de surfactantes, a fim de produzir dispersões transparentes (AMANI et al., 2008). Neste estudo, produzimos nanoemulsões extraordinariamente transparentes com tamanhos de gotículas na gama de 130 a 250 nm utilizando baixos níveis de tensioativo (cerca de 5% p/p). Este foi o resultado da utilização de um par de surfactantes adequado, composto de fosfatidilcolina de soja e oleato de sódio (1: 7 p/p), associado ao co-solvente 2-metilpirrolidona (2% p/v). O efeito da composição do surfactante (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012) e da relação cosolvente (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013), tanto no tamanho das gotículas como na distribuição do tamanho das gotículas, foi descrito anteriormente. Além disso, a composição da fase oleosa/surfactante/co-solvente utilizada neste trabalho produziu nanoemulsões estáveis com potenciais zeta altamente negativos, garantindo resiliência eletrostática adequada contra a floculação.

A carga de FIT contribuiu para o aumento da dimensão das gotículas de nanoemulsão, o que provavelmente ocorreu devido à solubilização do FIT na fase oleosa. Em estudos anteriores, com microemulsões contendo o fármaco antitumoral doxorrubicina, foram relatados resultados semelhantes, com carga de fármaco aumentando o tamanho das gotas das microemulsões (FORMARIZ et al., 2010). O mesmo efeito foi observado também para microemulsões de anfotericina B complexadas óleo em água (PESTANA et al., 2008). O FIT é um líquido imiscível em água e, tal como observado com anfotericina B, a sua solubilização, em fase oleosa, contribuiu para aumentar o tamanho das gotículas. O mecanismo deste último caso não é claro, mas a redução de PZ, observada para nanoemulsões carregadas com fármaco, confirmou que o FIT também perturba o filme de surfactante na interface óleo/água. É possível que a droga esteja parcialmente localizada nesta região, o que é importante para os efeitos antioxidantes do FIT.

5.4.2 Atividade antioxidante do fitol em inibição de DPPH•

O teste de DPPH• é o ensaio mais realizado para determinação de atividade antioxidante, pelo monitoramento da diminuição da absorvância da amostra teste. Ele avalia a atividade de eliminação radical. Trolox, (+) -catequina, galato de etila, ácido ascórbico e α -tocoferol são geralmente utilizados como padrões para o rastreio de novos compostos (ANTOLOVICH et al., 2002). A **Tabela 2** mostra que o FNE produziu um maior efeito inibidor quando comparado com o FIT para todas as quatro doses testadas, porém a atividade foi inferior ao padrão (TRO) tratado com as mesmas doses. As maiores inibições foram observadas para 16 μ M de FIT, FNE e TRO foram de $50,44 \pm 0,01$, $58,17 \pm 0,01$ e $76,59 \pm 0,01\%$, respectivamente. Houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas e a inibição.

5.4.3 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na descoloração do ABTS•+

O ensaio ABTS, que monitora a remoção de ABTS•+, é outro método usado para testar a atividade antioxidante. É um substrato de peroxidase por oxidação na presença de H_2O_2 que gera um cátion de radical metaestável (ANTOLOVICH et al., 2002). Ele confirma que houve melhora na capacidade de inibição de FNE em comparação com TRO. A dose de 16 μ M de FNE, ou TRO exibiu inibição de $59,18 \pm 0,01\%$ e $0,76 \pm 0,01\%$, respectivamente (**Tabela 2**). Também houve relação dose-resposta entre as amostras de teste.

5.4.4 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na eliminação de •OH

O radical hidroxila (•OH) geralmente reage com unidades de ácidos graxos polinsaturados de fosfolípidios da membrana celular e causa destruição celular (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2003). A medição do radical hidroxila aniônico é feita de forma semelhante aos ensaios DPPH e ABTS, em que o •OH, produzido a partir do H_2O_2 , é eliminado pela amostra testada. Descobrimos que o FNE, em vez do FIT, apresentou maior inibição. A maior inibição foi observada para a dose mais alta (16 μ M), resultando em $50,79 \pm 0,01\%$, $62,75 \pm 0,02\%$ e $69,09 \pm 0,02\%$ para FLNE, FNE e TRO, respectivamente. O IC revelou que tanto o FIT (IC = 1,07-7,15 μ M; $r^2 = 0,89$) como o FNE (IC = 1,87-12,16 μ M; $r^2 = 0,89$) apresentaram atividade melhorada em comparação com TRO (IC = 1,61-6,62 μ M; $r^2 = 0,93$) (**Tabela 3**). Também houve relação dose-resposta para as amostras testadas.

Tabela 2. Potencial antioxidante do FIT/FNE *in vitro* em comparação aos controles.

Amostras	DPPH (% neutralização)			ABTS (% neutralização)			OH (% neutralização)			NO (% neutralização)		
	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO
16 (µM)	50,44 ± 0,01 ^a	58,17 ± 0,01 ^a	76,59 ± 0,01 ^a	54,59 ± 0,01 ^a	59,18 ± 0,01 ^a	60,76 ± 0,01 ^a	50,79 ± 0,01 ^a	62,75 ± 0,02 ^a	69,09 ± 0,02 ^a	58,36 ± 0,01 ^{a,b}	65,06 ± 0,01 ^a	74,69 ± 0,02 ^a
8 (µM)	43,63 ± 0,03 ^a	34,34 ± 0,02 ^a	67,40 ± 0,01 ^a	40,03 ± 0,02 ^a	39,24 ± 0,01 ^a	49,58 ± 0,01 ^a	35,93 ± 0,03 ^a	36,18 ± 0,01 ^a	48,75 ± 0,01 ^a	32,81 ± 0,01 ^a	37,11 ± 0,02 ^a	48,18 ± 0,02 ^a
4 (µM)	39,57 ± 0,01 ^a	27,16 ± 0,01 ^a	45,21 ± 0,01 ^a	22,27 ± 0,01 ^a	24,41 ± 0,02 ^a	27,71 ± 0,02 ^a	30,61 ± 0,01 ^a	27,41 ± 0,01 ^a	41,56 ± 0,01 ^a	23,54 ± 0,01 ^a	34,23 ± 0,01 ^a	39,99 ± 0,01 ^a
2 (µM)	31,06 ± 0,01 ^{a,b}	19,49 ± 0,01 ^a	26,17 ± 0,02 ^a	15,73 ± 0,04 ^{a,b}	16,06 ± 0,01 ^{a,b}	10,36 ± 0,01 ^a	21,64 ± 0,01 ^a	15,82 ± 0,01 ^a	22,66 ± 0,01 ^a	12,85 ± 0,02 ^a	8,93 ± 0,01 ^a	36,56 ± 0,01 ^a
CN	2,19 ± 0,05			1,29 ± 0,03			0,89 ± 0,02			1,01 ± 0,01		

Amostras	TBARS (% Inibição da peroxidação lipídica)			RP (% Inibição da oxidação)			HL (% Inibição da hemólise)		
	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO
16 (µM)	66,89 ± 0,01 ^a	74,52 ± 0,01 ^a	95,02 ± 0,01 ^a	64,13 ± 0,01 ^a	87,34 ± 0,01 ^a	94,09 ± 0,05 ^a	58,85 ± 0,01 ^{a,b}	43,82 ± 0,01 ^a	65,81 ± 0,01 ^{a,b}
8 (µM)	50,75 ± 0,01 ^a	50,75 ± 0,01 ^a	81,56 ± 0,01 ^a	46,49 ± 0,01 ^a	83,88 ± 0,01 ^a	87,71 ± 0,02 ^a	30,54 ± 0,01 ^a	35,19 ± 0,01 ^a	34,08 ± 0,01 ^{a,b}
4 (µM)	38,89 ± 0,01 ^a	38,89 ± 0,01 ^a	65,86 ± 0,01 ^a	38,89 ± 0,01 ^a	77,82 ± 0,01 ^a	83,19 ± 0,03 ^a	22,91 ± 0,01 ^{a,b}	19,37 ± 0,01 ^{a,b}	16,76 ± 0,01 ^{a,b}
2 (µM)	31,72 ± 0,01 ^{a,b}	13,91 ± 0,01 ^a	16,81 ± 0,01 ^a	34,44 ± 0,01 ^a	64,47 ± 0,01 ^a	80,27 ± 0,05 ^a	10,61 ± 0,01 ^{a,b}	13,59 ± 0,01 ^{a,b}	8,01 ± 0,01 ^{a,b}
CN	2,11 ± 0,04			2,03 ± 0,02			1,07 ± 0,02		

^ap < 0,05 em comparação com CN (0,05% de tween 80 em NaCl a 0,9%); ^bp < 0,05, em comparação com TRO (ANOVA e teste de t-Student-Newman-Kewels, como pós-teste); FIT: Fitol livre; FNE: Fitol em nanoemulsão; TRO: trolox (padrão); Valores são as médias ± DP (n = 5).

Tabela 3. Potencial antioxidante do CE₅₀ do FIT/FNE *in vitro* e do padrão (trolox).

Parâmetros	Teste DPPH			Teste ABTS			Teste OH			Teste NO		
	FIT	FNE	TRO									
CE ₅₀ (mM/L)	1,39 ± 0,25	4,14 ± 0,53	3,14 ± 0,27	4,23 ± 0,47	4,50 ± 0,47	4,20 ± 0,24	2,76 ± 0,39	4,77 ± 0,55	3,26 ± 0,39	5,17 ± 0,58	4,76 ± 0,70	2,72 ± 0,51
CI	0,63-3,06	1,34-12,82	2,19-4,14	2,18-8,21	2,19-9,26	3,44-5,13	1,07-7,15	1,87-12,16	1,61-6,62	2,12-12,60	1,73-13,09	0,49-15,14
r ²	0,96	0,85	0,98	0,94	0,93	0,99	0,89	0,89	0,93	0,90	0,88	0,75

Parâmetros	Teste TBARS			Teste RP			Teste HL		
	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO	FIT	FNE	TRO
CE ₅₀ (mM/L)	2,52±0,38	4,22±0,45	3,21±0,58	2,08±0,43	1,05±0,12	0,41±0,38	5,63±0,66	3,81±0,46	6,72±0,76
CI	0,95-6,71	2,35-7,59	2,30-4,47	0,42-10,27	0,78-1,41	0,01-16,81	2,19-14,49	2,05-7,08	3,52-12,83
r ²	0,89	0,95	0,98	0,82	0,99	0,84	0,89	0,94	0,94

CE₅₀: Concentração efetiva 50% em µM; CI: Intervalo de confiança; r²: Coeficiente de determinação.

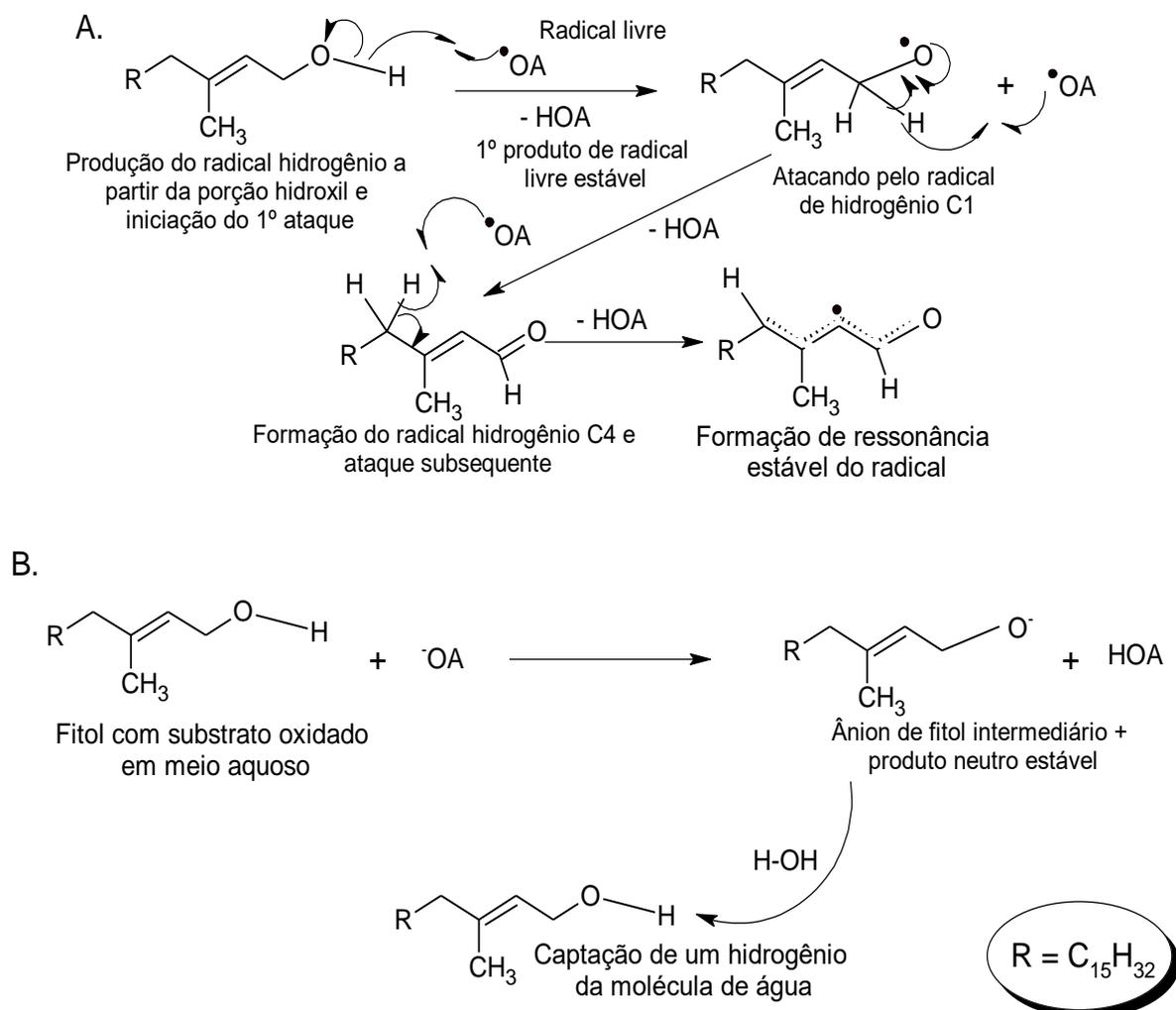
5.4.5 Atividade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão na inibição da peroxidação lipídica

No ensaio TBARS, a peroxidação lipídica (PL) foi detectada por medição da quantidade de malonaldeído (MDA) formado a partir de ácidos graxos insaturados. Quanto mais MDA reagisse com o ácido tiobarbitúrico (TBA), mais forte a coloração rosa da amostra e maior a absorbância (ANTOLOVICH et al., 2002). A peroxidação lipídica é geralmente completada por AAPH (*in vitro*), mas foi fortemente inibida por TRO, seguida de FNE e FIT. O parâmetro IC demonstra a atividade de proeminência do FNE com um coeficiente de 0,95 (r^2) (**Tabela 3**). No entanto, neste estudo, 16 μM de FNE e FIT exibiram inibição de PL em 74,52% e 66,89%, respectivamente. A oxidação/peroxidação de lipídeos por produtos químicos exógenos é uma das principais causas de lesão hepática (DIRLIK et al., 2009). Neste ensaio *in vitro*, a relação concentrações-resposta e a inibição significativa ($p < 0,05$) de PL sugerem que o FIT tem uma potente capacidade antioxidante.

5.4.6 Capacidade antioxidante do fitol livre e em nanoemulsão no potencial redutor (PR)

O ensaio de PR é um teste antioxidante rápido e sensível, no qual a absorbância aumenta com a formação de um complexo de cor com ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto férrico. Um aumento na absorbância indica atividade antioxidante da amostra teste (JAYAPRAKASH; SINGH; SAKARIAH, 2001). Os antioxidantes são os agentes redutores. De acordo com a **Tabela 2**, o FNE melhorou a atividade de redução mais do que a FIT para todas as doses testadas. O FIT (16 μM) mostrou uma capacidade de redução semelhante à dose mais baixa de FNE (2 μM). O IC calculado para FIT, FNE e TRO foi de 0,42-10,27 μM ($r^2 = 0,82$), 0,78-1,41 μM ($r^2 = 0,99$) e 0,01-16,81 μM ($r^2 = 0,84$), respectivamente (**Tabela 3**). Embora a atividade fosse menor do que o TRO, houve uma relação concentração-resposta em todos os casos. Um mecanismo simplificado possível para a atividade antioxidante do FIT é mostrado na **Figura 1**.

Figura 1. Possíveis mecanismos de redução do fitol. Em A: vias de radicais livres (neutralização); B: via de ionização.



5.4.7 Capacidade do fitol livre e em nanoemulsão na inibição de hemólise em eritrócitos de ratos

O teste de hemólise *ex vivo* foi realizado tratando primeiro eritrócitos de rato com um agente de lise, H_2O_2 . Em seguida, a inibição de hemólise foi avaliada pela medição da concentração de hemoglobina na reação (GIRISH; VASUDEVARAJU; PRASADA RAO, 2012). Neste estudo, o FIT, proficientemente, regulou a estabilidade da membrana dos eritrócitos e, assim, reduziu a hemólise. A lise dos eritrócitos foi diminuída em $58,85 \pm 0,01\%$, $43,82 \pm 0,01\%$ e $65,81 \pm 0,01\%$ após o tratamento com $16 \mu M$ de FIT, FNE e TRO, respectivamente. Radicais oxidativos, especialmente $\bullet ON$, podem se ligar ao heme de Fe^{2+} , que altera suas funções fisiológicas (ARCHER, 1993), uma vez que a hemoglobina livre é crucial para a respiração de oxigênio dissolvido (O_2) e dióxido de carbono durante processos metabólicos normais. Uma vez que o FIT exibiu uma forte atividade de eliminação de $\bullet ON$ neste estudo,

o diterpeno pode alterar os efeitos *in vivo* prejudiciais deste radical. No entanto, a menor inibição de HL com FNE pode ser devido à sua maior hidrofobicidade em alta concentração e antioxidante induzida efeitos pró-oxidativos (BAKKALI et al., 2008).

5.4.8 Atividades oxidantes/antioxidantes do fitol livre (FIT) e nanoemulsionado (FNE) em *Saccharomyces cerevisiae*

Existem evidências de que o corpo previne danos de radicais livres (VALKO et al., 2007) usando algumas enzimas e substratos (MUNNÉ-BOSCH et al., 2001). Por exemplo, a enzima de dismutação, superóxido dismutase (SOD), pode converter O_2^{\bullet} em gás oxigênio (O_2) ou H_2O_2 . Por outro lado, a enzima catalase (CAT), que é ubíqua na maioria dos organismos vivos, é responsável pela conversão de H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004). Estas duas enzimas são essenciais para a neutralização de EROs e manter as células livres de danos mediados por estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2011). As *S. cerevisiae* têm enzimas antioxidantes no citoplasma, mitocôndrias, e em toda a superfície da célula (PINHEIRO; BELO; MOTA, 2002). Além disso, um dos seus polímeros estruturais da parede celular (1-3/1-6) β -glucanos possui atividades antioxidante (KOGAN et al., 2005) e imunomoduladora (LI et al., 2006).

Portanto, este organismo pode ser usado para medir a ação antioxidante de uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas. Além disso, este modelo eucariótico permite a investigação dos efeitos dos antioxidantes ao nível celular, e, é assim, uma alternativa às linhagens celulares de mamíferos. Com base nos ensaios de formação de colônias realizados por Bakkali e colaboradores (2008), alguns OEs são citotóxicos para *S. cerevisiae*, principalmente na fase de crescimento estacionário. No entanto, depende do estado de crescimento celular, como as células na fase vegetativa, que são muito mais sensíveis devido ao poder de penetração elevada de OEs, mais eficientemente, nos locais de brotamento. OEs contendo fenólico, aldeído e OH alcoólico são citotóxicos na natureza (SACCHETTI et al., 2005) e podem agir contra fungos (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006).

A utilização de FIT, em dispersões aquosas, requer uma estratégia de solubilização poderosa, tal como a nanoemulsão. Estudos anteriores relataram a eficácia da carga de terpenos insolúveis em nanoemulsões e o aumento da estabilidade dessas misturas (MASWAL; DAR, 2014). Além disso, uma formulação de sinergia antioxidante contendo delta, alfa e gama tocoferol, carregado em nanoemulsões, diminuiu a inflamação em camundongos CD-1, o que foi atribuído ao aumento da biodisponibilidade de gama (2,2 vezes) e delta (2,4 vezes) tocoferol, quando comparado com compostos puros (KUO et al., 2008). A atividade antioxidante do composto anticancerígeno quercetina também aumentou quando carregada em nanoemulsões, medida como uma função da eficácia antitumoral profilática contra tumores

de mama induzidos por DMBA (JAIN; THANKI; JAIN, 2014). Também foi mostrado para combater a cardiotoxicidade e nefrotoxicidade induzida por doxorubicina e ciclosporina A (JAIN et al., 2013).

Os OEs são conhecidos por suas atividades antioxidantes e citotóxicas. Em baixas concentrações, os antioxidantes não podem penetrar a membrana mitocondrial e, assim, podem reter atividades antioxidantes, ao invés de citotóxicas ou pró-oxidantes. Baixas concentrações de retinol e tocoferol apresentam atividades antioxidantes e antimutagênicas, enquanto que, altas concentrações, são genotóxicas (BRONZETTI et al., 2001). Portanto, tanto a concentração do antioxidante quanto a integridade da membrana mitocondrial são chaves para as atividades antioxidantes e citotóxicas dos OEs.

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 4**, o FIT teve atividades oxidativas em Sod1 Δ Sod2 Δ em todas as doses testadas. Porém, as zonas de inibição (7,00-11,00 mm) foram mais baixas do que as observadas para o STR (25,25 mm). O FIT também exibiu um efeito oxidativo nas linhagens SOD-WT e Sod1 Δ a 16 μ M. A sobrevivência das linhagens foi, significativamente, aumentada ($p < 0,05$) com as doses tratadas, onde FIT produziu uma diferença estatística ($p < 0,05$) de 2 μ M com 16 μ M em SOD-WT, 2 μ M e 4 μ M com 16 μ M em Sod1 Δ , 2 μ M com 4 μ M, 8 μ M e 16 μ M em Sod2 Δ e 2 μ M com 16 μ M em linhagens Cat1 Δ , respectivamente.

A **Tabela 5** mostra que o FNE 2, 4, 8 e 16 μ M teve efeito oxidativo nas linhagens Sod1 Δ Sod2 Δ e Sod1 Δ Cat1 Δ e o FNE 4, 8 e 16 μ M e efeito na linhagem Cat1 Δ , mas as zonas de inibição eram menores, quando comparadas com o peróxido de hidrogênio. Apenas a dose de 2 μ M teve um efeito antioxidante em Cat1 Δ quando comparada com o peróxido de hidrogênio. Neste caso, o FNE 16 μ M também tinha atividade oxidativa na linhagem SODWT. No entanto, houve aumento das taxas de sobrevivência no restante das cepas testadas.

Os dados aqui apresentados não sugerem diferença estatística entre as doses de FNE testadas. Por outro lado, houve diferença nos resultados para os tratamentos FIT e FNE para as linhagens Cat1 Δ e Sod1 Δ Cat1 Δ . O FIT aumentou, significativamente, as taxas de sobrevivência ($p < 0,05$), mas o FNE apresentou efeitos oxidativos em todas as doses testadas, exceto 2 μ M. Pode haver um efeito do veículo no qual as nanopartículas de FIT foram emulsionadas. Contudo, os dados apresentados nas **Tabelas 4** e **5** sugerem zonas de inibição inferiores para ambas as formulações, que eram inferiores ao grupo tratado com o peróxido de hidrogênio.

Tabela 4. Avaliação oxidante/antioxidante do FIT (fitol) em linhagens de *S. cerevisiae*, avaliados pelo tamanho (0-40 mm) do halo de crescimento em placas de petri.

Parâmetros	Tamanhos (MM) de Halos de crescimento de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>					
	SOD-WT	Sod1Δ	Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔSod2Δ	Sod1ΔCat1Δ
CN (10 μL)	5,00 ± 1,24	5,50 ± 1,04	6,25 ± 0,73	6,75 ± 0,85	0,50 ± 0,33	0,25 ± 0,29
H ₂ O ₂ (10 mM)	20,25 ± 0,29 ^a	24,50 ± 1,94 ^a	24,00 ± 0,67 ^a	24,00 ± 2,73 ^a	25,25 ± 3,57 ^a	12,75 ± 0,73 ^a
FIT						
16 (μM)	7,75 ± 1,52 ^a	10,75 ± 0,48 ^a	10,25 ± 0,55	10,75 ± 0,86	11,00 ± 0,47 ^a	8,75 ± 0,99 ^a
8 (μM)	7,50 ± 0,58	9,75 ± 0,48	9,75 ± 0,87	9,25 ± 0,76	8,75 ± 1,37 ^a	7,75 ± 1,19 ^a
4 (μM)	6,50 ± 2,03	9,25 ± 0,63	9,25 ± 1,09	8,00 ± 0,56	8,75 ± 1,37 ^a	7,00 ± 0,82 ^a
2 (μM)	5,00 ± 0,67	8,50 ± 0,29	8,50 ± 0,75	7,50 ± 0,74	8,50 ± 1,00 ^a	5,50 ± 0,75 ^a
FITe H₂O₂						
16 (μM)	10,25 ± 0,29 ^a	13,25 ± 1,89 ^a	7,75 ± 1,73 ^b	6,50 ± 1,89 ^b	8,50 ± 1,00 ^{ab}	8,75 ± 0, ^{99ab}
8 (μM)	9,50 ± 0,33 ^b	7,00 ± 1,68 ^b	8,25 ± 0,85 ^b	5,00 ± 1,58 ^b	7,00 ± 0,82 ^{ab}	7,75 ± 1, ^{19ab}
4 (μM)	9,50 ± 1,00 ^b	5,50 ± 0,87 ^{b,c}	7,50 ± 1,38 ^b	7,50 ± 1,29 ^b	9,00 ± 1,25 ^{ab}	7,00 ± 0, ^{82ab}
2 (μM)	8,25 ± 0,73 ^{b,c}	5,25 ± 0,75 ^{b,c}	4,25 ± 0,73 ^{b,c,d,e}	3,75 ± 0,46 ^{b,c}	8,75 ± 1,28 ^{ab}	5,50 ± 0, ^{75ab}

^ap < 0,05 em comparação com CN (0,05% de tween 80 em NaCl a 0,9%); ^bp < 0,05 em comparação com H₂O₂; ^cp < 0,05 em comparação com FIT 14,16 μM; ^dp < 0,05 em comparação com FIT 7,08 μM; ^ep < 0,05 em comparação com FIT 4 μM (ANOVA one-way seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%); Valores são as médias ± DP (n = 4).

Tabela 5. Avaliação oxidante/antioxidante do FNE (fitol nanoemulsionado) em linhagens de *S. cerevisiae*, avaliados pelo tamanho (0-40 mm) do halo de crescimento em placas de petri.

Parâmetros	Halos de inibição em milímetros na linhagem teste					
	SOD-WT	Sod1 Δ	Sod2 Δ	Cat1 Δ	Sod1 Δ Sod2 Δ	Sod1 Δ Cat1 Δ
CN (10 μ L)	5,00 \pm 1,24	5,00 \pm 1,04	6,25 \pm 0,73	6,75 \pm 0,85	0,50 \pm 0,33	0,25 \pm 0,29
H₂O₂ (10 mM)	20,25 \pm 0,29 ^a	24,50 \pm 1,94 ^a	24,00 \pm 0,67 ^a	24,00 \pm 2,73 ^a	25,25 \pm 3,57 ^a	22,75 \pm 0,73 ^a
FNE						
16 (μ M)	9,25 \pm 0,87 ^a	10,00 \pm 0,82 ^a	8,75 \pm 1,09	8,25 \pm 1,19	10,25 \pm 0,67 ^a	9,50 \pm 1,11 ^a
8 (μ M)	8,75 \pm 0,87	8,50 \pm 1,11	9,25 \pm 0,55	8,75 \pm 0,55 ^a	9,50 \pm 0,75 ^a	9,25 \pm 0,87 ^a
4 (μ M)	8,25 \pm 0,55	7,00 \pm 0,82	7,50 \pm 1,00	8,25 \pm 0,55 ^a	8,00 \pm 0,47 ^a	8,25 \pm 0,87 ^a
2 (μ M)	6,50 \pm 0,75	6,25 \pm 0,55	6,25 \pm 0,55	6,50 \pm 0,58 ^a	6,25 \pm 0,55 ^a	7,00 \pm 0,82 ^a
FNE e H₂O₂						
16 (μ M)	9,75 \pm 0,85 ^a	6,25 \pm 0,55 ^b	7,75 \pm 1,52 ^b	6,75 \pm 1,79 ^{ab}	8,25 \pm 0,99 ^{ab}	7,75 \pm 1,78 ^{ab}
8 (μ M)	7,00 \pm 1,70 ^b	8,25 \pm 1,28 ^b	8,00 \pm 1,25 ^b	6,00 \pm 1,83 ^{ab}	9,00 \pm 0,94 ^{ab}	8,50 \pm 1,38 ^{ab}
4 (μ M)	8,00 \pm 0,47 ^b	7,50 \pm 1,53 ^b	8,25 \pm 1,59 ^b	8,25 \pm 0,98 ^{ab}	6,25 \pm 0,29 ^{ab}	7,75 \pm 0,73 ^{ab}
2 (μ M)	5,50 \pm 0,33 ^b	6,00 \pm 1,06 ^b	5,50 \pm 0,75 ^b	5,00 \pm 0,82 ^{bb}	6,00 \pm 0,67 ^{ab}	6,00 \pm 1,06 ^{ab}

^ap < 0,05 em comparação ao CN (0,05% tween 80 em 0,9% de NaCl); ^bp < 0,05 em comparação ao H₂O₂ (ANOVA one-way seguido do teste de Bonferoni com intervalo de confiança de 95%); valores são as médias \pm DP (n=4).

Os dados apresentados nas **Tabelas 3 e 4** revelam que ambas as formulações de FIT protegem, eficazmente, todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, demonstrando, assim, as capacidades de defesa antioxidante do FIT e do FNE. No entanto, nos grupos tratados sem o peróxido de hidrogênio (nulo) e grupos co-tratados com 16 µM de FIT/FNE, as zonas de inibição foram, ligeiramente, maiores do que para as outras doses cotratadas. Pode haver um efeito hiperóxi, que foi, eventualmente, minimizado após a aplicação do STR, que apresentou atividade tanto do FIT como do FNE. No teste *in vitro* de eliminação de OH (Tabela 2), FIT aumentou, significativamente ($p < 0,05$), o potencial de eliminação de OH. Assim, o peróxido de hidrogênio, neste caso, produziu radicais HO• que podem confrontar com o FIT (FIT/FNE). Enquanto a defesa aumentou com doses decrescentes de FIT e FNE, a atividade foi significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos tratados com CN e peróxido de hidrogênio.

É evidente que, tal como outros aeróbios, a *S. cerevisiae* tem um número de defesas antioxidantes, tais como: (I) uma superóxido dismutase citosólica de cobre-zinco (CuZn-SOD, Sod1) codificada pelo gene *SOD1*; (II) uma superóxido dismutase de manganês mitocondrial (Mn-SOD, Sod2) codificada pelo gene *SOD2*; (III) uma catalase citosólica codificada pelo gene *CAT1*; E (IV) uma catalase peroxissomal codificada pelo gene *CAT1*.

No entanto, a *S. cerevisiae* pode realizar tanto o metabolismo aeróbico como o anaeróbico dependendo da natureza da fonte de carbono. Sob condições aeróbicas, a *S. cerevisiae* produz energia, principalmente, dentro de suas mitocôndrias usando um processo semelhante ao das células humanas. De acordo com COSTA et al (1997), quando o *S. cerevisiae* do tipo selvagem é exposta ao superóxido gerador de etanol ($O_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 durante o crescimento diauxic e pós-diauxic, a mutante Sod mitocondrial (Sod2Δ) produz proteção essencial contra o estresse oxidativo. Um estudo semelhante foi sugerido ao trabalhar com ácido L-ascórbico por Saffi et al (2006). Neste estudo, ambas as formulações de FIT protegem os mutantes citosólicos Sod1Δ, mitocondrial Sod2Δ e de fígado Cat1Δ, o que pode confirmar a potencial proteção contra o dano oxidativo por FIT.

Estudos anteriores *in vivo* mostraram que 6, 12, 24 e 48 µM de FIT apresentaram atividade antioxidante em camundongos. Foi também postulado significativo efeito redutor de radicais livres. Existem também evidências *ex vivo* dos efeitos antioxidantes do FIT em doses de 2, 6, 12 e 18 µM em camundongos *Swiss* (ISLAM et al., 2015). Existem compostos (NUNES et al., 2014), incluindo diterpeno e ácido carnósico ($C_{20}H_{34}O_4$), que têm atividade antioxidante devido à presença de grupos -OH ativos (ARUOMA et al., 1992). Há uma série de antioxidantes naturais, comercialmente usados, incluindo alguns diterpenos-caveol, cafestol (LEE; CHOI; JEONG, 2007), ácido carnósico e carnosol e produtos de oxidação de ácido carnósico (rosmanol e isorosmanol) (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2000). Por outro lado, existem também numerosos antioxidantes naturais com grupos hidroxilo reativos (-OH), incluindo

carvacrol, timol, euginol, isoeuginol, geraniol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, terpein-4-ol, alfa-terpenol, limoneno e p-cimeno (SHAH; BOSCO; MIR, 2014).

O FIT é um OE fenólico que contém um grupo -OH na sua posição C1, o que é de interesse para a sua atividade antioxidante. Além disso, um número aumentado de grupos OH pode aumentar a polaridade dos diterpenos. Recentemente, verificou-se que os derivados de aldeído, oxima e cromocrotonilode etila, derivados do FIT, têm 2, 4 e 6,5 vezes mais potentes atividades antitubercular, (SAIKIA et al., 2010), apresentando, assim, um melhor perfil farmacológico com produtos sintéticos de FIT.

5.5 Conclusões

Tanto o FIT quanto o FNE exibiram potentes atividades antioxidantes em ensaios *in vitro* e *ex vivo* em eritrócitos de ratos, nas concentrações testadas. Mas, em *Saccharomyces cerevisiae*, foram oxidantes em 16 µM para a maioria das linhagens e para os duplos mutantes em todas as concentrações testadas. Entretanto, o FIT e o FNE foram antioxidantes frente ao peróxido de hidrogênio nas menores concentrações, e para a maioria das linhagens testadas. O FNE apresentou perfil antioxidante similar ao FIT. Como bioprodutos antioxidantes, o FIT e o FNE devem ser testados em outros sistemas teste para atividades antioxidantes visando ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas para terapias de doenças relacionadas com o estresse oxidativo.

Referências

ALAM, M.N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2003.

AMANI, A.; YORK, P.; CHRYSTYN, H.; CLARK, B.J.; DO, D.Q. Determination of factors controlling the particle size in nanoemulsions using Artificial Neural Networks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 42-51, 2008.

ANDRADE, J.M.M.; FASOLO, D. Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion. Chapter 20, Polyphenols in Human Health **Disease**, v. 1, p. 253-265, 2014.

ANDRADE, T.J.A.S.; ARAÚJO, B.Q.; CITÓ, A.M.G.L.; DA SILVA, SAFFI, J.; RICHTER, M.F.; FERRAZ, A.B.F. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (TcnsL). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1044-1048, 2011.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p. 183-198, 2002.

ARCHER, S. Measurement of nitric-oxide in biological models. **FASEB Journal**, v. 7, p. 349-360, 1993.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J. Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotic**, v. 22, p. 257-268, 1992.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BRONZETTI, G.; CINI, M.; ANDREOLI, E.; CALTAVUTURO, L.; PANUNZIO, M.; DELLA CROCE, C. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mutation Research**, v. 496, p. 105-115, 2001.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Celular and Molecular Life Science**, v. 61, p. 192-208, 2004.

DIRLIK, M.; KARAHAN, A.; CANBAZ, H.; CAGLIKULEKCI, M.; POLAT, A.; TAMER, L.; AYDIN, S. Effects of sulfasalazine on lipid peroxidation and histologic liver damage in a rat model of obstructive jaundice and obstructive jaundice with lipopolysaccharide-induced sepsis. **Current Therapeutic Research**, v. 70, p. 299-315, 2009.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; EGITO, E. S.T.; TERRUGI, C.H.B.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; OLIVEIRA, A.G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v.77, p. 47-53, 2010.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N.C.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 559-566, 2008.

GIRISH, T.K.; VASUDEVARAJU, P.; PRASADA RAO, U.J.S. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1690-1696, 2012.

ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A. A.C.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R. M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M.T.; SANTOS, J.V.O.; FERREIRA, J.R.O.; SOUSA, J.M.C.; PAZ, M.F.C.J.; CARVALHO, R.M., MATA, A.M.O.F.; SOUSA, L.R.; LIMA, R.M.T.; SILVA, M.B.S.; ALENCAR, M.V.O.B.; FERREIRA, P.M.P.; DANTAS, S.M.M.M.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. A Possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-11, 2016.

JAIN, A.K.; THANKI, K.; JAIN, S. Self-nanoemulsifying formulation of quercetin: Implications of pro-oxidant activity on the anticancer efficacy. **Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 10, p. 959-969, 2014.

JAIN, S.; JAIN, A.K.; POHEKAR, M.; THANKI, K. Novel self-emulsifying formulation of quercetin for improved in vivo antioxidant potential: Implications for drug-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 117-130, 2013.

JAYAPRAKASH, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models *in-vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1018-1022, 2001.

- KOGAN, G.; STASKO, A.; BAUEROVA, K.; POLOVKA, M.; SOLTES, L.; BREZOVA, V.; NAVAROVÁ, J.; MIHALOVÁ, D. Antioxidant properties of yeast (1-3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectrometry and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 18-28, 2005.
- KUO, F.; SUBRAMANIAN, B.; KOTYLA, T.; WILSON, T.A.; YOGANATHAN, S.; NICOLOSI, R.J. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 206-213, 2008.
- LEE, K.J.; CHOI, J.H.; JEONG, H.G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2118-2125, 2007.
- LI, J.; LI, D.F.; XING, J.J.; CHENG, Z.B.; LAI, C.H. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2374-2381, 2006.
- MANZOCCO, L.; ANESE, M.; NICOLI, M.C. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. **Lebens-mittel-Wissenschaft Und-Technology**, v. 31, p. 694-698, 1998.
- MARCOCCI, I.; MARGUIRE, J. J.; DROY-LEFAIZ, M.T.; PACKER, L. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, p. 748-755, 1994.
- MASWAL, M.; DAR, A.A. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. **Food Hydrocolloids**, v. 37 182-195, 2014.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, v. 210, p. 925-931, 2000.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; MUELLER, M.; SCHWARZ, K.; ALEGRE, L. Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1431-1437, 2001.
- NUNES, G.B.L.; POLICARPO, P.R.; COSTA, L.M.; DA SILVA, T.G.; MILITÃO, G.C.G.; CÂMARA, C.A.; FILHO, J.M.B.; GUTIERREZ, S.J.C.; ISLAM, M.T.; DE FREITAS, R.M. *In Vitro* Antioxidant and Cytotoxic Activity of Some Synthetic Riparin-Derived Compounds. **Molecules**, v. 19, p. 4595-4607, 2014.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D.J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 388, p. 95-102, 2012.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.
- PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 253-259, 2008.
- PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 842-847, 2002.
- RUCH, R.J.; CHENG, S.J.; KLAUNIG, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogens**, v. 10, p. 1003-1008, 1989.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D.J. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 411, p. 105–113, 2013.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SAFFI, J.; SONEGO, L.; VARELA, Q.D.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of L-ascorbic acid in wild-type and superoxide dismutase deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Report**, v. 11, p. 179-184, 2006.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J. K.; CHANOTIYA, C. S.; SHANKER, K.; NEGI, A. S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.

SEERAM, N.P.; HENNING, S.M.; LEE, R.; NIU, Y.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Catechin and caffeine contents of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1599-1603, 2006.

SHAH, M.A.; BOSCO, S.J.D.; MIR, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21-33, 2014.

SOYLU, E.M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathology**, v. 161, p. 119-128, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.39, p. 44-84, 2007.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidências científicas apontam diversas atividades farmacológicas e terapêuticas para o fitol, mas ainda são restritas as informações sobre os seus riscos toxicogênicos, bem como os estudos das atividades farmacológicas do fitol em nanoemulsão. Nos sistemas *A. salina* e *A. cepa* foi possível pontuar para o fitol e para a nanoemulsão atividades tóxicas, citotóxicas genotóxicas e mutagênicas, com capacidade de reparo de danos, especialmente para as maiores concentrações testadas. Efeitos contrários foram observados em concentrações menores. Em estudo com *A. salina* e em eritrócitos de ratos, em cotratamento com drogas padrões para toxicidade, citotoxicidade e atividade antioxidante, tais como o ácido etileno diamino tetra-acético, dicromato de potássio, sulfato de cobre e trolox, foi possível evidenciar que o fitol pode induzir lise de membranas, oxidação celular, citogenotoxicidade nas maiores concentrações testadas. E, nas menores concentrações, atividade citoprotetora e antioxidante. Assim, o fitol teve atividades citoprotetoras por possíveis mecanismos associados a atividades antioxidantes, que também foram evidenciadas *in vitro* pela captura e sequestro de radicais livres; *ex vivo* por inibir lise de membranas celulares; e em *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas antioxidantes para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, bem como para catalase e duplos mutantes. Por suas propriedades tóxicas, citotóxicas/citoprotetoras, oxidantes/antioxidantes, em estudos não clínicos, o fitol e, em especial, sua formulação em nanoemulsão podem ser consideradas como de importância para prevenção e terapias de patologias associadas ao estresse oxidativo e proliferação celular. A **Figura 1** e a **Tabela 1** apresentam os dados que resumem os efeitos demonstrados pelo FIT e FNE em sistemas teste aplicados. Assim, como sugestões para os prováveis mecanismos para explicar as atividades indentificadas, o estudo segue novas pesquisas com outros sistemas teste indispensáveis para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

Figura 1. Atividades farmacológicas do FIT livre e nanoemulsionado em sistemas teste para avaliação toxicogenética, oxidante/antioxidantes.

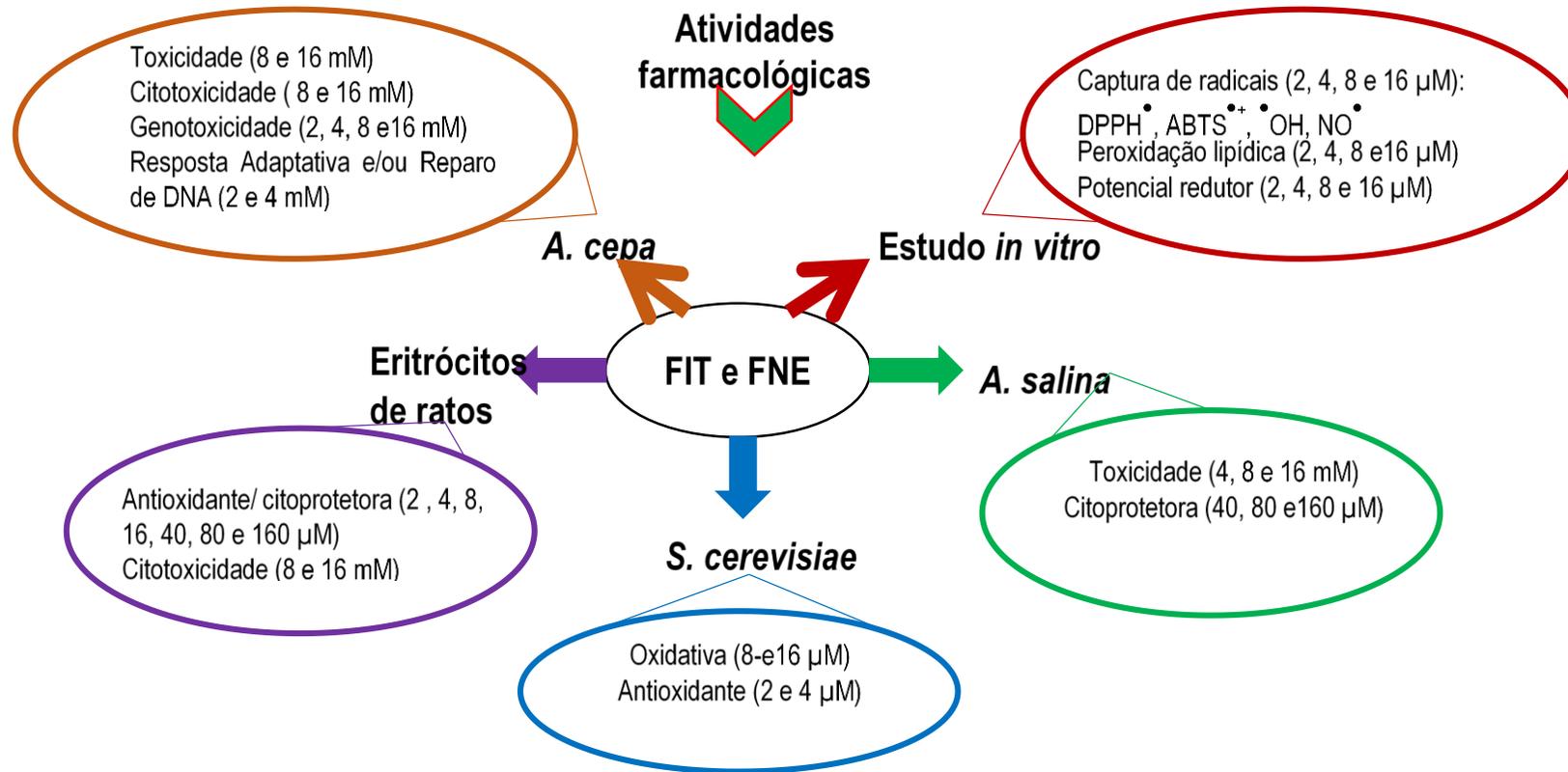


Tabela 1. Efeitos do FIT e FNE em sistemas teste e seus prováveis mecanismos de ação.

Sistema teste/atividade	Fitol livre	Fitol nanoemulsão
	Concentrações/Possíveis mecanismos	Concentrações/Possíveis mecanismos
Allium cepa		
Toxicidade	8 e 16 mM/ Alteração do potencial de membrana; apoptose e necrose.	8 e 16 mM/ Permeabilidade elevada; Alteração do potencial de membrana; ruptura da membrana; apoptose e necrose.
Citotoxicidade	8 e 16 mM/ Efeito pró-oxidante; inibição de crescimento de regiões meristemáticas; Antimitótica através da interferência do ciclo mitótico normal ou aumento da duração das fases G2 e S.	8 e 16 mM/ Efeito pró-oxidante; inibição de crescimento de regiões meristemáticas; Antimitótica através da interferência do ciclo mitótico normal ou aumento da duração das fases G2 e S.
Genotoxicidade	2, 4, 8 e 16 mM/ A ruptura das cadeias de DNA mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) e malondialdeído (MDA), principalmente as rupturas de cadeia simples (SSB).	2, 4, 8 e 16 mM/ A ruptura das cadeias de DNA mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) e malondialdeído (MDA), principalmente as rupturas de cadeia simples (SSB).
Resposta Adaptativa e/ou Reparo de DNA	2 e 4 mM/ Inibição de quebras de DNA e a ocorrência do reparo por recombinação de homólogos e/ou não homólogos (HRR/NHEJ).	2 e 4 mM/ Inibição de quebras de DNA e a ocorrência do reparo por recombinação de homólogos e/ou não homólogos (HRR/NHEJ).
Artemia salina		
Toxicidade/citotoxicidade	4, 8 e 16 mM/ Efeito pró-oxidante/ alteração de potencial de membrana.	4,8 e 16 mM/ Elevada permeabilidade; Efeito pró-oxidante; alteração do potencial de membrana.
Citoprotetora	40, 80 e 160 µM/ Efeito antioxidante através de captura de radicais e inibição de peroxidação lipídica.	--
Eritrócitos de ratos		
Citotoxicidade	8 mM/ Lise de membrana induzida por EROs; Efeitos nocivos sobre macromoléculas celulares tais como carboidratos, proteínas, lipídeos e materiais genéticos (DNA, RNA).	--
Antioxidante/citoprotetora	2, 4, 8, 16, 40, 80 e 160 µM/ Redução do estresse oxidativo, provavelmente através do efeito de remoção de EROs, especialmente o radical hidroxila OH; Inibição da peroxidação lipídica.	2, 4, 8 e 16 µM/ Redução do estresse oxidativo, provavelmente através do efeito de remoção de EROs, especialmente o radical hidroxila OH; Inibição da peroxidação lipídica.

Saccharomyces cerevisiae

Oxidativa	16 µM para superóxido dismutase citoplasmática em mitocondrial e em todas para os duplos mutantes. Estresse antioxidante ou efeito pró-oxidante; alteração do potencial de membrana e lise de membrana.	8 e 16 µM para superóxido dismutase citoplasmática em mitocondrial e em todas para os duplos mutantes superóxido dismutase citoplasmática em mitocondrial e em todas para os duplos mutantes e catalase. Elevada permeabilidade de membrana; Estresse antioxidante ou efeito pró-oxidante; alteração de potencial de membrana e lise de membrana.
Antioxidante	2 e 4 µM/ Efeito de captura de EROs, especialmente o radical •OH; Efeitos de regulação positiva sobre sistemas antioxidantes fisiológicos, tais como superóxido dismutase (SOD: citosólica e mitocondrial), catalase.	2 e 4 µM/ Efeito de captura de EROs, especialmente o radical •OH; Efeitos de regulação positiva sobre sistemas antioxidantes fisiológicos, tais como superóxido dismutase (SOD: citosólica e mitocondrial), catalase.

Estudos antioxidantes (in vitro)

DPPH•	2, 4, 8 e 16 µM/ Capacidade de captura de radical.	2, 4, 8 e 16 µM/ Capacidade de captura de radical.
ABTS•+		
•OH		
NO•		
Peroxidação lipídica	2, 4, 8 e 16 µM/ Inibição da produção do ácido tiobarbitúrico.	2, 4, 8 e 16 µM/ Inibição da produção do ácido tiobarbitúrico.
Potencial redutor	2, 4, 8 e 16 µM/ Inibição da capacidade de redução férrica (Fe ³⁺)	2, 4, 8 e 16 µM/ Inibição da capacidade de redução férrica (Fe ³⁺)

DPPH•: 1,1-difenil-picrilhidrazil radical; ABTS•+: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico); •OH: Radical hidroxila; NO•:Radical óxido nítrico; EROs: Espécies reativas de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- AACHOUI, Y.; CHOWDHURY, R.R.; FITCH, R.W.; GHOSH, S.K. Molecular signatures of phytoderived immunostimulants in the context of chemokine–cytokine microenvironment and enhanced immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 227-238, 2011a.
- AACHOUI, Y.; SCHULTE, M.L.; FITCH, R.W.; GHOSH, S.K. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: Evaluation of new phytol derivatives in induction and persistence of specific immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 308-318, 2011b.
- ABBASZADEH, G.; SRIVASTAVA, C.; WALIA, S. Insecticidal and antifeedant activities of clerodane diterpenoids isolated from the Indian bhant tree, *Clerodendron infortunatum*, against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 14, p. 1-13, 2014.
- AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS D.J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, p. 799-807, 2012.
- AHN, J.M.; HWANG, E.T.; YOUN, C.H.; BANU, D.L.; KIM, B.C.; NIAZI, J.H.; GU, M.B. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. **Biosensors Bioelectronics**, v. 25, p. 767-772, 2009.
- AKHTAR, S.; MAHJABEEN, I.; AKRAM, Z.; KAYANI, M.A. CYP1A1 and GSTP1 gene variations in breast cancer: a systematic review and case-control study. **Familial Cancer**, v. 15, p. 201-204, 2016.
- AL MUSAYEIB, N.M.; MOTHANA, R.A.; MOHAMED, G.A.; IBRAHIM, S.R.M.; MAES, L. Hypoestenonols A and B, new fusicoccane diterpenes from *Hypoestes forskalei*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 23–27, 2014.
- AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, p. 925–933, 2006.
- ANDRADE, J.M.M.; FASOLO, D. Polyphenol antioxidants from natural sources and contribution to health promotion, Chapter 20. **Polyphenols in Human Health and Diseases**, v. 1, p. 253-265, 2014.
- AQUINO, F.; BONRATH, W. **Manufacture of d,1-alpha-tocopherol**. CA2276921, 2000.
- AQUINO, F.; BONRATH, W. **Manufacturing d, 1 alfa-tocopherol by catalyzed condensation trimetilidroquinona acid with isofitol (ip) or phytol (ph) in a salvente**. PI9902781-0, 1999.
- ARMAH, F.A.; ANNAN, K.; MENSAH, A.Y.; AMPONSAH, I.K.; TOCHER, D.A.; HABTEMARIAM, S. Erythroivorenin: a novel anti-inflammatory diterpene from the root-bark of *Erythrophleum ivorense* (A Chev.) **Fitoterapia**, v. 105, p. 37–42, 2015.
- ARMSTRONG, J.S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **Bioessays**, v. 28, p. 253-260, 2006.
- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-trans-retinoic acid. **Toxicological Sciences**, v. 66, p. 274-282, 2002.
- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-transretinoic acid. **Toxicological Sciences**, v. 66, p. 274-282, 2002.

ASUA, J.M. Hand book of encapsulation and controlled release. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1283-1346, 2002.

ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; TICHY, S.E.; RUSSELL, D.; KIER, A.B.; SCHROEDER, F. Sexually dimorphic metabolism of branched-chain lipids in C57BL/6J mice. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 812-830, 2004.

AVIGAN, J.; STEINBERG, D.; GUTMAN, A.; MIZE, C.E.; MILNE, G.W. Alpha-decarboxylation, an important pathway for degradation of phytanic acid in animals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 24, p. 838-844, 1966.

AYINAMPUDI, S.R.; DOMALA, R.; MERUGU, R.; BATHULA, S.; JANASWAMY, M.R. New icetexane diterpenes with intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical scavenging activity isolated from *Premna tomentosa* roots. **Fitoterapia**, v. 83, p. 88–92, 2012.

AYINAMPUDI, S.R.; DOMALA, R.; MERUGU, R.; BATHULA, S.; JANASWAMY, M.R. New icetexane diterpenes with intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical scavenging activity isolated from *Premna tomentosa* roots. **Fitoterapia**, v. 83, p. 88–92, 2012.

AZAD, N.; RASOOLIJAZI, H.; JOGHATAIE, M.T.; SOLEIMANI, S. Neuroprotective effects of carnosic acid in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. **Cell Journal**, v. 13, p. 39-44, 2015.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, p. 315-332, 2007.

BAE, Y.; KATAOKA, K. Intelligent polymeric micelles from functional poly (ethylene glycol)-poly (amino acid) block copolymers. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 768-784, 2009.

BAHADAR, H.; MAQBOOL, F.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iranian Biomedical Journal**, v.20, p.1-11, 2016.

BAI, T.; YAO, Y.L.; JIN, X.J.; LIAN, L.H.; LI, Q.; YANG, N.; JIN, Q.; WU, Y.L.; NAN, J.X. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, ameliorates the development of liver fibrosis via LXRs signals. **Chemico-Biological Interactions**, v. 218, p. 63–70, 2014.

BAKARE, A.A.; OKUNOLA, A.A.; ADETUNJI, O.A.; JENMI, H.B. Genotoxicity assessment of a pharmaceutical effluent using four bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 373-381, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARILE, E.; FATTORUSSO, E.; IALENTI, A.; IANARO, A.; LANZOTTI, V. 2007. Paraliane and pepluane diterpenes as anti-inflammatory agents: first insights in structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, v. 4196–4200, 2007.

BARNES, E.C.; KAVANAGH, A.M.; RAMU, S.; BLASKOVICH, M.A.; COOPER, M.A.; DAVIS, R.A. 2013. Antibacterial serrulatane diterpenes from the Australian native plant *Eremophila microtheca*. **Phytochemistry**, v. 93, p. 162–169, 2013.

BARREIROS, M.L.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M.; XAVIER LOPES, L.M.; DE SÁ, M.S.; COSTA, J.F.; ALMEIDA, M.Z.; DE QUEIROZ, L.P.; SANT'ANA, A.E. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1735–1739, 2007.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. In: Berger, R.G. (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. **Springer**, Berlin, Germany, p. 43-86, 2007.

BAUMSTARK-KHAN, C.; HELLWEG, C.E.; REITZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity reporter systems based on the use of mammalian cells. **Whole Cell Sensing System II**, v. 118, p. 113-151, 2010.

BAYLOR, N.W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines – US perspective. **Vaccine**, v. 20, p. 18-23, 2002.

BEG, M.; SHANKAR, K.; VARSHNEY, S.; RAJAN, S.; SINGH, S.P.; JAGDALE, P.; PURI, A.; CHAUDHARI, B.P.; SASHIDHARA, K.V.; GAIKWAD, A.N. A clerodane diterpene inhibit adipogenesis by cell cycle arrest and ameliorate obesity in C57BL/6 mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 399, p. 373–385, 2015.

BERNHARD, V.K.; MAIER, R.; RITZEL, G. Effect of phytol on liver lipids. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiol. **Chemistry**, v. 348, p. 759-764, 1967.

BERO, J.; BEAUFAY, C.; HANNAERT, V.; HÉRENT, M.F.; MICHELS, P.A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, v. 20, p. 270-274, 2013.

BHATTACHARYA, A.K.; CHAND, H.R.; JOHN, J.; DESHPANDE, M.V. Clerodane type diterpene as a novel antifungal agent from *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 94, p. 1–7, 2015.

BISHARA, A.; RUDI, A.; GOLDBERG, I.; BENAYAHU, Y.; YKASHMAN, Y. Novaxenicins A–D and xeniolides I–K, seven new diterpenes from the soft coral *Xenia novaebritanniae*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 12092–12097, 2006.

BLANKENSHIP, R.E. **Molecular Mechanisms of Photosynthesis**. Blackwell Scientific Publications, 2002.

BOUVIER, F.; RAHIER, A.; CAMARA, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 357-429, 2005.

BOUYER, E.; MEKHOLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J.-L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 436, p. 359-378, 2012.

BRAISSANT, O.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α , β , and γ during rat embryonic development. **Endocrinology**, v. 139, p. 2748-2754, 1998.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs **Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 315-326. Maio 2010

BRIESKORN, C.H.; DÖMLING, H. Carnosolsäure, der wichtige antioxidativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 141, p. 10-16, 1969.

BROWN, P.J.; MEI, G.; GIBBERD, F.B.; BURSTON, D.; MAYNE, P.D.; MCCLINCHY, J.E.; SIDEY, M. Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 6, p. 295-305, 1993.

BUDDEN, S.S.; KENNAWAY, N.G.; BUIST, N.R.; POULOS, A.; WELEBER, R.G. Dysmorphic syndrome with phytanic acid oxidase deficiency, abnormal very long chain fatty acids, and pipercolic acidemia: studies in four children. **Journal of Pediatrics**, v. 108, p. 33-39, 1986.

BULUN, S.E.; LIN, Z.; IMIR, G.; AMIN, S.; DEMURA, M.; YILMAZ, B.; MARTIN, R.; UTSUNOMIYA, H.; THUNG, S.; GURATES, B.; TAMURA, M.; LANGOI, D.; DEB, S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 359-383, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BUSANELLO, E.N.; AMARAL, A.U.; TONIN, A.M.; ZANATTA, A.; VIEGAS, C.M.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. Disruption of mitochondrial homeostasis by phytanic acid in cerebellum of young rats. **Cerebellum**, v. 12, p. 362-369, 2013.

BUSANELLO, E.N.; VIEGAS, C.M.; MOURA, A.P.; TONIN, A.M.; GRINGS, M.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. In vitro evidence that phytanic acid compromises Na(+),K(+)-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. **Brain Research**, v. 1352, p. 231-238, 2010.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CALZADA, F.; BAUTISTA, E.; YÉPEZ-MULIA, L.; GARCÍA-HERNANDEZ, N.; ORTEGA, A. Antiamoebic and anti-giardial activity of clerodane diterpenes from Mexican *Salvia* species used for the treatment of diarrhea. **Phytotherapy Research**, v.29, p. 1600–1604, 2015.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A.R.; MEDINA, M.A.; 2015. Chapter 70 - Kahweol, a coffee diterpene with anti-inflammatory properties. **Coffee in Health Disease Prevention** p. 627–633, 2015

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: Thor- mar, H. (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. **John Wiley & Sons**, UK, p. 203-238, 2011.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 50-62, 2006.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents in Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, A.C.; GOMES, A.C.; PEREIRA-WILSON, C.; LIMA, C.F. Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: insights on replicative senescence. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 83, p. 262–272, 2015

CHATTER, R.; KLADI, K.; TARHOUNI, S.; MAATOUG, R.; KHARRAT, R.; VAGIAS, V.; ROUSSIS, V. Neorogioltriol: a brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 25–28, 2009.

CHE, B.N.; OKSBJERG, N.; HELLGREN, L.I.; NIELSEN, J.H.; YOUNG, J.F. Phytanic acid stimulates glucose uptake in a model of skeletal muscles, the primary porcine myotubes. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 14, 2013.

CHEENPRACHA, S.; YODSAOUE, O.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; SUBHADHIRASAKUL, S.; TEWTRAKUL, S.; KANJANA-OPAS, A. 2006. Potential anti-allergic *ent*-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2630–2634, 2006.

CHEN, H.; WANG, H.; YANG, B.; JIN, D.Q.; YANG, S.; WANG, M.; XU, J.; OHIZUMI, Y.; GUO, Y. Diterpenes inhibiting NO production from *Euphorbia helioscopia*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 133-138, 2014.

CHENDA, L.B.N.; KOUAM, S.F.; LAMSHÖFT, M.; KUSARI, S.; TALONTSI, F.M.; NGADJUI, B.T.; SPITELLER, M. 2014. Isolation and characterization of six labdane diterpenes and one pregnane steroid of *Turraeanthus africanus*. **Phytochemistry**, v. 103, p. 137–144, 2014.

CHO, J.H.; LEE, J.Y.; SIM, S.S.; WHANG, W.K.; KIM, C.J. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. **Pulmonary Pharmacology Therapeutics**, v. 23, p. 190–199, 2010.

CHOI, Y.H.; AHN, S.J.; PARK, K.Y.; YOO, M.A.; LEE, W.H. Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in salmonella and drosophila mutation assaying systems. **Environment Mutagenesis and Carcinogenesis**, v. 13, p. 92-100, 1993.

CHOWDHURY, R.R.; FITCH, R.W.; GHOSH, S.K. Efficacy of phytol-derived diterpenoid immunoadjuvants over alum in shaping the murine host's immune response to *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 31, p. 1178-1186, 2013.

CIRNE-SANTOS, C.C.; SOUZA, T.M.L.; TEIXEIRA, V.L.; FONTES, F.F.L.; REBELLO, M.A.; CASTELLO-BRANCO, L.R.R.; ABREU, C.L.; TANURI, A.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; BOU-HABIB, D.C. The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. **Antiviral Research**, v. 77, p. 64–71, 2008.

CLAYTON, P.T.; JOHNSON, A.W.; MILLS, K.A.; LYNES, G.W.; WILSON, J.; CASTEELS, M.; MANNAERTS, G. Ataxia associated with increased plasma concentrations of pristanic acid, phytanic acid and C27 bile acids but normal fibroblast branched-chain fatty acid oxidation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 19, p. 761-768, 1996.

COSENTINO, M.; LUINI, A.; BOMBELLI, R.; CORASANITI, M.T.; BAGETTA, G.; MARINO, F. The essential oil of bergamot stimulates reactive oxygen species production in human polymorphonuclear leukocytes. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1232–1239, 2014.

COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C.; PATRÍCIO, C.C.M.; SOARES, M.F.L.R. **Applications of phytol in pharmaceutical formulations anxiolytic and antidepressant properties**. BRP11106397, 2011.

COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.L.; DE ALMEIDA, A.A.C.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, p. 115- 118, 2010.

COSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; CIRINO, G.; DE GRUTTOLA, L.; ROVIEZZO, F. Tedanol: a potent anti-inflammatory *ent*-pimarane diterpene from the Caribbean Sponge *Tedania ignis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7542–7547, 2009.

CUADRADO-BERROCAL, I.; GÓMEZ-GAVIRO, M.V.; BENITO, Y.; BARRIO, A.; BERMEJO, J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.E.; SÁNCHEZ, P.L.; DESCO, M.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; BOSCA, L.; DE LAS HERAS, B. A labdane diterpene exerts ex

vivo and *in vivo* cardioprotection against post-ischemic injury: involvement of AKT-dependent mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, p. 428–439, 2015.

DANG, Q.L.; CHOI, Y.H.; CHOI, G.J.; JANG, K.S.; PARK, M.S.; PARK, N.J.; LIM, C.; KIM, H.; NGOC, L.H.; KIM, J.C. Pesticidal activity of ingenane diterpenes isolated from *Euphorbia kansui* against *Nilaparvata lugens* and *Tetranychus urticae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 51–54, 2010.

DANI, C.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; PEREIRA, M.D.; HENRIQUES, J.A.; ELEUTHERIO, E. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4268–4272, 2008.

DAS, M.K.; KALITA, B. Design and Evaluation of Phyto-Phospholipid Complexes (Phytosomes) of Rutin for Transdermal Application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, p. 051–057, 2014.

DE LA TORRE-RUIZ, M.A.; PUJOL, N.; SUNDARAN, V. Coping with oxidative stress. The yeast model. **Current Drug Targets**, v. 16, p. 2–12, 2015.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 1–16, 1984.

DEVAPPA, R.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Jatropha Diterpenes: a Review. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 301–322, 2011.

DÍAZ-VICIEDO, R.; HORTELANO, S.; GIRÓN, N.; MASSÓ, J.M.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; DE LAS HERAS, B. 2008. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, p. 761–766, 2008.

DIJOUX, N.; GUINGAND, Y.; BOURGEOIS, C.; DURAND, S.; FROMAGEOT, C.; COMBE, C.; FERRET, P.J. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. **Toxicology In Vitro**, v. 20, p. 480–489, 2006.

DJILANI, A.; DICKO, A. **The therapeutic benefits of essential oils**. In: Bouayed, J., Bohn, T. (Eds.), Nutrition, Well-being and Health. InTech, Croatia, p.155–178, 2012.

DOWNES, N.; FOSTER, J. Regulatory Forum Opinion Piece: Carcinogen Risk Assessment: The Move from Screens to Science. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n.8. p.1064–73. Agosto 2015.

DREWES, S.E.; MUDAU, K.E.; VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 716–722, 2006.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Indian Academy of Sciences**, v. 28, p. 637–646, 2003.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, p. 191–205, 2008.

ECKHARDT, U.; GRIMM, B.; HORTENSTEINER, S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 1–14, 2004.

ECKHARDT, U.; GRIMM, B.; HORTENSTEINER, S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 1–14, 2004.

ELDJARN, L.; TRY, K.; STOKKE, O. The existence of an alternative pathway for the degradation of branch-chained fatty acids, and its failure in hereditary atactica polyneuritisiformis (Refsum's disease). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 116, p. 395–397, 1966.

ELMAZAR, M.M.; EL-ABHAR, H.S.; SCHAALAN, M.F.; FARAG, N.A. Phytol/Phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS One**, v. 8, p. e45638, 2013.

ELMAZAR, M.M.; NAU, H. Potentiation of the teratogenic effects induced by co-administration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic retinoid receptor ligands. **Archives of Toxicology**, v. 78, p. 660-668, 2004.

ENDRINGER, D.C.; TAVEIRA, F.S.N.; KONDRATYUK, T.T.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. Cancer chemoprevention activity of labdane diterpenes from rhizomes of *Hedychium coronarium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 408-412, 2014.

EO, S.K.; UYANGAA, E.; CHOI, J.Y.; PATIL, A.M.; KIM, J.H.; KIM, S.B. 45: Functional restoration of exhausted CD4⁺ and CD8⁺ T cells in chronic viral infection by daphnane diterpene ester derived from *Daphne genkwa* flos buds via negative regulatory Tim-3 molecule. **Cytokine**, v. 70, p. 38-39, 2014.

FABRICE, A.; WERNER, B. Manufacture of d,1-alpha-tocopherol. CA2276921, 2000.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARCAL, L.; TORRES ANDÓN, F.; DI CRISTO, L.; ROTOLI, B.M.; BUSSOLATI, O.; BERGAMASC, E.; et al. Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. **PLoS ONE**, v.10, n.5, p.1-34. Maio 2015.

FARRUGIA, C.A.; GROVES, M.J. Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticulate formulation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 643-649, 1999.

FENG, J.; ROCH, M.; VIGOLO, D.; ARNAUDOV, L.N.; STOYANOV, S.D. GURKOV, T.D.; TSUTSUMANOVA G.G.; STONE, H.A. Nanoemulsions obtained via bubble-bursting at a compound interface. **Nature Physics**, v. 10, p. 606-612, 2014.

FISCHEDICK, J.T.; STANDIFORD, M.; JOHNSON, D.A.; JOHNSON, J.A. 2013. Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2618-2622, 2013.

FISKESJO, G. The *Allium* test as standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FORMHALS, A. **US Patent 1, 975, 504**, US Pat, 1975504, 1934.

FORTUNE, J.M.; PAVLOV, Y.I.; WELCH, C.M.; JOHANSSON, E.; BURGERS, P.M.; KUNKEL, T.A. *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta: high fidelity for base substitutions but lower fidelity for single- and multi-base deletions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 29980-19987, 2005.

FRYD M.M.; MASON, T.G. Time-Dependent Nanoemulsion Droplet Size Reduction By Evaporative Ripening. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 1, p. 3349-3353, 2010.

GADHAVE, A.D. Nanoemulsions: Formation, Stability and Applications. **International Journal of Advanced Science and Technology**, v. 2, p. 38-43, 2014.

GAJARDO G.M.; BEARDMORE, J.A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 185, 2012.

GARCIA, F.A.O.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.B.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, p.1021-1025, 2014.

- GBEDEMA, S.Y.; BAYOR, M.T.; ANNAN, K.; WRIGHT, C.W. Clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* (Sonn) Thw. var. *pendula*: potential antimalarial agents for drug resistant *Plasmodium falciparum* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 176–182, 2015.
- GHANADIAN, M.; SADRAEI, H.; YOUSUF, S.; ASGHARI, G.; CHOUDHARY, M.I.; JAHED, M. New diterpene polyester and phenolic compounds from *Pycnocycla spinosa* Decne. Ex Boiss with relaxant effects on KCl-induced contraction in rat ileum. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 57–61, 2014.
- GHOSH, S.K. **Inventor phytol derived immunoadjuvants and their use in vaccine formulations**. United States of America patent US8088395, 2012.
- GHOSH, S.K. **Phytol derived immunoadjuvants and their use in vaccine formulations**. U.S. patent 20060292163, 2005
- GHOSH, S.K. **Phytol derived immunoadjuvants and their use in vaccine formulations**. U.S. patent 20060292163, 2006
- GIACOMELLI, E.; BERTRAND, S.; NIEVERGELT, A.; ZWICK, V.; SIMOES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; RIVARA-MINTEN, E.; CUENDET, M.; BISIO, A.; WOLFENDER, J.L. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugate*. **Phytochemistry**, v. 96, p. 257–264, 2013.
- GLOERICH, J.; VAN DEN BRINK, D.M.; RUITER, J.P.N.; VAN VLIES, N.; VAZ, F.M.; et al. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR α in its regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 77-85, 2007.
- GONG, C.; DENG, S.; WU, Q.; XIANG, M.; WEI, X.; LI, L.; GAO, X.; WANG, B.; SUN, L.; CHEN, Y. Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles. **Biomaterials**, v. 34, p. 1413-1432, 2013.
- GONZÁLEZ-BURGOS, E.; CARRETERO, M.E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Kaurane diterpenes from *Sideritis* spp. exert a cytoprotective effect against oxidative injury that is associated with modulation of the Nrf2 system. **Phytochemistry**, v. 93, p. 116-123, 2013.
- GONZÁLEZ-BURGOS, E.; CARRETERO, M.E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Corrigendum to “Involvement of NRF2 signaling pathway in the Neuroprotective activity of natural kaurane diterpenes”. **Neuroscience**, v.269, p. 131–133, 2014.
- GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T.; FUSHIKI, T.; KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 440-445, 2005.
- GRACE, M.H.; JIN, Y.; WILSON, G.R.; COATES, R.M. Structures, biogenetic relationships, and cytotoxicity of pimarane-derived diterpenes from *Petalostigma pubescens*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1708–1715, 2006.
- GUANYI, D. **Phytol fuel and special engine**. CN1908127, 2007.
- GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, p. GE01-GE05, 2015.
- GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J.; YANG, L.; LIU, W.; YUAN, X.; ZHANG, G. WANG, F. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, p. 23-32, 2014.

- GUO, P.; LI, Y.; JIN D-Q, X.J.; HE, Y.; ZHANG, L.; GUO, Y. *neo*-Clerodane diterpenes from *Ajuga ciliata* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 563–566, 2012.
- GUPTA, A.; ERAL, H.B.; HATTON, T.A.; DOYLE, P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, p. 2826-41, 2016.
- GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters Applied Microbiology**, v. 26, p. 194–198, 1998.
- GUZMAN, A.; GARCIA, C.; MARIN, A.P.; PROUDLOCK, R.J.; FERNÁNDEZ DE HENESTROSA, A.R.; RUIZ, M.T.; TORTAJADA, A.; LLOYD, M.; MARCOS, R. Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand candidates. **Mutation Research**, v. 653, p. 91-98, 2008.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HABTEMARIAM, S.; VARGHESE, G.K. A novel diterpene skeleton: identification of a highly aromatic, cytotoxic and antioxidant 5-methyl-10-demethyl-abietane-type diterpene from *Premna serratifolia*. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 80–85, 2015.
- HANSEN, R.P. Occurrence of phytanic acid in rumen bacteria, **Nature**, v. 210, p. 841, 1966.
- HANSEN, R.P. Phytol: its metabolic products and their distribution. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 23, p. 259-275, 1980.
- HE, F.; LINDQVIST, C.; HARDING, W.H. Leonurenones A–C: labdane diterpenes from *Leonotis leonurus*. **Phytochemistry**, v. 83, p. 168–172, 2012.
- HEIM, M.; JOHNSON, J.; BOESS, F.; BENDIK, I.; WEBER, P.; et al. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 16, p. 718-720, 2002.
- HELDING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; MATTHEWS, J.; CHENG, G.; HARTMAN, J.; TUJAGUE, M.; STRÖM, A.; TREUTER, E.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, **Physiology Reviews**, v. 87, p. 905-931, 2007.
- HELLGREN, L.I. Phytanic acid—an overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 42-49, 2014.
- HENRY, G.E.; ADAMS, L.S.; ROSALES, J.C.; JACOBS, H.; HEBER, D.; SEERAM, N.P. Kaurene diterpenes from *Laetia thamnii* inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 244, p. 190–194, 2006.
- HIRATA, A.; KIM, A.Y.; KOBAYAKAWA, N.; TANAKA, N.; KASHIWADA, Y. 2015. Miltiorins A–D, diterpenes from *Radix Salviae miltiorrhizae*. **Fitoterapia**, v. 102, p. 49–55, 2015.
- HOEFLER, G.; HOEFLER, S.; WATKINS, P.A.; CHEN, W.W.; MOSER, A.; BALDWIN, V.; MCGILLIVARY, B.; CHARROW, J.; FRIEDMAN, J.M.; RUTLEDGE, L.; HASHIMOTO, F.; MOSER, H.W. Biochemical abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. **Journal of Pediatrics**, v. 112, p. 726-733, 1988.
- HOET, S.; STE´VIGNY, C.; HE´RENT, M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, v. 72, p. 480-482, 2006.

HOLMDAHL, R.; HULTQVIST, M.; OLOFSSON, P. **Phytol as a cholesterol lowering agent.** WO113952, 2009.

HOLT, C.; SAWYER, L. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β - and κ -caseins. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 89, p. 2683-2692, 1993.

HU, J.Y.; LI, C.L.; WANG, Y.W. Intrathecal administration of triptolide, a T lymphocyte inhibitor, attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Brain Research**, v. 436, p. 122–129, 2012.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, r.50-57, 2010

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.

HYATT, J.A. **A process for producing phytol, phytene, a derivative Isophytol, a Isophytene derivative, or a mixture thereof, Composite epoxifitila replaced, compound of substituted fiteno, process for producing the same, process for producing alpha-tocopherol and, process for Coverter geranylgeraniol The alpha-tocopherol.** PI9911873-4, 1999.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interaction with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAIISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.

IPEK, E.; ZEYTIÑOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B.A.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, v. 93, p. 551–556, 2005.

ISHIBASHI, Y.; NAGAMATSU, Y.; MIYAMOTO, T.; MATSUNAGA, N.; OKINO, N.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. A novel ether-linked phytol-containing digalactosylglycerolipid in the marine green alga, *Ulva pertusa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, p. 873-880, 2014

ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M.T.; MATA, A.M.O.F.; AGUIAR, R.P.S.; PAZ, M.F.C.J.; ALENCAR, M.V.O.B.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Therapeutic Potential of Essential Oils Focusing on Diterpens. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1420-1444, 2016.

IZZO, A.A.; HOON-KIM, S.; RADHAKRISHNAN, R.; WILLIAMSON, E.M. A critical approach to evaluating clinical efficacy, adverse events and drug interactions of herbal remedies. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 691-701, 2016.

JACKANICZ, T.M.; NASH, H.A.; WISE, D.L.; GREGORY, J.B. Polylactic acid as a biodegradable carrier for contraceptive steroids. **Contraception**, v. 8, p. 227-234, 1973.

JANSEN, G.A.; DENIS, S.; VERHOEVEN, N.M.; JAKOBS, C.; WANDERS, R.J. Phytanic acid alphaoxidation in man: identification of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal enzyme with normal activity in Zellweger syndrome. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, p. 421-424, 2002.

- JEENA, K.; LIJU, V.B.; VISWANATHAN, R.; KUTTAN, R. Antimutagenic potential and modulation of carcinogen-metabolizing enzymes by ginger essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 849-855, 2014.
- JELLUM, E.E.L.; TRY, K. Conversion of phytol into dihydrophytol and phytanic acid. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 20, p. 2535-2538, 1966.
- JEONG-SOO, K.I.M.; HEUI-YOUNG, C.; SIJOON, L. **Method for preparing DL-alpha-tocopherol with high yield**. US6384245 (B1), 2002-05-07, 2002.
- JIAO, W.; DONG, W.; LI, Z.; DENG, M.; LU, R. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia lathyris* as modulators of multidrug resistance and their crystal structures. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4786-4792, 2009.
- JIMÉNEZ-ROMERO, C.; MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D. 2014. Dactyloditerpenol acetate, a new prenylbisabolane-type diterpene from *Aplysia dactylomela* with significant *in vitro* anti-neuroinflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, p. 344-348, 2014.
- JUDAH, M.A.; BURDICK, E.M.; CARROLL, R.G. Chlorophyll by solvent extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 2262-2271, 1954.
- JUNG, W.K.; HEO, S.J.; JEON, Y.J.; LEE, C.M.; PARK, Y.M.; BYUN, H.G.; CHOI, Y.H.; PARK, S.G.; CHOI, I.W.. Inhibitory effects and molecular mechanism of dieckol isolated from marine brown alga on COX-2 and iNOS in microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 4439-4446, 2009.
- KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 460, 1993.
- KAKRAN, M.; SHEGOKAR, R.; SAHOO, N.G.; AL SHAAL, L.; LI, L.; MÜLLER, R.H. Fabrication of quercetin nanocrystals: comparison of different methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80 p. 113-121, 2012.
- KANG, S.H.; KWON, J.Y.; LEE, J.K.; SEO, Y.R. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 277-288, 2013.
- KARTHIKEYAN, S.; PRASAD, N.R.; GANAMANI, A.; BALAMURUGAN, E. Anticancer activity of resveratrol loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 64-73, 2013.
- KATARIA, Y.; WRIGHT, M.; DEATON, R.J.; RUETER, E.E.; RYBICKI, B.A.; MOSER, A.B.; ANANTHANAYANAN, V.; GANN, P.H. Dietary influences on tissue concentrations of phytanic acid and AMACR expression in the benign human prostate. **Prostate**, v. 75, p. 200-210, 2015.
- KHALILI FARD, J.; JAFARI, S.; EGHBAL, M.A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 447-454, 2015;
- Kiss, T.; Orvos, P.; Bánsághi, S.; Forgo, P.; Jedlinszki, N.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. firmum and GIRK channel activities of some Aconitum alkaloids. **Fitoterapia**, v. 90, p. 85-93, 2013.
- KITAGAWA T¹, OKITA H, BARON B, TOKUDA K, NAKAMURA M, WANG Y, AKADA J, HOSHIDA H, AKADA R, KURAMITSU Y, NAKAMURA K. Mutant screening for oncogenes of Ewing's sarcoma using yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 6734-6744, 2015.

- KOCH, A.; ORJALA, J.; MUTISO, P.C.; SOEJARTO, D.D. 2006. An antimalarial abietane diterpene from *Fuerstia africana* T.C.E. Fries. **Biochemical and Systematics Ecology**, v. 34, p. 270–272, 2006.
- KOMEN, J.C.; DISTELMAIER, F.; KOOPMAN, W.J.; WANDERS, R.J.; SMEITINK, J.; WILLEMS, P.H. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3271–3281, 2007.
- KOMEN, J.C.; DURAN, M.; WANDERS, R.J. Characterization of phytanic acid omega hydroxylation in human liver microsomes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 85, p. 190–195, 2005.
- KONECSNI, K.; LOW, N.; NICKERSON, M. Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1775–1779, 2012.
- KRUSKA, N.; REISER, G. Phytanic acid and pristanic acid, branched-chain fatty acids associated with Refsum disease and other inherited peroxisomal disorders, mediate intracellular Ca²⁺ signaling through activation of free fatty acid receptor GPR40. **Neurobiology of Disease**, v. 43, p. 465–472, 2011.
- KULAKOWSKI, D.; KITALONG, C.; NEGRIN, A.; TADAO, V.R.; BALICK, M.J.; KENNELLY, E.J. Traditional preparation of *Phaleria nisidai*, a Palauan tea, reduces exposure to toxic daphnane-type diterpene esters while maintaining immunomodulatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 273–279, 2015.
- LEE, C.L.; CHANG, F.R.; HSIEH, P.W.; CHIANG, M.Y.; WU, C.C.; HUANG, Z.Y.; LAN, Y.H.; CHEN, M.; LEE, K.H.; YEN, H.F.; HUNG, W.C.; WU, Y.C. Cytotoxic *ent*-abietane diterpenes from *Gelonium aequoreum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 276–287, 2008.
- LEIPNITZ, G.; AMARAL, A.U.; ZANATTA, A.; SEMINOTTI, B.; FERNANDES, C.G.; KNEBEL, L.A.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. **Life Sciences**, v. 87, p. 275–280, 2010.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review of its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009
- LESGARDS, J.F.; BALDOVINI, N.; VIDAL, N.; PIETRI, S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1423–1446, 2014.
- LI, C.J.; ZHANG, D.M.; LUO, Y.M.; YU, S.S.; LI, Y.; LU, Y. Bis-sesquiterpenes and diterpenes from *Chloranthus henryi*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2867–2874, 2008.
- LI, Y.X.; ZUO, W.J.; MEI, W.L.; CHEN, H.Q.; DAI, H.F. 2014. A new diterpene from the stems of *Trigonostemon heterophyllus*. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 12, p. 297–299, 2014.
- LI, Z.; PERCIVAL, S.S.; BONARD, S.; GU, L. Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 1096–1103, 2011.
- LIM, S.Y.; BAUERMEISTER, A.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 2. Assessment of efficacy in the induction of protective immune responses to lethal bacterial infections in mice. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 4, p. 5, 2006.
- LIM, S.Y.; MEYER, M.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. Assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses, **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 4, p. 6, 2006

- LIM, S.Y.; MEYER, M.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 5, p. 3, 2007.
- LIMAN, R.; CIG˘ERCI, I.H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, 61-64, 2011.
- LISKA, J.; MACEJOVA, D.; ONDKOVA, S.; BRTKO, J. Morphology of 1-methyl-1-nitrosourea induced rat mammary tumours after treatment with precursor of phytanic acid or its combination with vitamin D analogue. **Endocrine Regulations**, v. 46, p. 21-26, 2002.
- LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; PICHARDO, S.; MAISANABA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A.I.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 9-27, 2015.
- LU, X.; JI, C.; XU, H.; LI, X.; DING, H.; YE, M.; ZHU, Z.; DING, D.; JIANG, X.; DING, X. Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from A β -induced oxidative stress. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, p. 89-96, 2009.
- LUBINI, G.; FACHINETTO, J.; LAUGHINGHOUSE, H. I. V.; PARANHOS, J.; SILVA, A. F.; TEDESCO, S. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v. 63, p. 647-651, 2008.
- MA, G.; SUN, Z.; SUN, Z.; YUAN, J.; WEI, H.; YANG, J.; WU, H.; XU, X. Antimalarial diterpene alkaloids from the seeds of *Caesalpinia minax*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 234-239, 2014.
- MA, M.; JIANG, Z.Z.; RUAN, J.L.; ZANG, L.Y. Toxicity of a Diterpene Lactone Isolated from *Dioscorea bulbifera* on Hepatocytes. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 9, p. 280-285, 2011.
- MAHDAVI, S.A.; JAFARI, S.M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. **Drying Technology**, v. 32, p. 509-518, 2014.
- MAJER, B.J.; HOFER, E.; CAVIN, C.; LHOSTE, E.; UHL, M.; GLATT, H.R.; MEINL, W.; KNASMÜLLER, S. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and *N*-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 433-441, 2005.
- MALL, B.; GAUCHAN, D.P.; CHHETRI, R.B. An ethnobotanical study of medicinal plants used by ethnic people in Parbat district of western Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 103-117, 2015.
- MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v. 235, p. 114-120, 2006.
- MANZO, E.; CIAVATTA, M.L.; BAKKAS, S.; VILLANI, G.; VARCAMONTI, M.; ZANFARDINO, A.; GAVAGNIN, M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 211-215, 2009.
- MARTINSEN, A.; BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; ABAD, A.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOREL, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. **Vascular Pharmacology**, v. 52, p. 63-69, 2010.
- MASON, T.G.; WILKING, J.; MELESON, K.; CHANG, C.; GRAVES, S. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. R635, 2006.
- MATSUNO, Y.; DEGUCHI, J.; HIRASAWA, Y.; OHYAMA, K.; TOYODA, H.; HIROBE, C.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; ZAINI, N.C.; MORITA, H. Sucutiniranes A and B, new cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*. **Bioorg Med Chem Lett** **18**: 3774-3777, 2008.

- MCCARTY, M.F. The chlorophyll metabolite phytanic acid is a natural retinoid--potential for treatment and prevention of diabetes. **Medical Hypotheses**, v. 56, p. 217-219, 2001.
- MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Review Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.
- MEHRNIA, M.-A.; JAFARI, S.-M.; MAKHMAL-ZADEH, B.S.; MAGHSOUDLOU, Y. Crocin loaded nanoemulsions: Factors affecting emulsion properties in spontaneous emulsification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 261-267, 2016.
- MINH, C.V.; KIEM, P.V.; NHIEM, N.X.; CUONG, N.X.; THAO, N.P.; NAM, H.N.; ANH, H.L.T.; THUNG, D.C.; THUY, D.T.T.; KANG, H.Y.; JANG, H.D.; KIM, Y.H. Cytotoxic and antioxidant activities of diterpenes and sterols from the Vietnamese soft coral *Lobophytum compactum*. **Bioorganic & Medicine Chemistry Letters**, v. 21, p. 2155-2159, 2011.
- MITSUI, T.; ISHIHARA, R.K.I.H.; MATSUURA, N.; AKASHI, H.; NOZAKI, H. 2015. Cassane-type diterpenoids from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) and their NF- κ B signaling inhibition activities. **Phytochemistry**, v. 6, p. 349-358, 2015.
- MIYATA, S.; WANG, L.Y.; YOSHIDA, C.; KITANAKA, S. Inhibition of cellular proliferation by diterpenes, topoisomerase II inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 2048-2051, 2006.
- MONNIG, G.; WIEKOWSKI, J.; KIRCHHOF, P.; STYPMANN, J.; PLENZ, G.; FABRITZ, L.; BRUNS, H.J.; ECKARDT, L.; ASSMANN, G.; HAVERKAMP, W.; BREITHARDT, G.; SEEDORF, U. Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 15, p. 1310-1316, 2004.
- MORAES, J.; OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.G.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S.M.; PINTO, P.L.S. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e2617, 2014.
- MOREIRA, C.P.S.; OLIVEIRA, D.M.; SANTOS, C.N.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A. Platypodiol a novel clerodane diterpene from *Baccharis platypoda*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 4898-4900, 2014.
- MOSER, A.B.; HEY, J.; DRANCHAK, P.K.; KARAMAN, M.W.; ZHAO, J.; COX, L.A.; RYDER, O.A.; HACIA, J.G. Diverse captive non-human primates with phytanic acid-deficient diets rich in plant products have substantial phytanic acid levels in their red blood cells. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 10, 2013.
- MOURA, L.A.; SANCHEZ, E.F.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.1, p. 61-66, 2011.
- MUKHERJI, M.; KERSHAW, N.J.; SCHOFIELD, C.J.; WIERZBICKI, A.S.; LLOYD, M.D. Utilization of sterol carrier protein-2 by phytanoyl-CoA 2-hydroxylase in the peroxisomal alpha oxidation of phytanic acid. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 597-605, 2002.
- MUÑOZ, E.; ESCALONA, D.; SALAZAR, J.R.; ALARCON, J.; CÉSPEDES, C.L. Insect growth regulatory effects by diterpenes from *Calceolaria talcana* Grau & Ehrhart (Calceolariaceae: Scrophulariaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 283-292, 2013.
- NAGAI, K. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 33-39, 2015.

NAKATSU, T.; LUPO, A.T.; CHINN, J.W.; KANG, R.K.L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 571-631, 2000.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D.S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 39-47, 2011.

NICOLELLA, H.D.; OLIVEIRA, P.F.; MUNARI, C.C.; COSTA, G.F.; MOREIRA, M.R.; VENEZIANI, R.C.; TAVARES, D.C. Differential effect of manool – a diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 8–12, 2014.

NORT, H.M.; VULPE, C.D. Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p.4796–4813, 2010.

NORTH, M.; SHUGA, J.; FROMOWITZ, M.; SHANNON, K.M.; ZHANG, L.; SMITH, M.T.; VULPE, C.D. Modulation of ras signaling alters the toxicity of hydroquinone, a benzene metabolite and component of cigarette smoke. **BMC Cancer**, v.14, n.6, 2014.

NORTH, M.; TANDON, V.J.; THOMAS, R.; LOGUINOV, A.; GERLOVINA, I.; HUBBARD, A.E.; ZHANG, L.; SMITH, M.T.; VULPE, C.D. Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. **PLoS One**, v.6, n.8, 2011.

ODINOKOV, V.N.; MALLJABAEVA, M.I.; EMEL JANOVA, G.A.; SPIVAK, A.J.U. Method of preparing (6r,10r)-6,10,14-trimethylpentadecan-2-one (Phyton). RU2197465 (C2), 2003-01-27, 2003.

OKOUCHI, T.; ABE, T.; ARAKI, S.; ARAI, S.; IIDA, T.; WANG, L.Y.; KITANAKA, S.; MIYATA, S. Mechanism of proliferation arrest of embryonic cells of *Xenopus* by diterpene compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, v. 3847–3851, 2005.

OLIVEIRA, S.Q.O.; ALMEIDA, M.T.R.; MARASLIS, F.; SILVA, I.T.; SINCERO, T.C.M.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.M.; CARO, M.S.B.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; Isolation of three new *ent*-labdane diterpenes from *Dodonaea viscosa* Jacquin (Sapindaceae): preliminary evaluation of antiherpes activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 500–505, 2012

OLLBERDING, N.J.; ASCHEBROOK-KILFOY, B.; CACES, D.B.; WRIGHT, M.E.; WEISENBURGER, D.D.; SMITH, S.M.; CHIU, B.C. Phytanic acid and the risk of non-Hodgkin lymphoma. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 170-175, 2013.

OLOFSSON, P.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R. **Phytol as a cholesterol lowering agent**. US20110015278, 2010.

ONOUE, S.; YAMADA, S.; CHAN, H.K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1025–1037. Fevereiro 2014.

ORTUÑO, J.; SERRANO, R.; BAÑÓN, S. Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products. **Small Ruminant Research**, v. 123, p. 269–277, 2015.

PARDO-VARGAS, A.; RAMOS, F.A.; CIRNE-SANTOS, C.C.; STEPHENS, P.R.; PAIXÃO, I.C.; TEIXEIRA, V.L.; CASTELLANOS, L. Semi-synthesis of oxygenated dolabellane diterpenes with highly *in vitro* anti-HIV-1 activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 4381–4383, 2014.

PEI, Y.H.; KIM, J.W.; KANG, H.B.; LEE, H.K.; KIM, C.S.; SONG, H.H.; CHIN, Y.W.; OH, S.R. Tiglane diterpene esters with IFN γ -inducing activity from the leaves of *Aleurites fordii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 2318–2320, 2012.

PEJIN, B.; SAVIC, A.; SOKOVIC, M.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; NIKOLIC, M.; RADOTIC, K.; MOJOVIC, M. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. **Natural Product Research**, v. 28, p. 372-376, 2014.

Pérez-Fons, L.; Aranda, F.J.; Guillén, J.; Villalaín, J.; Micol, V. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, p. 224-236, 2006.

PEŠIĆ, M.; BANKOVIĆ, J.; ALJANČIĆ, I.S.; TODOROVIĆ, N.M.; JADRANIN, M.; VAJS, V.E.; TEŠEVIĆ, V.V.; VUČKOVIĆ, I.; MOMČILOVIĆ, M.; MARKOVIĆ, I.D.; TANIĆ, N.; RUŽDIJIĆ, S. New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3165–3173, 2011.

PETER, O. **Phytol as a cholesterol lowering agent**. US20140073703, 2014.

PETIWALA, S.M.; JOHNSON, J.J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**, v. 367, p. 93–102, 2015.

PIAZ, F.D.; COTUGNO, R.; LEPORE, L.; VASSALLO, A.; MALAFRONTI, N.; LAURO, G.; BIFULCO, G.; BELISARIO, M.A.; DE TOMMASI, N. Chemical proteomics reveals HSP70 1A as a target for the anticancer diterpene oridonin in Jurkat cells. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 14–26, 2013.

PIAZ, F.D.; NIGRO, P.; BRACA, A.; TOMMASI, N.D.; BELISARIO, M.A. 13-Hydroxy-15-oxo-zoapatlin, an ent-kaurane diterpene, induces apoptosis in human leukemia cells, affecting thiol-mediated redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 1409–1422, 2007.

PICCININI, F. Effect of some natural and synthetic isoprenoids on the metabolism of lipids: studies in vitro and in vivo. **Archivio Italiano di Scienze Farmacologiche**, v. 76, p. 111-117, 1962.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

POLAT, R.; CAKILCIOGLU, U.; KALTALIOĞLU, K.; ULUSAN, M.D.; TÜRKMEN, Z. An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 1-11, 2015.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-PHY isolated from *Ipomoea pescaprae*. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-PHY isolated from *Ipomoea pescaprae*. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial *ent*-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, v. 80, p. 432–436, 2009.

PRABAVATHY, R.V. Herbal Preparation for Stimulation of Hair Growth, Control of Hair Fall, Dandruff and Infections Thereof Using *Ageratum* spp., WO2014027370, 2014.

PRICE, A.J.; ALLEN, N.E.; APPLEBY, P.N.; CROWE, F.L.; JENAB, M.; RINALDI, S.; SLIMANI, N.; KAKS, R.; ROHRMANN, S.; BOEING, H.; PISCHON, T.; BENETOU, V.; NASKA, A.; TRICHOPOULOU, A.; PALLI, D.; SIERI, S.; TUMINO, R.; VINEIS, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; DONATE, I.; GONZ_ALEZ, C.A.; S_ANCHEZ, M.J.; CHIRLAQUE, M.D.; ARDANAZ, E.; LARRA-NAGA, N.; KHAW, K.T.; RODWELL, S.; GALLO, V.; MICHAUD, D.S.; RIBOLI, E.; KEY, T.J. Plasma phytanic acid

concentration and risk of prostate cancer: results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, p. 1769-1776, 2010.

PRIETO, A.M.; SANTOS, A.G.; OLIVEIRA, A.P.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; VARANDA, E.A.; SOARES, C.P. 2013. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemistry Toxicology**, v. 53, p. 153–159, 2013.

RAHMANIAN, N.; JAFARI, S.M.; GALANAKIS, C.M. Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 1-18, 2014.

RAHMANIAN, N.; JAFARI, S.M.; WANI, T.A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, p. 150-172, 2015.

RAHN-CHIQUÉ, K.; PUERTAS, A.M.; ROMERO-CANO, M.S.; ROJAS C.; URBINA-VILLALBA, G. Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 178, p. 1-20, 2012.

RAO J., MCCLEMENTS, D.J. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7059-7066, 2010.

RAPOPORT, N.; NAM, K.-H.; GUPTA, R.; GAO, Z.; MOHAN, P.; PAYNE, A.; TODD, N.; LIU, X.; KIM T.; SHEA, J.; SCAIFE, C.; PARKER, D.L.; JEONG, E.K.; KENNEDY, A.M. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 4-15, 2011.

RASAMISON, V.E.; RANAIVO-HARIMANANA, L.; CAO, S.; PAN, E.; RATOVOSON, F.; RANDRIANTAFIKA, F.; RAKOTONDRAJONA, R.; RAKOTONANDRASANA, S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; KINGSTON, D.G. A new labdane diterpene from *Vitex cauliflora* Moldenke from the Madagascar rainforest. **Fitoterapia**, v. 81, p. 55–58, 2010.

RASIKARI, H.L.; LEACH, D.N.; WATERMAN, P.G.; SPOONER-HART, R.N.; BASTA, A.H.; BANBURY, L.K.; WINTER, K.M.; FORSTER, P.I. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Glossocarya calcicola*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2844–2850, 2005.

RATLEDGE, C.; WILKINSON, S.G. **Microbial Lipids**, Academic Press, London, p. 726, 1989.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, 250-264, 2014.

REDDY, P.P.; RAO, R.R.; REKHA, K.; SURESH BABU, K.; SHASHIDHAR, J.; SHASHIKIRAN, G.; VIJAYA LAKSHMI, V.; RAO, J.M.. Two new cytotoxic diterpenes from the rhizomes of *Hedychium spicatum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 192–195, 2009.

REINA, E.; PUENTES, C.; ROJAS, J.; GARCÍA, J.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; ARAGÓN, M.; OSPINA, L.F. FUSCOSIDE E: a strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 5888–5891, 2011.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.), **Acute Toxicity Study in Rats, Rabbits and Guinea Pigs**, RIFM Report Number 1695, July 05, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA, 1977.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.), **Acute Toxicity Studies on Phytol**. Unpublished Report from BASF, 20 July, Report Number 4455, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA, 1978.

RIM, K.-T.; KIM, S.-J. A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on in vivo Micronucleus Test for Allyl Chloride. **Safety Health Work**, v. 6, p. 184-191, 2015.

ROBY, M.H.H.; SARHANA, M.A.; SELIMA, K.A.H.; KHALELA, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827–831, 2013.

RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.

SÁ, N.C.; CAVALCANTE, T.T.A.; ARAÚJO, A.X.; DOS SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.; BANDEIRA, P.N.; DA CUNHA, R.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 550-555, 2012.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J. K.; CHANOTIYA, C. S.; SHANKER, K.; NEGI, A. S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.

SALAE, A.W.; RODJUN, A.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; CHANTRAPROMMA, S.; KANJANA-OPAS, K.; TEWTRAKUL, S.; FUN, H.K. Potential anti-inflammatory diterpenes from *Premna obtusifolia*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 819–829, 2012.

SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.Y.; DASHWOOD, R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. **Mutation Research**, v. 495, p. 61-74, 2001.

SANTOS, C.C.M.P.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Hindawi Publishing Corp.: Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; FERREIRA DE OLIVEIRA, J.M.P. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 216, 2015.

SCHAALAN, M.; EL-ABHAR, H.S.; BARAKAT, M.; EL-DENSHARY, E.S. Westernizedlike-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. **Journal of Diabetes**, v. 27, p. 486-488, 2009.

SCHÖNFELD, P.; KAHLERT, S.; REISER, G. In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 121-128, 2004.

SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Comment concerning the article: 'Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action' by Komen et al.: branched chain phytanic acid inhibits the activity of the mitochondrial respiratory chain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2266-2269, 2008.

SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 7136-7142, 2006.

SCHOUTEN, S.; OZDIREKCAN, S.; VAN DER MEER, M.T.J.; BLOKKER, P.; BAAS, M.; HAYES, J.M.; DAMSTE, J.S.S. Evidence for substantial intramolecular heterogeneity in the stable carbon isotopic composition of phytol in photoautotrophic organisms. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 135-146, 2008.

- SCHRAMM, A.; EBRAHIMI, S.N.; RAITH, M.; ZAUGG, J.; RUEDA, D.C.; HERING, S.; HAMBURGER, M. Phytochemical profiling of *Curcuma kwangsiensis* rhizome extract, and identification of labdane diterpenoids as positive GABA_A receptor modulators. **Phytochemistry**, v. 96, p. 318–329, 2012.
- SCOTT, D.; EVANS, H.J. X-ray-induced chromosomal aberrations in vicia faba: changes in response during the cell cycle. **Mutation Research**, v. 4, 579-599, 1967.
- SHAREEF, M.Z.; YELLU, N.R.; ACHANTA, V.N.A.R. Neuropharmacological screening of essential oil from oleo gum resin of *Gardenia lucida* Roxb. **Industrial Crops and Products**, v. 62, 250-264, 2014.
- SHEN, Y.C.; LIN, Y.S.; CHENG, Y.B.; CHENG, K.C.; KHALIL, A.T.; KUO, Y.H.; CHIENC, C.T.; LIN, Y.C. Novel taxane diterpenes from *Taxus sumatrana* with the first C-21 taxane ester. **Tetrahedron**, v.61, p. 1345–1352, 2005.
- SIJOON, L.; JEONG-SOO, K.I.M.; YOUNG-SEEK, Y.; MYUNG-JUN, K.I.M.; JUN-TAE, C.; BYONG-SUNG, K. **Method for preparing DL-alpha-tocopherol with a high yield and high purity**. US6441200, 2002.
- SILVA, R.M.; OLIVEIRA, F.A.; CUNHA, K.M.A.; MAIA, J.L.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; NASCIMENTO, N.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Cardiovascular effects of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p. 11–18, 2005.
- SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.; DAMASCENO, S.R.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R.; SOUSA, D.P.; ARAGÃO, K.S.; BARBOSA, A.L.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, 455-464, 2014.
- SIMPSON, E.R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W.C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase—a brief overview. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 93-127, 2002.
- SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G.J.S.; GRIFFITHS, S.M.; WILLIAMS, P.M.; MAFFEIS, T.G.G.; WRIGHT, C.J.; DOAK, S.H. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 3891-3914, 2009.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SIRIDECHAKORN, I.; CHEENPRACHA, S.; RITTHIWIGROM, T.; DEACHATHAI, S.; PHAKHODEE, W.; MACHAN, T.; RUANKEAW, N.; LAPHOOKHIEO, S. 2014. Isopimarane diterpenes and flavan derivatives from the twigs of *Caesalpinia furfuracea*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 186–189, 2014.
- SIVASOTHY, Y.; IBRAHIM, H.; PALIANY, A.S.; ALIAS, S.A.; AWANG, K. 2013. Pahangensin A and B, two new antibacterial diterpenes from the rhizomes of *Alpinia pahangensis* Ridley. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 6280–6285, 2013.
- SKJELDAL, O.H.; STOKKE, O.; REFSUM, S.; NORSETH, J.; PETIT, H. Clinical and biochemical heterogeneity in conditions with phytanic acid accumulation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 77, p. 87-96, 1987.
- SKONECZNA, A.; KANIAK, A.; SKONECZNY M. Genetic instability in budding and fission yeast—sources and mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, p. 917-967, 2015.
- SMITH, E.C.J.; WAREHAM, N.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. 2008. 2β-Acetoxyferruginol—a new antibacterial abietane diterpene from the bark of *Prumnopitys andina*. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 49–53, 2008.

SON, K.H.; OH, H.M.; CHOI, S.K.; HAN, D.C.; KWON, B.M. 2005. Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2019–2021, 2005.

SONG, X.; ZHAO, Y.; HOU, S.; XU, F.; ZHAO, R.; HE, J.; CAI, Z.; LI, Y.; CHEN, Q. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 445-453, 2008.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SPIEGELMAN, B.M. PPAR-c: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, p. 507-514, 1988.

STARKS, C.M.; WILLIAMS, R.B.; GOERING, M.G.; O'NEIL-JOHNSON, M.; NORMAN, V.L.; HU, J.F.; GARO, E.; HOUGH, G.W.; RICE, S.M.; ELDRIDGE, G.R. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). **Phytochemistry**, v. 71, p. 104-109, 2010.

STARKS, C.M.; WILLIAMS, R.B.; GOERING, M.G.; O'NEIL-JOHNSON, M.; NORMAN, V.L.; HU, J.F.; GARO, E.; HOUGH, G.W.; RICE, S.M.; ELDRIDGE, G.R. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). **Phytochemistry**, v. 71, p. 104–109, 2010. STOKKE, O.; SKJELDAL, O.H.; HØIE, K. Disorders related to the metabolism of phytanic acid. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation: Supplementum**, v. 184, p. 3-10, 1986.

SUN, M.; GAO, Y.; GUO, C.; CAO, F.; SONG, Z.; XI, Y.; YU, A.; LI, A.; ZHAI, G. Enhancement of transport of curcumin to brain in mice by poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticle. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 3111-3122, 2010.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; KIM, C.S.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; YAMAMOTO, T.; JISAKA, M.; NISHIMURA, K.; YOKOTA, K.; YU, R.; FUSHIKI, T. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-c (PPARc) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. **FEBS Letters**, v. 550, p. 190-194, 2003.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; YAMAMOTO, T.; TAIMATSU, A.; MATSUI, N.; KIMURA, K.; SAITO, M.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; FUSHIKI, T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **FEBS Letters**, v. 514, p. 315-322, 2002a.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; YAMAMOTO, T.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; AOKI, N.; KAWASAKI, H.; TAIRA, K.; YOKOYAMA, K.K.; KAMEI, Y.; FUSHIKI, T. Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor c. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16906-16912, 2002b.

TAKEI, M.; UMEYAMA, A.; ARIHARA, S. Diterpenes inhibit IL-12 production by DC and enhance Th2 cells polarization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 603–610, 2007.

TAKEI, M.; UMEYAMA, A.; SHOJI, N.; HASHIMOTO, T. Diterpenes drive Th1 polarization depending on IL-12. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1602–1608, 2008.

TANABE, H.; YASUI, T.; KOTANI, H.; NAGATSU, A.; MAKISHIMA, M.; AMAGAYA, S.; INOUE, M. Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3204–3212, 2014.

TANG, W.; WEI, X.; XU, H.; ZENG, D.; LONG, L. 13-Deoxyitol A, a new insecticidal isoryanodane diterpene from the seeds of *Itoa orientalis*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 286–289, 2009.

TANG, X.H.; SUH, M.J.; LI, R.; GUDAS, L.J. Cell proliferation inhibition and alterations in retinol esterification induced by phytanic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 165-176, 2007.

TAPIA-HERNÁNDEZ, J.A.; TORRES-CHAVEZ, P.I.; RAMIREZ-WONG, B.; RASCON-CHU, A.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; BARRERAS-URBINA, C.G.; RANGEL-VÁZQUEZ, N.A.; RODRÍGUEZ-FELIX, F. Micro- and Nano-Particles by Electrospray: Advances and Applications in Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4699-4707, 2015.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; BATISTA, I.; SERRANO, C.; MATOS, O.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.F.; SARAIVA, J.A.; NUNES, M.L. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 81-87, 2012.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.; SARAIVA, J.A.; NUNES, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

TEN BRINK, H.J.; WANDERS, R.J.; STELLAARD, F.; SCHUTGENS, R.B.; JAKOBS, C. Pristanic acid and phytanic acid in plasma from patients with a single peroxisomal enzyme deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 14, p. 345-348, 1991.

THORNBURG, T.; TURNER, A.R.; CHEN, Y.Q.; VITOLINS, M.; CHANG, B.; XU, J. Phytanic acid, AMACR and prostate cancer risk. **Future Oncology**, v. 2, p. 213-223, 2006.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for In vitro and In vivo genotoxicity testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRACY, N.I.; CRUNKLETON, D.W.; PRICE, G.L. Gasoline production from phytol. **Fuel**, v. 89, p. 3493-3497, 2010.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

UPADHYAY, H.C.; DWIVEDI, G.R.; ROY, S.; SHARMA, A.; DAROKAR, M.P.; SRIVASTAVA, S.K. Phytol derivatives as drug resistance reversal agents. **ChemMedChem**, v. 9, p. 1860-1868, 2014.

VAN DEN BRINK, D.M.; VAN MIERT, J.N.; DACREMONT, G.; RONTANI, J.F.; JANSEN, G.A.; WANDERS, R.J. Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, p. 33-37, 2004.

VAN DEN BRINK, D.M.; VAN MIERT, J.N.; DACREMONT, G.; RONTANI, J.F.; WANDERS, R.J. Characterization of the final step in the conversion of phytol into phytanic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, 26838-26844, 2005.

VAN DEN BRINK, D.M.; WANDERS, R.J. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1752-1765, 2006.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **Biopacts**, v. 1, p. 87-97, 2011.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; SANTOS, H.S.; Rodrigues, A.S.; Bandeira, P.N.; Albuquerque, M.R.J.M.; Cavada, B.S.; Teixeira, E.H.; Henriques, M.; Pereira, M.O. Effect of a casbane diterpene

isolated from *Croton nepetaefolius* on the prevention and control of biofilms formed by bacteria and *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 499–509, 2014.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; BUTTAFAVA, A.; CARBONERA, D.; BALESTRAZZI, A. (2013). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, p. 1-9, 2013.

VLACHOJANNIS, C.; CHRUBASIK-HAUSMANN, S.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine®, Its Components, and of Mixtures Thereof. **Phytotherapy Research**, v. 29, p.1590-1594, 2015.

WALSH, P.C. Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. **Journal of Urology**, v. 174, p. 1824, 2004.

WANDERS, R.J.; KOMEN, J.; FERDINANDUSSE, S. Phytanic acid metabolism in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1811, p. 498-507, 2011.

WANDERS, R.J.; KOMEN, J.C. Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 865-869, 2007.

WANDERS, R.J.A.; SMIT, W.; HEYMANS, H.S.A.; SCHUTGENS, R.B.H.; BARTH, P.G.; SCHIERBEEK, H.; SMIT, G.P.A.; BERGER, R.; PRZYREMBEL, H.; EGGELTE, T.A.; TAGER, J.M.; MAASWINKEL-MOOY, P.D.; PETERS, A.C.B.; MONNENS, L.A.H.; BAKKEREN, J.A.J.M.; TRIJBELS, J.M.F.; LOMMEN, E.J.P.; BEGANOVIC, N. Age-related accumulation of phytanic acid in plasma from patients with the cerebrahepato-renal (Zellweger) syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 166, p. 45-56, 1987.

WANG, G.C.; WANG, Y.; WILLIAMS, I.D.; SUNG, H.H.S.; ZHANG, X.Q.; ZHANG, D.M.; JIANG, R.W.; YAO, X.S.; YE, W.C. Andrographolactone, a unique diterpene from *Andrographis paniculata*. **Tetrahedron Letters**, v.50, p. 4824–4826, 2009.

WANG, J.P.; XU, H.X.; WU, Y.X.; YE, Y.J.; RUAN, J.L.; XIONG, C.M.; CAI, Y.L. Ent-16 β ,17-dihydroxy-kauran-19-oic acid, a kaurane diterpene acid from *Siegesbeckia pubescens*, presents antiplatelet and antithrombotic effects in rats. **Phytomedicine**, v.18, p. 873–878, 2011.

WANG, Q.; RONG, Z.; TENG, J.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H.Q. Two new antitumor diterpenes from *Pinus sylvestris*. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, p. 187–189, 2008.

WANG, S.; YOON, Y.C.; SUNG, M.J.; HUR, H.J.; PARK, J.H. 2012. Antiangiogenic properties of cafestol, a coffee diterpene, in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, p. 567–571, 2012.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; 2011. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 393–401, 2011.

WATKINS, P.A.; MOSER, A.B.; TOOMER, C.B.; STEINBERG, S.J.; MOSER, H.W.; KARAMAN, M.W.; RAMASWAMY, K.; SIEGMUND, K.D.; LEE, D.R.; ELY, J.J.; RYDER, O.A.; HACIA, J.G. Identification of differences in human and great ape phytanic acid metabolism that could influence gene expression profiles and physiological functions. **BMC Physiology**, v. 10, p. 19, 2010.

WERNER, L.B.; HELLGREN, L.I.; RAFF, M.; JENSEN, S.K.; PETERSEN, R.A.; DRACHMANN, T.; THOLSTRUP, T. Effect of dairy fat on plasma phytanic acid in healthy volunteers - a randomized controlled study. **Lipids in Health and Diseases**, v. 10 p. 95, 2011.

WIERZBICKI, A.S.; MAYNE, P.D.; LLOYD, M.D.; BURSTON, D.; MEI, G.; SIDEY, M.C.; FEHER, M.D.; GIBBERD, F.B. Metabolism of phytanic acid and 3-methyl-adipic acid excretion in patients with adult Refsum disease. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1481-1488, 2003.

- WIERZBICKI, A.S. Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 881-886, 2007.
- WILLEMSEN, M.A.; VAN DER GRAAF, M.; VAN DER KNAAP, M.S.; HEERSCHAP, A.; VAN DOMBURG, P.H.; GABREELS, F.J.; ROTTEVEEL, J.J. MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *American Journal of Neuroradiology*, v. 25, 649-657, p. 2004.
- WISE, G.A.; DUFFY, B.J.; MITCHELL, J.D.; POLLARD, A.C.; POULOS, A.; POLLARD, J. Phytanic acid oxidase deficiency in childhood. *Clinical and Experimental Neuropsychology*, v. 21, p. 289-299, 1985.
- WRIGHT, M.E.; ALBANES, D.; MOSER, A.B.; WEINSTEIN, S.J.; SNYDER, K.; MÄNNISTÖ, S.; GANN, P.H. Serum phytanic and pristanic acid levels and prostate cancer risk in Finnish smokers. *Cancer Medicine*, v. 3, p. 1562-1569, 2014.
- WRIGHT, M.E.; BOWEN, P.; VIRTAMO, J.; ALBANES, D.; GANN, P.H. Estimated phytanic acid intake and prostate cancer risk: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, v. 131, p. 1396-1406, 2012.
- WU, H.F.; ZHANG, X.P.; WANG, Y.; MA, G.X.; TIAN, Y.; WU, L.Z.; CHEN, S.L.; YANG, J.S.; XU, X.D. Four new diterpenes from *Aphanamixis polystachya*. *Fitoterapia*, v. 90, p. 126-131, 2013.
- WU, X.J.; STAHL, T.; HU, Y.; KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 608-613, 2006.
- XIAO, X.H.; YUAN, Z.Q.; LI, G.K. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation Purification Technology*, v. 104, p. 284-289, 2013.
- XIONG, Y.; WANG, K.; PAN, Y.; SUN, H.; TU, J. Isolation, synthesis, and anti-tumor activities of a novel class of podocarpic diterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, p. 786-789, 2006.
- XU, J.; JIN, D.Q.; GUO, Y.; XIE, C.; MA, Y.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. New myrsinol diterpenes from *Euphorbia prolifera* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. *Bioorganic & Medicine Chemistry Letters*, v. 22, p. 3612-3618, 2012.
- XU, J.; LIU, C.; GUO, P.; GUO, Y.; JIN DQ, SONG X, SUN Z, GUI L, MA Y. 2011. Neuroprotective labdane diterpenes from *Fritillaria ebeiensis*. *Fitoterapia*, v. 82, p. 772-776, 2011.
- YAMAMOTO, S.; ONOZU, H.; YAMADA, N.; HAYASAKA, S.; WATANABE, A. Mild retinal changes in a 47-year-old patient with phytanic acid storage disease. *Ophthalmology*, v. 209, p. 251-255, 1995.
- YANG, N.Y.; TAO, W.W.; ZHU, M.; DUAN, J.A.; JIANG, J.G. Two new isopimarane diterpenes from the feces of *Trogopterus xanthipes*. *Fitoterapia*, v. 81, p. 381-384, 2010.
- YILDIZ, M.; CIG̃ERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, v. 75, p. 934-938, 2009.
- YOON, H.S.; MOON, S.C.; KIM, N.D.; PARK, B.S.; JEONG, M.H.; YOO, Y.H. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 151-156, 2000.
- YOUNG, S.P.; JOHNSON, A.W.; MULLER, D.P. Effects of phytanic acid on the vitamin E status, lipid composition and physical properties of retinal cell membranes: implications for adult Refsum disease. *Clinical Science*, v. 101, p. 697-705, 2001.

- YU, L.-G.; NI, T.-F.; GAO, W.; WANG, Y.Y.; CUI, H.W.; YANG, C.G.; QIU, W.W. The synthesis and antibacterial activity of pyrazole-fused tricyclic diterpene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 10-20, 2015.
- YUAN, Y.; GAO, Y.; MAO, L.; ZHAO, J. Optimisation of conditions for the preparation of [beta]-carotene nanoemulsions using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1300-1306, 2008.
- ZHAN, X.; BACH, S.S.; HANSEN, N.L.; LUNDE, C.; SIMONSEN, H.T. Additional diterpenes from *Physcomitrella patens* synthesized by copalyl diphosphate/kaurene synthase (*PpCPS/KS*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 110–114, 2015.
- ZHANG, G.I.; LI, Y.H.; JIANG, J.D.; YU, S.S.; WANG, X.J.; ZHUANG, P.Y.; ZHANG, Y.; QU, J.; MA, S.G.; LI, Y.; LIU, Y.B.; YU, D.Q. Diterpenes and sesquiterpenes with anti-Coxsackie virus B3 activity from the stems of *Illicium jiadifengpi*. **Tetrahedron**, v.70, p. 4494–4499, 2014
- ZHANG, G.J.; LI, Y.H.; JIANG, J.D.; YU, S.S.; QU, J.; MA, S.G.; LIU, Y.B.; YU, D.Q. Anti-Coxsackie virus B diterpenes from the roots of *Illicium jiadifengpi*. **Tetrahedron**, v. 69, p.1017–1023, 2013
- ZHANG, S.; LI, X.; ZHANG, F.; YANG, P.; GAO, X.; SONG, Q. Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure–activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3888–3895, 2006.
- ZHENG, C.J.; HUANG, B.H.; WANG, Y.; YE, Q.; HAN, T.; ZHANG, Q.Y.; ZHANG, H.; QIN, L.P. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 18, 175–181, 2010.
- ZIAEE, M.; KHORRAMI, A.; EBRAHIMI, M.; NOURAFKAN, H.; AMIRASLANZADEH, M.; RAMESHRAD, M.; GARJANI, M.; GARJANI, A. Cardioprotective Effects of Essential Oil of *Lavandula angustifolia* on Isoproterenol-induced Acute Myocardial Infarction in Rat. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 279-289, 2015.

PHYTOTHERAPY RESEARCH
Phytother. Res. 30: 1420–1444 (2016)
Published online 16 June 2016 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.5652

REVIEW

Therapeutic Potential of Essential Oils Focusing on Diterpenes

Md. Torequul Islam,^{1,2,3*} Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata,² Raí Pablo Sousa de Aguiar,² Marcia Fernanda Correia Jardim Paz,^{1,2} Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar,^{1,2} Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{1,2,4} and Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina 64.049-550, Brazil

²Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, Teresina 64.049-550, Brazil

³Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, 22-Shahid Mirza Lane (E), Academic Building-II, 1st floor, 739/A, Mehedibag Road, Mehedibag-4000, Chittagong, Bangladesh

⁴Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina 64.049-550, Brazil

Among all plant derivatives, essential oils (EOs) have gained the attention of many scientists. Diterpenes, a family of components present in some EO, are becoming a milestone in the EOs world. The goal of this review is to describe a scenario of diterpenes taking into health-consumption department. Previous studies revealed that diterpenes have antioxidant, antimicrobial, antiviral, antiprotozoal, cytotoxic, anticancer, antigenotoxic, antimutagenic, chemopreventive, antiinflammatory, antinociceptive, immunostimulatory, organoprotective, antidiabetic, lipid-lowering, antiallergic, antiplatelet, antithrombotic, and antitoxin activities. In conclusion, diterpenes may be an immense featuring concern in pharmaceutical consumption from a drug discovery point of view. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: diterpenes; essential oils; drug source; plant-derived; phytotherapy.

Abbreviations: AKT, protein kinase B (PKB); CAT, catalase; CCl₄, carbon tetra chloride; CHF, congestive heart failure; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; CuZn-SOD, copper-zinc-superoxide dismutase; DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl; EO, essential oil; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GABA_A, gamma amino butyric acid-A; FAK, focal adhesion kinase; GIRK, G protein-activated inwardly rectifying potassium; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione-S-transferase; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HSCs, stimulated hepatic stellate cells; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; IFN- γ , interferon-gamma; IKK, I κ B kinase; iNOS, induced nitric oxide synthetase; i.g., intragastric; IL, interleukin; i.p., intraperitoneal; i.v., intravascular; LPO, lipid peroxidase; LPS, lipopolysaccharides; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; MDA, malonylaldehyde; MDR, multi-drug resistant; Mn-SOD, manganese-superoxide dismutase; MPO, malonyl peroxidase; mRNA, micro-ribonucleic acid; NF- κ B, nuclear factor-kappa-B; NGF, nerve growth factor; NOS, nitric oxide synthetase; Nr2f, nuclear factor-2; PGDs, prostaglandins; PGE, prostaglandin E; p.o., per oral; ROS/NOS, reactive oxygen/nitrogen species; TGF- β , tumor growth factor- β ; TMV, tobacco mosaic virus; TNF α , tumor necrosis factor-alpha; UV, ultraviolet.

INTRODUCTION

Natural products obtained from minerals, plants, and animals serve as major sources of new drugs and will continue to play an important role in the years to come because of their 'drug-like' properties. These products are also the basis for drugs and treatments (De Pasquale, 1984). Generally, plants are used in food, medicine, rituals, building, household implements, musical instruments, firewood, pesticides, clothing, shelter, etc. (Polat *et al.*, 2015). A plant containing medicinal component(s) is a medicinal plant. Based on this definition, every plant may be considered as a medicinal plant as they contain thousands of important moieties.

The World Health Organization reported that about 25% of modern medicines is developed from plant

sources traditionally been used, thus leading to the study and discovery of 75% of current herbal drugs. The World Health Organization (2002) reported over 21 000 medicinally used plant species throughout the world. Since the drugs isolated from medicinal plants generate significant income globally, their popularity has grown. In addition to being used directly as healing agents, the bioactive compounds derived from medicinal plants serve as lead compounds for the development of potential drugs used to treat various human diseases (Mall *et al.*, 2015).

Every plant contains thousands of chemical components. In this context, both beneficiary and harmful events are concerned to the herbal medicines. Notably, a number of toxic herbs have been identified by these days. There is no doubt that using of patterns, doses and patients' pathophysiology are the key considerations of herbal medicines (Izzo *et al.*, 2016). However, currently, many important chemical moieties of plant origin are being successfully used in different sectors, including health foods and cosmetics. Essential oils (EOs) are secondary metabolites found in plants. They

* Correspondence to: Md. Torequul Islam, Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.
E-mail: rbioutufpi.br@gmail.com



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Mini-review

Phytol in a pharma-medico-stance



Md. Torequul Islam^{a, b, *}, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^a,
Katia da Conceição Machado^a, Keylla da Conceição Machado^a,
Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^a, Damiao Pergentino de Sousa^c,
Rivelilson Mendes de Freitas^a

^a Department of Biochemistry and Pharmacology, Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil

^b Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, 22-Shahid Mirza Lane (E), Academic Building-II, 739/A, Mehedibag Road, Mehedibag, 4000 Chittagong, Bangladesh

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, CEP 58.051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form

1 July 2015

Accepted 24 July 2015

Available online 19 August 2015

Keywords:

Biomarker

Drug

Databases

Diterpenoid

Phytol

Pharmaceutical

ABSTRACT

This study aims to review phytol (PYT), through published articles, periodicals, magazines and patents, which were retrieved from the PM, SD, WS, SP; DII, WIPO, CIPO, USPTO and INPI databases. Among the 149 articles and 62 patents, 27.52% articles and 87.09% patents were found on the searched topic, PYT and its sources and synthesis and metabolism; then followed by 15.44% and 14.77% articles on PYT in cytotoxicity/cancer/mutagenicity/teratogenicity and PYT in neurological diseases, respectively. In the pharma-medico viewpoint, PYT and its derivatives have been evident to have antimicrobial, cytotoxic, antitumor, antimutagenic, anti-teratogenic, antibiotic-chemotherapeutic, antidiabetic, lipid lowering, antispasmodic, anticonvulsant, antinociceptive, antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic, antidepressant, immunoadjuvancy, hair growth facilitator, hair fall defense and antidandruff activities. Otherwise, the important biometabolite of PYT is phytanic acid (PA). Evidence shows PA to have cytotoxic, anticancer, antidiabetic, lipid lowering and antiteratogenic activities. In addition, it may be considered as an important biomarker for some diseases such as Refsum's Disease (RD), Sjögren Larsson syndrome (SLS), rhizomelic chondrodysplasia punctata (RZCP), chronic polyneuropathy (CP), Zellweger's disease hyperpepicolic academia (ZDHA) and related diseases. Thus, phytol may be considered as a new drug candidate.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

List of abbreviations: ALDH3A2, fatty aldehyde dehydrogenase; AMP, adenosine mono-phosphate; ASTM, American Society for Testing and Materials; ATP, adenosine triphosphate; cc, cubic centimeters; CoA, co-enzyme-A; °C, degree Celsius; DMF, Vilsmeier's reagent component; FALDH, fatty aldehyde dehydrogenase; kg, kilogram; g, gram; GABA, gamma amino butyric acid; IC₅₀, half minimal inhibitory concentration; IDDM, insulin dependent diabetes mellitus; i.p., intra-peritoneal; LD₅₀, median lethal dose; l, liter; MEP, 2-C-methylerythritol-4-phosphate; mg, milligram; µg, micro-gram; MIC, minimum inhibitory concentration; mL, milliliter; µ-mole, micro-mole; MVA, mevalonic acid; NAD⁺, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NADP⁺, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH, reduced nicotinamide adenine di-nucleotide phosphate; p.o., per oral; RBC, red blood corpuscles; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; Sfr1652, isogenic *Synechocystis* sp.; TPP, tyrosine pyro-phosphate; P_i, inorganic phosphate; CNS, central nervous system; CP, chronic polyneuropathy; CVS, cardio-vascular system; IRD, infantile Refsum's disease; LD, Leber disease; NALD, neonatal adrenoleucodystrophy; PYT, phytol; PA, phytanic acid; RD, Refsum's disease; RXR, retinoid X receptor; SLS, Sjögren Larsson syndrome; RZCP, rhizomelic chondrodysplasia punctata; ZDHA, Zellweger's disease hyperpepicolic academia; LD₅₀, median lethal dose; MEP, 2-C-methylerythritol-4-phosphate; MTT, cellular metabolic activity assay by colorimetric means using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; MVA, mevalonic acid; PPARs, peroxisome proliferator activated receptors; PM, PubMed; SD, Science Direct; WS, Web of Science; SP, Scopus; DII, Derwent Innovations Index[®]; WIPO, World Intellectual Properties Organization; CIPO, Canadian Intellectual Properties Organization; EPO, European patents office; USPTO, United States Intellectual Properties Organization; INPI, Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

* Corresponding author. Department of Biochemistry and Pharmacology, Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil.

E-mail address: rbiotufpi.br@gmail.com (Md.T. Islam).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.07.010>

0009-2797/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE C – Artigo submetido ao periódico *Chemosphere*

Chemosphere
Elsevier Editorial System(tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of phytol and its nanoemulsion

Article Type: Research paper

Section/Category: Toxicology and Risk Assessment

Keywords: phytol; nanoemulsion; genotoxicity; DNA repair.

Corresponding Author: Mr. Md. Torequl Torequl Islam, M. Pharm.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Md. Torequl Torequl Islam, M. Pharm.

Order of Authors: Md. Torequl Torequl Islam, M. Pharm.; Leticia Streck; Marcus Alencer; Samara Silva; Ana Mata; Arnobio Silva-Junior; Ana Amélia Melo-Cavalcante

Suggested Reviewers: Jand Medeiros
Immunologia, Universidade Federal do Parnaíba Parnaíba, Brazil
jandvenes@ufpi.edu.br

Fransisco Lima
Bioinformatics, Universidade Federal do Piauí, Brazil
fdcalima@gmail.com

Janet Chekalarova
Department of Physiology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria
janetchekalarova@gmail.com

Joaquin Jordan
Departamento Ciencias Médicas - Farmacología, Universidad de Castilla-La Mancha, Spain.
joaquin.jordan@uclm.es

João Laranjinha
Centro de Neurociencias e Biologia de Cellular, Universidade de Coimbra, Portugal.
laranjin@ci.uc.pt

José Pelaez
Departamento de Fisicoquímica, Universidad Nacional de Córdoba Córdoba, Argentina.
walwalwal32@hotmail.com

A Possible Phytol-cytoprotective Trait through Reactive Species-Induced Oxidative Stress Ebbing Pathway

ORIGINAL

Md. Torequul Islam^{1,2,3,4}, José Victor de Oliveira Santos², José Roberto de Oliveira Ferreira³, João Marcelo de Castro e Sousa⁵, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz², Ricardo Melo de Carvalho², Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata², Leonardo da Rocha Sousa², Rosália Maria Tôres de Lima^{1,2}, Milena Braga Soares da Silva², Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar^{1,2}, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{1,3,6}, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas⁷, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

Abstract

This study aims at investigating a possible pathway of cytotoxicological status of the diterpenoid essential oil, phytol (PYL). For this brine shrimp lethality bioassay (BSLB) and hemolysis (HL) test systems were selected. In the BSLB, PYL either alone or co-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium di-chromate ($K_2Cr_2O_7$; KD), copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$; CS) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, TRO) as membrane lyser, strong oxidizer, oxidizer-cytogenotoxicant and antioxidative-cell-protector, respectively. The HL was carried out in rat erythrocytes (RBCs) taking TRO as a standard. In addition, to view a time-dependent cytotoxic activity of PYL, the mortality of the shrimps was counted at 24 and 48 h. Results suggest PYL is non-cytotoxic at low (40-160 μM) but toxic at high concentration (2-8 mM) to the shrimps and RBCs. An increased cytotoxicity was observed for 24 h to 48 h in brine shrimps. In both cases groups co-treated with cytotoxicants/protector suggest that PYL is cytoprotective in the presence of oxidizer. The cytoprotectivity of PYL may be connected to its antioxidant potential and cytotoxicity for antioxidant-mediated pro-oxidative effects. In conclusion, PYL is cytoprotective at low concentration but toxic at high, activities found, however, may be linked to the radical scavenging pathway.

Introduction

Phytol (3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol, PYL) is the diterpenoid with evident antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and weak mutagenic effects [1]. A substance with such type of activities may

- 1 Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí,*.
- 2 Laboratory of Genetical Toxicology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí,*.
- 3 Laboratory of Experimental Cancerology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí,*.
- 4 Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehedibag (Chittagong)-4000, Bangladesh.
- 5 Department of Biological Sciences, Federal University of Piauí, Picos, 64.049-550, Brazil.
- 6 Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí,*.
- 7 Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Federal University of Piauí,*.

*: Teresina (Piauí)-64.049-550, Brazil.

Contact information:

Md. Torequul Islam.

✉ rbiotufpi.br@gmail.com.

Keywords

Brine Shrimp; Cytoprotective; Oxidative Stress; Phytol; Toxicity

Preparation of Phytol-Loaded Nanoemulsion and Screening for Antioxidant Capacity

ORIGINAL

Md. Torequul Islam^{1,2,3}, Leticia Streck⁴,
Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{1,2},
João Marcelo de Castro e Sousa⁵,
Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{1,2},
Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata^{1,2}, Ricardo Melo de Carvalho¹,
Jose Victor de Oliveira Santos¹, Arnobio Antonio da Silva-Junior⁵,
Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{1,2,6},
Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

- 1 Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.
- 2 Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil.
- 3 Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, 22-Shahid Mirza Lane (E), Academic building-II, 1st floor, 739/A, Mehedibag Road, Mehedibag-4000, Chittagong, Bangladesh.
- 4 Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, 59012-570, Natal-RN, Brazil.
- 5 Department of Biological Sciences, Federal University of Piauí, 64.049-550, Picos, Brazil.
- 6 Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil.

Abstract

The study prepared a nanoemulsion with a diterpenoid isoprenoid alcohol called phytol (PYT) and subsequently tested it for antioxidant capacity. For this, PYT-loaded nanoemulsion was prepared by phase inversion method and both PYT-containing nanoemulsion (PNE) and PYT-free nanoemulsion (PFNE) (2-16 µM) were tested for antiradical activity (DPPH•: 1,1-diphenylpicrylhydrazyl radical; ABTS•+: azino-bis-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid; •OH: hydroxyl radical scavenging; NO•: nitrite oxide radical), lipid peroxidation (LP), reduction potential (RP), and inhibition of hemolysis (HL) in rat erythrocytes in comparison with an α-tocopherol analogue (Trolox - TRO - positive control). In addition, an in vivo test was performed with wildtype and deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains using hydrogen peroxide (H₂O₂) as a stressor. Results suggest that PNE exhibited higher antioxidant than the PFNE. Increasing doses revealed antioxidant capacity in a dose-dependent manner. In the *S. cerevisiae* study, both PFNE- and PNE-treated groups exhibited decreased rates of survival with the highest doses, whichever in the presence of stressor increased the survival rates, which indicates antioxidative defense capacity of PYT. In this occasion, PNE exhibited prominent antioxidative defense in the presence of stressor rather than PFNE. In conclusion, PYT exhibited potential antioxidant activity but at high concentration it was toxic to the yeast cells. The production of PYT-nanoemulsions may be relevant to the pharmaceutical sciences.

Contact information:

Md. Torequul Islam.

Address: Department of Biochemistry and Pharmacology, Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.

Tel: 0558681265804.

rbiotufpi@gmail.com

Keywords

Antioxidant; Radicals;
Nanoemulsion; Phytol;
Saccharomyces Cerevisiae.

APÊNDICE F – Outras publicações relacionadas ao tema da tese

PHYTOTHERAPY RESEARCH
Phytother. Res. 30: 915–928 (2016)
Published online 28 March 2016 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.5609

REVIEW

Diterpenes: Advances in Neurobiological Drug Research

Md. Torequl Islam,^{1,2,3*} Claucenira Bandeira da Silva,¹
Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar,^{1,2} Márcia Fernanda Correia Jardim Paz,^{1,2}
Fernanda Regina de Castro Almeida¹ and Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.

²Department of Biochemistry and Pharmacology, Post-graduation Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.

³Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, 22-Shahid Mirza Lane (E), Academic building-II, 1st floor, 739/A,

academicJournals

Vol. 10(48), pp. 1025-1033, 29 December, 2016

DOI: 10.5897/AJPP2015.4312

Article Number: 2A23B6462203

ISSN 1996-0816

Copyright © 2016

Author(s) retain the copyright of this article

<http://www.academicjournals.org/AJPP>

African Journal of Pharmacy and
Pharmacology

Review

Phytanic acid, a daily consumed chlorophyll-yielded phytol bio-metabolite: A comprehensive review

Md. Torequl Islam^{1,2,3*}, Eunus S. Ali⁴, Ricardo M. de Carvalho², Márcia F. C. J. Paz², Antonio L. Braga², Rosália M. T. de Lima², Leonardo da R. Sousa², Marcus V. O. B. de Alencar^{1,2}, Jose V. de Oliveira Santos² and Ana A. de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina (Piauí)-64.049-550, Brazil.

SHORT COMMUNICATION

Received on: 31-06-2016
Accepted on: 01-07-2016
Published on: 09-09-2016

Corresponding Author:

Md. Torequul Islam,
Postgraduate Program in
Biotechnology, Northeast
Biotechnology Network
(RENORBIO), Federal University
of Piauí, Teresina (Piauí)-64009-
550, Brazil.

**A Postulated Protocol by Using Brine Shrimp Lethality
Test System for Saying Possible Cytoprotective Trait
of a Substance**

Md. Torequul Islam^{1,2,3*}, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{3,4}

1-Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Chittagong (Mehedibag)-4000,
Bangladesh.

2-Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry, Federal University of Piauí, Teresina
(Piauí)-64009-550, Brazil.

3-Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Piauí, Teresina (Piauí)-64009-550,
Brazil.

4-Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO),
Federal University of Piauí, Teresina (Piauí)-64009-550, Brazil.

Abstract

The brine shrimp lethality bioassay (BSLB) has been proved to be a convenient system for monitoring cytotoxicity and antitumor activities of wide a variety of substances. From its establishment time, still now, BSLB is a popular method to confirm having cytotoxic potentials of a substance. This writing aims to say a possible



**PREPARATION OF PHYTOL-LOADED NANOEMULSION AND
SCREENING FOR ANTIOXIDANT CAPACITY: DATA-IN-BRIEF**

Md. Torequul Islam^{1,2,3*}, Leticia Streck⁴, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz², João
Marcelo de Castro e Sousa⁵, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{1,2}, Ana Maria
Oliveira Ferreira da Mata², Milena Braga Soares da Silva², Ricardo Melo de Carvalho²,
Jose Victor de Oliveira Santos², Antonio Luiz Gomes Júnior^{1,2}, Arnobio Antonio da
Silva-Junior⁴, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology,
Federal University of Piauí, Teresina (Piauí)- 64.049-550, Brazil.



**EVALUATION OF TOXIC, CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND
MUTAGENIC EFFECTS OF PHYTOL AND ITS NANOEMULSION:
DATA-IN-BRIEF**

Md. Torequl Islam^{1,2,3*}, Leticia Streck⁴, Samara Wanessa Cardoso Silva², Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{1,2}, Antonio Luiz Gomes Júnior^{1,2}, Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar^{1,2}, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata^{1,2}, Arnobio Antonio da Silva-Junior⁴, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas⁵, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology,



**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO FITOL E DE SUA INCORPORAÇÃO EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS**

Md. Torequl Islam, Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar, Leticia Streck, Samara Wanessa Cardoso Silva, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Ricardo Melo de Carvalho, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, Arnobio Antonio da Silva-Junior, Rivellilson Mendes de Freitas

Introdução: Produtos naturais são importantes como fontes para o desenvolvimento de novas drogas. O diterpeno fitol (FI), tem sido utilizado na formulação de cosméticos e medicamentos.

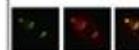
Em estudos de prospecção científica e tecnológica identificou-se diversas atividades

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission



Jéssica Pereira Costa^a, Guilherme Antônio L. de Oliveira^a,
 Antônia Amanda C. de Almeida^a, Md. Torequl Islam^{a,b},
 Damião Pergentino de Sousa^c, Rivelilson Mendes de Freitas^{a,*}

^aLaboratory of Research in Experimental Neurochemistry of Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science,

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 17, 1278-1284

1278

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of Antioxidant Activity of Phytol Using Non- and Pre-Clinical Models

Jéssica P. Costa¹, Md. T. Islam^{1,2,3*}, Pauline S. Santos^{1,4}, Paula B. Ferreira⁴, George L.S. Oliveira^{1,4}, Marcus V.O.B. Alencar^{2,4}, Marcia F.C.J. Paz², Éverton L.F. Ferreira⁵, Chistiane M. Feitosa⁴, Antonia M.G.L. Citó⁵, Damião P. Sousa⁶ and Ana Amelia C. Melo-Cavalcante^{2,4}

¹Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry, Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil; ²Laboratory of Genetics and Toxicology, Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil; ³Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehediabag (Chittagong)-4000, Bangladesh; ⁴Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil; ⁵Department of Chemistry, CCN, Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil; ⁶Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa (Paraíba)-

REVIEW

Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar,¹ João Marcelo de Castro e Sousa,^{2,3}
Hercília Maria Lins Rolim,^{3,4} Maria das Graças Freire de Medeiros,^{3,4}
Gilberto Santos Cerqueira,^{3,5} Fernanda Regina de Castro Almeida,^{1,6}
Antônia Maria das Graças Lopes Citó,^{3,7} Paulo Michel Pinheiro Ferreira,^{1,3,8}
José Arimatéia Dantas Lopes,⁷ Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,3} and
Md. Torequl Islam^{1,9*}

¹Postgraduate Program in Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

²Department of Biological Sciences, Federal University of Piauí, Picos, (Piauí), 64.607-670, Brazil

³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁴Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁵Postgraduate Program in Biotechnology, Biotechnology and Biodiversity Center for Research (BIOTEC), Federal University of Piauí (LAFEX), Parnaíba, Piauí 64.218-470, Brazil

⁶Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁷Department of Chemistry, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁸Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁹Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehedibag, Chittagong 400, Bangladesh

ANEXO A – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – 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: ceepi@ufpi.edu.br



Teresina, 13 de Março de 2015.

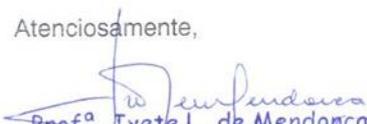
Ilmo.

Prof. Dr. RIVELILSON MENDES DE FREITAS.
Departamento: Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI.

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (13 de Março de 2015), 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 **004/15**, o projeto de pesquisa intitulado **"Bioprospecção do efeito modulador enzimático e avaliação da toxicidade em ratos tratados com Fitol"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Abril/2015 à Dezembro/2018, e serão usados Ratos Isogênicos (45 machos e 65 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