PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
- PONTO FOCAL -

Bioprospecção dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol com ênfase nas propriedades antioxidantes, esquistossomicidas e antimicrobianas

MAYARA LADEIRA COÊLHO

TERESINA - PIAUÍ
2016

MAYARA LADEIRA COÊLHO

Bioprospecção dos monoterpenos: dimetil-octanol, estragol e nerol, com ênfase nas propriedades antioxidantes, esquistossomicidas e antimicrobianas

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.

Orientador:
Profª. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

TERESINA - PIAUÍ
2016

MAYARA LADEIRA COÊLHO

Bioprospecção dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol com ênfase nas propriedades antioxidantes, esquistossomicidas e antimicrobianas

Tese a ser 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

_____

Profª. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante
Orientadora (RENORBIO-UFPI)

_____

Prof. Drª. Antonia Maria das Graças Lopes Cito
Examinadora Externa (UFPI)

_____

Profª. Drª. Chistiane Mendes Feitosa
Examinador Externo (UFPI)

_____

Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto
Examinador Externo (UFPI)

_____

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Examinador Interno (RENORBIO-UFPI)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR
Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes

VICE-REITORA
Profa. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Dr.Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Profª. Dra. Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI
Profª. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o que seria do mar sem as gotas?”

Adaptado de Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

Com todo meu amor, dedico esta tese a minha avó ***Luizinha Ferreira****,*
e aos meus amados pais ***Mário dos Reis Coêlho*** *e* ***Maria Elza Cunha Ladeira Coêlho****,*
que me ensinaram as mais preciosas lições, aquelas que não se encontram em livros.

AGRADECIMENTOS

O caminho foi longo e ao final ficam os laços na alma e a gratidão no coração. Jamais seria capaz de agradecer nominalmente a todos que me dispensaram auxílio no período de execução deste trabalho. Contudo, tendo sido a generosidade sempre presente para comigo, faço breves reconhecimentos a personagens fundamentais nesta jornada.

*A **Deus**, agradecimento diário pela força enviada e presente, que me dizia sempre: "Filha, não desista." Sem a fé que Tu me destes e graça que me ilumina, jamais finalizaria este trabalho. Para Tua honra e glória sejam todos os frutos que eu venha a ter nesta terra.*

*A meu orientador **prof. Dr. Rivelilson Freitas**, em sua memória, e ao seu **Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX)**, por me acolher neste programa de doutoramento e confiar tantos projetos em minhas mãos. Agradeço especialmente pelo exemplo de dedicação e liderança plantado.*

*A minha orientadora, **prof. Dra. Ana Amélia Cavalcante** e ao **Laboratório de Genética Toxicológica**, pela confiança e auxílio, especialmente nesta reta final. Minha gratidão por sua compreensão e espírito maternal na condução deste trabalho.*

*Aos meus pais, **Mário Coêlho** e **Maria Elza Coêlho**, pelo amor que me motiva e encoraja todos os meus dias. A vocês que deram tudo por mim, agradeço e dedico não somente esta tese, mas todos os passos que eu der.*

*Toda casa precisa ter um alicerce forte para suportar o peso da construção e para que ela resista ao tempo e às intempéries. Aos meus irmãos, **Marissa Coêlho** e **Mário Júnior**, por terem me dado sustentação para o prosseguimento de minhas escolhas. Obrigada por serem meus parceiros e me apoiarem incondicionalmente.*

*Ao meu amor, **Saymonl Araújo**, por me estimular e compreender com tanto carinho em todos os momentos de desenvolvimento desta tese. Por enxugar minhas lágrimas e brindar as vitórias, sua ajuda foi única e fundamental.*

*A minha família, a qual agradeço em nome e memória de minha avó **Luizinha Ferreira**. Aquela que vibrava com cada conquista e que me disse antes de partir: "Com fé em Deus, estarei te assistindo minha filha". Sinto sua presença todo dia e para sempre serei grata por ter me ensinado o mais valioso desta vida.*

*A todos meus amigos de doutorado, em nome de **Evérton Ferreira**, **George Laylson, Amanda Almeida, Oskar Almeida e Md Islam** agradeço todos os momentos decisivos de discussão, crescemos juntos.*

*As minhas doutorinhas, **Amanda Fortes**, **Ana Cristina** pela partilha na tese e fora dela e especialmente a **Mirna Gois**, pela gentileza e paciência na impressão das versões desta tese.*

*Aos meus **amigos** queridos, que estão sempre comigo, pelo apoio e dedicação. Não conseguiria nominar cada um, entretanto destaco carinhosamente estes amigos, como*

maneira de agradecer aos que estiveram mais próximos. As minhas friends ***Liana***, ***Dgeanne*** *e* ***Jordana****; aos afulepados* ***Adriana***, ***Felipe***, ***Rafael***, ***Tandrra***, ***Rosana*** *e* ***Arnóbio****; aos totalmente demais,* ***Natacha***, ***Anny*** *e* ***Tênisson****; aos bêts* ***Iris, Juliana, Gisele****. A minha* ***Ligia****, e* ***Rayssa****. Amigos sempre tiveram papel fundamental em minha caminhada e, nesta tese, agradeço a vocês pela compreensão na ausência e pela força para seguir adiante.*

Ao ***prof. Dr. Humberto Medeiros****, por disponibilizar o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM-UFPI), por seu profissionalismo e disponibilidade em participar do exame de qualificação.*

A ***prof. Dra. Nereide Magalhães e sua equipe****, por abrir as portas e possibilidades para desenvolvimento de nanocápsula junto ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm-UFPE).*

Ao ***prof. Dr. Josué de Moraes****, pelo auxílio com testes esquistossomicidas no Instituto Butantan.*

Ao ***prof. Dr. Vicente Galber****, pela cooperação com testes de análise térmica no Laboratório de Tratamentos de Materiais (LABTRAT-IFPI).*

A ***prof. Dra. Graça Citó****, por sua ajuda e companheirismo de sempre e neste trabalho, especialmente, no auxílio com mecanismos reacionais e interpretação de análises de infra-vermelho.*

Ao ***prof. Dr. Lima Neto****, ao Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO-UFPI) e ao Laboratório Multiusuário de RMN da UFPI, pelo auxílio com análises cromatográficas e de RMN.*

Ao ***prof. Dr. Paulo Michel Ferreira*** *e* ***prof. Drª Chistiane Feitosa*** *pelas valiosas contribuições na avaliação em fase de qualificação desta tese.*

Aos amigos do Hospital Universitário (HU-UFPI), à ***equipe do Setor de Farmácia*** *e especialmente à* ***equipe de Vigilância em Saúde*** *pela compreensão e apoio, colegas de trabalhos que tornaram-se amigos especiais.*

A Faculdade Integral Diferencial (FACID-DEVRY), em especial ao meu Grupo de Pesquisa Farmacêutica Aplicada (GPFAR) e aos meus alunos, que tanto me apoiaram e ensinaram nesta caminhada, em nome de ***Juliana Costa***, ***Herlane Meireles***, ***Éllen Nara***, ***Manoela Cavalcante, Tatiana Mendes***, ***Kellyanne Soares e Davi Bessa,*** *recebam meu muito obrigada.*

Aos funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF-UFPI), pela presteza e auxílio, a Dona ***Graça Lustosa****, Sr.* ***Francisco de Assis Senna****, Sr.* ***Orlando Cardoso*** *e Sra.* ***Ivelta Campos****.*

A ***Universidade Federal do Piauí****, por ser minha segunda casa desde 2004. Entre iniciação científica, graduação, mestrado e doutorado. Fui aluna, fui professora e farmacêutica. Minha gratidão ao ambiente que possibilitou muitos sonhos tornarem-se realidade.*

As agências de fomento e pesquisa: ***CNPq*** *– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e* ***FAPEPI*** *– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$ABTS^{\bullet+}$	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Refletância Total Atenuada
CDs	Ciclodextrinas
CE_{50}	Concentração Eficaz 50%
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massa
CI	Complexo de Inclusão
CI_{50}	Concentração Inibitória 50%
CoA	Coenzima A
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doenças Negligenciadas
$DPPH^{\bullet}$	2,2,-difenil-1-picril-hidrazil
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EPM	Erro Padrão da Média
EPO	*European Patent Office*
FRAP	*Férrico Reducing Antioxidant Power*
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier*
IFPI	Instituto Federal do Piauí
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Kc	Constante de Estabilidade
LAPNEX	Laboratório de Neuroquímica Experimental
MA	Malaxagem
MF	Mistura Física
mM	Milimol
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P,D&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

P.A.	Pró-Análise
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PT	Prospecção Tecnológica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotação por minuto
SO	Solubilidade Intrínseca do Substrato
TB	Tuberculose
Tf	Temperatura Final
TG	Termogravimetria
Ti	Temperatura Inicial
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USPTO	*United States Patent and Trademark Office*
v.o.	Via oral
WIPO	*World Intellectual Property Organization*
βCD	β Ciclodextrina
μg mL^{-1}	Micrograma por mililitro

LISTA DE TABELAS

Capítulo I		
Tabela 1	Evidências em bases de dados eletrônicas de monoterpenos e nerol em doenças negligenciadas (após triagem).	44
Tabela 2	Evidências em bases de dados de aplicação do nerol em doenças negligenciadas.	45
Capítulo II		
Tabela 1	Número de patentes depositadas por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados.	62
Capítulo IV		
Tabela 1	Conjunto de compostos e parâmetros estruturais	97
Capítulo V		
Tabela 1	Tabela 1- Estruturas químicas e estimative do para os monoterpenos oxigenados testados.	122
Tabela 2	Concentrações inibitória mínima (MIC) mostradas para o Nerol, 3,7-Dimetil-1-octanol and Estragol contra cepas de *S. aureus, E. coli e C. albicans* (médias geométricas de três testes simultâneos).	123
Capítulo VI		
Tabela 1	Percentual de perdas de massa obtidas por TG das amostras do monoterpeno nerol, β-CD e CI nerol:β-CD	148

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1	Organização do trabalho de tese	24

Referencial Teórico

Figura 1	Biossíntese de terpenos	30
Figura 2	Estrutura molecular do 3,7-dimetil-1-octanol	32
Figura 3	Estrutura molecular do Estragol	33
Figura 4	Estrutura molecular do nerol	34
Figura 5	Danos ocasionados pelo estresse oxidativo em organismo humano	36
Figura 6	Ciclo biológico do *S. mansoni*	
Figura 7	Representação dos mecanismos de resistência através da existência de bombas de efluxo	41
Figura 8	Estrutura química da β-ciclodextrina	43

Capítulo I

Figura 1	Patentes depositadas em doenças negligencias de acordo com o percentual ocupado pelos países de depósito	57

Capítulo II

Figura 1	Número de patentes depositadas na base europeia por país, sendo AU (Austrália), CA (Canadá), CN (China), DE (Alemanha), GB (Reino Unido), JP (Japão), IN (Índia), SK (Eslováquia) e US (Estados Unidos da América).	71
Figura 2	Evolução anual do número de depósitos de patentes na base de dados europeia	72
Figura 3	Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontrados na base europeia.	73
Figura 4	Número de patentes depositadas no WIPO por país, sendo DE (Alemanha), GB (Reino Unido), IN (Índia) e US (Estados Unidos da América).	73
Figura 5	Evolução anual do número de depósitos de patentes na WIPO.	73
Figura 6	Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontradas na WIPO.	74

Capítulo III

Figura 1	Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae.*	84
Figura 2	Porcentagem de mortalidade das *A. salina*. Em **A**, 24 horas de tratamento com o estragol, dimetil-octanol, nerol e dicromato de potássio em várias concentrações (31,25-500 µg/mL) e em **B** 48 horas de tratamento com o estragol, dimetil-octanol, nerol e dicromato de potássio em várias concentrações (31,25-500 µg/mL).	85
Figura 3	Capacidade hemolítica do nerol, dimetil-octanol e Triton X-100	86

Figura 4	Efeitos do dimetil-octanol, estragol e nerol e trolox na inibição dos radicais DPPH• **(A)** e ABTS•+	88
Figura 5	Indicação dos hidrogênios do tipo alílicos na estrutura do Nerol	88
Figura 6	Possível mecanismo para ação antioxidante do nerol na neutralização de R+	89
Figura 7	Potencial redutor (Fe^{3+}/Fe^{2+}) do dimetil-octanol, estragol e nerol e trolox	89
Figura 8	Efeito do nerol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio	93
Figura 9	Efeitos do estragol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio	94
Figura 10	Efeitos do dimetil-octanol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio	95
Capítulo IV		
Figura 1	Efeito *in vitro* de várias concentrações de dihidrocitronelol sobre a sobrevivência de vermes.	119
Figura 2	Investigação de Microscopia de *Schistosoma mansoni* do sexo masculino após incubação *in vitro* com dihidrocitronelol.	120
Figura 3	Análise quantitativa das alterações morfológicas no tegumento do *S. mansoni* após exposição a dihidrocitronelol.	122
Capítulo V		
Figura 1	MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do nerol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).	137
Figura 2	MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do 3,7-Dimetil-1-octanol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).	137
Figura 3	MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do estragol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).	138
Figura 4	MIC do brometo de etídio na ausência e na presença do dimetil-octanol, estragol e nerol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).	138
Capítulo VI		
Figura 1	Representação esquemática do método de malaxagem para obtenção do complexo de inclusão	153
Figura 2	Espectrômetro (FTIR) ThermoNicolet IS5	154
Figura 3	Equipamento de Termobalança Shimadzu®	154
Figura 4	Equipamento de DSC-60 Shimadzu®	155
Figura 5	Espectro FTIR de β-CD e nerol e sua mistura física (MF nerol:β-CD) e complexo de inclusão (CI nerol:β-CD)	156

Figura 6	Espectro ampliado da região de "finger print" do FTIR de β-CD e nerol e sua mistura física (MF nerol:β-CD) e complexo de inclusão (CI nerol:β-CD)	157
Figura 7	Curva de TG das espécies livres βCD, nerol e complexo nerol:βCD	158
Figura 8	Curvas da Derivada de TG das espécies livres βCD, nerol, e complexo nerol:βcd	159
Figura 9	Termograma de DSC do monoterpeno nerol puro	160
Figura 10	Termograma de DSC do β-CD, MF, e CI nerol:βCD	161

COÊLHO, M.L. **Bioprospecção dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol com ênfase nas propriedades antioxidantes, esquistossomicidas e antimicrobianas.** Orientadora: Prof. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2016. 249 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

O dimetil-octanol (3,7-dimetil-1-octanol), estragol (1-alil-4-metoxibenzeno) e nerol (cis-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol), são monoterpenos oxigenados, cuja classe é conhecida por ser derivada de óleos essenciais de plantas medicinais. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio bioensaios *in vitro, in vivo* e *ex vivo,* o perfil tóxico, citotóxico e as atividades farmacológicas: antioxidante, antimicrobiana e antihelmíntica destes monoterpenos, tendo sido realizada revisão de literatura, seguida de prospecção científico-tecnológica em bases eletrônicas de dados direcionada para aplicação destas substâncias em doenças negligenciadas. Verificou-se uma ampla variedade de aplicações farmacológicas e relevantes utilizações comerciais como em fragrâncias, cosméticos e flavorizantes alimentícios. Contudo, o baixo número de registro de depósito de patentes encontrado sugeriu a necessidade de maiores investimentos para impulsionar o desenvolvimento de produtos derivados a partir destes bioativos. As substâncias não apresentaram atividade hemolítica e apresentaram baixa toxicidade em bioensaios com *Artemia salina*. A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* destes terpenos contra os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila e 2,2'-azenobis-3-3etilbenzolina-6-sulfônico indicaram que os mesmos apresentaram atividade antioxidante nos ensaios que utilizaram os radicais DPPH• e ABTS•+, contudo não foram capazes de reduzir o íon Ferro. Em *S. cerevisiae* os monoterpenos confirmaram atividade antioxidante na modulação pelo dano oxidativo induzido por H_2O_2. A atividade antimicrobiana intrínseca foi avaliada contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*. Os monoterpenos foram inativos contra *S. aureus,* no entanto, o nerol foi ativo contra *E. coli* e *C. albicans*. A adição dos compostos no meio de crescimento, em concentrações subinibitórias aumentou a atividade de norfloxacina contra *S. aureus* SA1199-B. Este resultado indicam que os bioativos testados, especialmente o nerol, podem ser usados como adjuvantes de fluorquinolonas na antibioticoterapia de infecções ocasionadas por *S. aureus*. Foi realizada triagem biológica *in vitro* dos terpenos quanto à atividade contra o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. O dimetil-octanol foi o terpeno mais ativo. A microscopia confocal de varredura a laser revelou que o dimetil-octanol induziu fortemente danos no tegumento do verme adulto e foi observada correlação entre mudanças de viabilidade e modificações tegumentares. Esses resultados indicam o potencial deste monoterpeno como um agente antiparasitário. Foi delineado, obtido e caracterizado um complexo de inclusão (CI) a partir do nerol com B-ciclodextrina por análise térmica e absorção espectrofotométrica no infravermelho (FTIR). Os resultados sugerem uma complexação de nerol com β-CD. A curva termogravimétrica do CI indica uma saída de moléculas de água de solvatação a partir da cavidade do complexo formado por substituição à moléculas de droga, provavelmente incluída. A análise em infravermelho corrobora com a hipótese de inclusão do nerol na cavidade da ciclodextrina.

Palavras-chave: terpenos, esquistossomose, resistência bacteriana, estresse oxidativo, atividade antimicrobiana.

COÊLHO, M.L. **Bioprospecting of monoterpenes dimethyl-octanol, estragole and nerol with emphasis on antioxidant, antimicrobial and schistosomicide properties**. Advisor: Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, Ph.D. 2016. 244 p. Doctoral thesis. Post-Graduate in Biothecnology, Northeast Biothecnology Network – RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

The dimethyl octanol (3,7-dimethyl-1-octanol), estragole (1-allyl-4-methoxybenzene) and nerol (cis-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol) are oxygenated monoterpenes whose class is known to be derived from essential oils of medicinal plants. The objective of this study was to evaluate by *in vitro, in vivo* and *ex vivo,* a toxic and cytotoxicity profile and pharmacologic activities: antioxidant, antimicrobial and anthelmintic. Literature review was performed, followed by scientific and technological foresight in electronic databases for directed application of these substances in neglected diseases. A wide variety of pharmaceutical applications as antinociceptive, antiinflammatory, antiantimicrobiana, antidepressant, sedative and important commercial uses as fragrances, cosmetics and food flavorings have been disclosed. However, the low number of patent filing records found suggested the need for greater investment to boost the development of products derived from these bioactives. The *in vitro* evaluation of the antioxidant capacity of these terpenes against radicals 2,2- diphenyl -1-picrilhidrazila and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid suggests that the bioactive had antioxidant activity in assays using the DPPH• and ABTS•+ however were not able to reduce the iron ion. In *S. cerevisae* the monoterpenes are excelents antioxidant activities in the modulation by oxidative damage induceding H_2O_2. The substances shown not to be cytotoxic at the level of red blood cells, while the brine shrimp bioassay showed low toxicity with the reading 24 hours. Biological screening of terpenes was performed in vitro for activity against adult worms of *Schistosoma mansoni.* The tests have revealed that dimethyl octanol was the most active terpene. The laser scanning confocal microscopy revealed that dimethyl octanol strongly induced damage to the in tegument and adult *Schistosoma* was observed correlation between viability changes and soft changes. These results indicate the potential of monoterpenes as an antiparasitic agent. In antimicrobial evaluation, terpenes were evaluated for antibacterial action (strains of *S. aureus* and *E. coli*) and antifungal (*C. albicans* strains). The monoterpenes were inactive against S. aureus, however, nerol was active against *E. coli* and *C. albicans*. The addition of the compounds in the growth medium at concentrations subinibitory norfloxacin increased activity against *S. aureus* SA1199 b. This result shows that the tested bioactive, especially nerol, are capable of inhibiting the efflux pump of S. aureus Nora. It was designed obtained and characterized inclusion complex from nerol with B-cyclodextrin by thermal analysis and infrared absorption spectrophotometer (FTIR). The results suggest a complexing nerol with β-CD. The thermogravimetric curve of IC found indicates an output solvating water molecules from the complex cavity formed by replacing the drug molecules probably included.

Keywords: terpenes, schistosomiasis, antimicrobial resistance, oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **22**

2. OBJETIVOS **27**

2.1 GERAL 27
2.2 ESPECÍFICOS 27

3. REFERENCIAL TEÓRICO **29**

3.1 PLANTAS MEDICINAIS 29
3.1.1 Óleos essenciais *29*
3.2 MONOTERPENOS 30
3.2.1 Propriedades físico-químicas do dimetil-octanol *31*
3.2.2 Propriedades físico-químicas do Estragol *32*
3.3.3 Propriedades físico-químicas do Nerol *33*
3.3 PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DE MONOTERPENOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS 34
3.4 ESTRESSE OXIDATIVO 35
3.4.1 Atividade antioxidante de compostos químicos de origem vegetal *36*
3.5 ESQUITOSSOMOSE 37
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 40
3.7 SISTEMA DE VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS UTILIZANDO CICLODEXTRINAS 42

REFERÊNCIAS **44**

CAPÍTULO I - APLICAÇÕES DE MONOTERPENOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: UM ESTUDO PROSPECTIVO DO NEROL **52**

RESUMO **53**

ABSTRACT **53**

1. INTRODUÇÃO **54**

2. MATERIAIS E MÉTODOS **55**

3. RESULTADOS **55**

3.1. RESULTADOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS 55
3.2. RESULTADOS EM DOENÇAS NEGLIGENCIDAS (DNS) 59
3.2.1. Atividade anti-malária *59*
3.2.2. Atividade contra dengue *59*
3.2.3. Atividade esquistossomicida *60*
3.2.4. Potencial anti-tuberculose *60*
3.2.5. Atividade contra hanseníase *61*
3.2.6. Potencial atividade leishmanicida e contra Doença de Chagas *61*

4. CONCLUSÃO **61**

5. REFERÊNCIAS **62**

CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO MONOTERPENOS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA **68**

RESUMO **69**

1. INTRODUÇÃO **70**

2. METODOLOGIA **71**

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO **71**

3.1. PATENTES DEPOSITADAS NO EPO 72
3.2 PATENTES DEPOSITADAS NA WIPO 74

4. CONCLUSÕES **75**

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, HEMOLÍTICA, OXIDANTE/ANTIOXIDANTE DE MONOTERPENOS OXIGENADOS EM MÚLTIPLOS ENSAIOS *IN VITRO* E EM *SACCHAROMYCES CEREVISAE* .....

RESUMO 79

ABSTRACT 80

1 INTRODUÇÃO 80

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 85

CONCLUSÃO 98

REFERÊNCIAS 98

CAPÍTULO IV - PARÂMETROS ESTRUTURAIS, PROPRIEDADES MOLECULARES E EVOLUÇÃO BIOLÓGICA DE ALGUNS TERPENOS USADOS CONTRA O PARASITA *SCHISTOSOMA MANSONI* .....

RESUMO 105

2.1 COMPOSTOS E REAGENTES 107
2.2 ANÁLISE ESTRUTURAL E PROPRIEDADES MOLECULARES 108
2.3 MANUTENÇÃO DE ANIMAIS E PARASITAS 108
2.4 COMITÊ DE ÉTICA 108
2.5 ANÁLISE ESQUISTOSSOMICIDA IN VITRO 109
2.6 ESTUDOS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER 109
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 110

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 110

3.1 COMPOSTOS 110
3.2 ESTUDOS IN VITRO 120
3.3 EFEITOS DO DIHIDROCITRONELOL NA ATIVIDADE MOTORA E VIABILIDADE DO S. MANSONI 120
3.4. EFEITO DE DIHIDROCITRONELOL NO TEGUMENTO DE S. MANSONI 122
3.5. ANÁLISE ESTRUTURAL E PROPRIEDADES MOLECULARES 125
3.6 CONCLUSÃO 125

REFERÊNCIAS 126

CAPÍTULO V – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIDORA DO TRANSPORTADOR MULTI-DROGA NORA POR MONOTERPENOS OXIGENADOS 132

2.1. CEPAS E DROGAS 135

2.2. ESTIMATIVA DO LOG P 136
2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA 136
2.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO NORA 136
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 137

3. RESULTADOS 137

4. DISCUSSÃO 141

CAPÍTULO VI - ESTUDOS DE DELINEAMENTO FARMACÊUTICO DE UM COMPLEXO DE INCLUSÃO A PARTIR DE NEROL E B-CICLODEXTRINA 152

RESUMO 152

ABSTRACT 152

1. INTRODUÇÃO 153

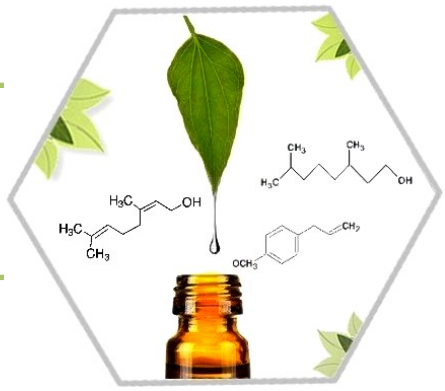
2. MATERIAIS E MÉTODOS 154

2.3. ESTATÍSTICAS 157

4 CONCLUSÃO 164

REFERÊNCIAS 165
CONSIDERAÇÕES FINAIS 172
APÊNDICES 175
APÊNDICE A: ESPECTROS DE RMN ^{1}H DO NEROL 175
APÊNDICE B: ESPECTROS DE RMN ^{13}C DO NEROL 176
PRODUÇÃO CIENTÍFICA 178
ANEXOS 184
ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA GEINTEC – GESTÃO, INOVAÇÃO E TECNOLOGIAS – QUALIS B4 BIOTECNOLOGIA 184
ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL ARCHIVES OF MEDICINE – QUALIS B2 - BIOTECNOLOGIA 193
ANEXO C: ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY – QUALIS B1 - BIOTECNOLOGIA. 205
ANEXO D: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS – QUALIS A2 -BIOTECNOLOGIA 222
ANEXO E: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MICROBIAL PATHOGENESIS – B1 - BIOTECNOLOGIA 230
ANEXO F: ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 249

Introdução



1. INTRODUÇÃO

O uso de substâncias medicamentosas naturais e o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais tem aumentado substancialmente a cada ano, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, levando a trocas interculturais e a difusão do uso de técnicas e de produtos terapêuticos naturais (NGUTA et al., 2016, GIOVANINNI et al., 2016; DUTRA et al., 2016; MORAES FILHO, 2012; WHO, 2004). O aumento da utilização de medicamentos contendo exclusivamente insumos ativos de origem natural ou associados a componentes químicos de outra natureza estimula empresas privadas e organizações governamentais para a busca de novas substâncias ativas de origem vegetal com atividades farmacológicas e mínimos efeitos tóxicos, o que tem sido um desafio contínuo para a indústria farmacêutica (JACOBO-HERRERA et al., 2016; BASS et al., 2009; FERREIRA, 2002; MARQUES et al., 2013).

Neste sentido, o Brasil apresenta biodiversidade estimada entre 350.000 e 550.000 espécies (FERREIRA, 2002). Trata-se de um grande potencial para a pesquisa e exploração na área de plantas medicinais visando o desenvolvimento de novos fármacos (MARQUES et al., 2016; ALVES et al., 2000). Apesar da riqueza da flora brasileira, existe consenso sobre a insuficiência de estudos científicos sobre o assunto (SOLAR et al., 2016; FERREIRA, 2002). Dados revelam que somente 8% das plantas existentes foram estudadas quanto a sua atividade biológica (SIMÕES et al., 2003) e, que apenas 1.100 espécies vegetais foram avaliadas quanto as suas propriedades medicinais.

Tudo isto reitera a necessidade e a importância da pesquisa para a comprovação das atividades farmacológicas de produtos derivados de plantas medicinais (GIOVANNINI et al., 2016; MARQUES et al., 2013), dentre as quais, destacam-se as espécies de plantas aromáticas que têm sido utilizadas medicinalmente por causa de seus óleos essenciais (OEs). Os OEs e seus constituintes são utilizados em diversos setores industriais, como agentes aromatizantes na indústria alimentícia, como fragrâncias para a indústria de perfume e cosméticos e em formulações de medicamentos pela indústria farmacêutica (CALO et al., 2016; De VINCENZI et al., 1996; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os OEs derivados de plantas exibem várias atividades biológicas, como antinociceptiva (ANAYA-EUGENIO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2001), antimicrobiana (CALO et al., 2016), antioxidante (UD-DAULA et al., 2016) e esquistossomicida (OLIVEIRA et al., 2012). Pesquisas recentes revelam que a grande maioria das atividades biológicas dos óleos essenciais (OEs) podem ser atribuídas aos monoterpenos, principais constituintes dos OEs (PEIXOTO et al., 2015; ALMEIDA et al., 2014; DO AMARAL et al., 2007; SOUTO-MAIOR et al., 2011). Como parte desta valiosa classe de metabólitos, estão os monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol, objeto de estudo deste trabalho.

Nesse contexto, a investigação de monoterpenos por estratégias não clínicas tem contribuído para a identificação de drogas mais promissoras, tendo em vista que os resultados destes estudos na descoberta de novos fármacos reduz os custos com o seu desenvolvimento (KWEKA et al., 2016; SHI et al., 2016; XIE et al., 2014; HASEGAWA et al., 2008).

Em meio à busca de alternativas para o tratamento de doenças com grande impacto na saúde pública, evidências apontam para o potencial dos monoterpenos no combate à esquistossomose (MAFUD et al., 2016). A esquistossomose é uma parasitose que tem causado um alto impacto epidemiológico, acometendo de seis a sete milhões de indivíduos no Brasil, a maioria destes, localizados nos estados do nordeste brasileiro, nos quais as condições de desenvolvimento são ainda mais precárias (PASSOS-CASTILHO et al., 2016; CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Apesar disto, o tratamento quimioterápico da esquistossomose continua sendo baseado no uso de apenas um fármaco, o praziquantel, entretanto seu uso extensivo e inapropriado culminou no aparecimento de resistência (CAFFREY, 2007; DOENHOFF et al., 2008). Trata-se, portanto, de patologia pertencente ao grupo de doenças negligenciadas, que não despertam o interesse das indústrias farmacêuticas e nem dos setores públicos, que praticamente não investem na descoberta de novos fármacos para uso pela parcela da população com baixo poder aquisitivo (O'CONNELL, 2007).

No contexto dos estudos de bioprospecção, que visam à descoberta de produtos biologicamente ativos e esperam contribuir para programas de desenvolvimento autossustentável pelo uso de produtos naturais, este trabalho teve como intento desvelar novas atividades biológicas para os compostos monoterpênicos dimetil-octanol, estragol e nerol. Com isso, pela magnitude do efeito deletério do

estresse oxidativo no organismo humano avaliou-se também a capacidade antioxidante, oxidante por ensaios não clínicos *in vitro* e em *S. cerevisiae*.

Outro problema de saúde pública que impulsiona a busca por novos fármacos é o aumento no número de infecções bacterianas e fúngicas, além do fato dos antibacterianos e antifúngicos estarem entre os medicamentos mais prescritos, aumentando os riscos e a probabilidade de resistência. Neste âmbito, propôs-se avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca dos monoterpenos estudados, bem como a sua capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA de *S. aureus*, a qual confere resistência aos antibióticos fluorquinolônicos. Além disso, estudou-se parâmetros de segurança destes bioativos através de modelos de toxicidade e citotoxicidade *in vivo e ex vivo,* conforme demonstrado na Figura 1 (LIU et al., 2014).

Figura 1 – Organização do trabalho de tese

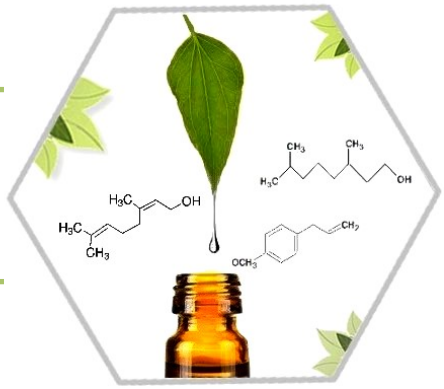


No panorama de desenvolvimento de produtos farmacêuticos a partir de moléculas bioativas, tem-se estudado a utilização de vetores capazes de permitir a otimização das propriedades físico-químicas das drogas, tornando-as mais solúveis e menos tóxicas no tratamento ou prevenção de doenças humanas. Entre as diversas estratégicas utilizadas, a inclusão de fármacos em ciclodextrinas tem se mostrado promissora (SABINO, 2011). Dessa maneira, o trabalho propôs o desenvolvimento de um complexo de inclusão de ciclodextrina com o nerol.

Em resumo, esta tese de doutorado pretende fornecer subsídios para a bioprospecção de novos agentes terapêuticos com possíveis atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, esquistossomicida, toxicidade tolerável e que atenda ao

caráter emergencial da necessidade do delineamento de fármacos com maior efetividade e segurança, destinada ao tratamento das morbidades com alto impacto epidemiológico consideradas negligenciadas e/ou resistentes às drogas de uso tradicional disponíveis.

Objetivos



2. OBJETIVOS

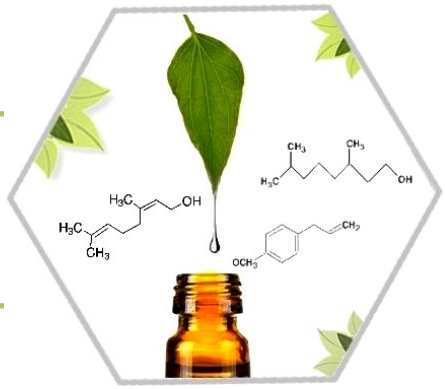
2.1 Geral

Realizar a bioprospecção das atividades antioxidante, antimicrobiana e esquistossomicida dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol, e avaliar seus perfis tóxico e citotóxico como compostos naturais de importância farmacológica.

2.2 Específicos

- Desenvolver uma prospecção científica e tecnológica em bases de dados eletrônicas, sobre o uso e aplicações terapêuticas dos monoterpenos em doenças negligenciadas;
- Avaliar o perfil tóxico e citotóxico dos monoterpenos através de bioensaios *in vivo* e *ex vivo*;
- Avaliar o potencial oxidante, antioxidante dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol frente aos radicais DPPH· e ABTS·+ e em *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes enzimáticas;
- Investigar a atividade antimicrobiana intrínseca dos monoterpenos estudados, contra cepas de *S. aureus*, *E. coli e C. albicans;*
- Avaliar a atividade inibidora da bomba de efluxo NorA de *S. aureus*, responsável pela resistência aos antibióticos fluoroquinolônicos;
- Verificar a atividade anti-helmíntica *in vitro* do dimetil-octanol, estragol e nerol em *S. mansoni* na fase adulta e avaliar seu efeito sobre a motilidade, integridade do tegumento e taxa de mortalidade deste helminto
- Delinear, obter e caracterizar um complexo de inclusão utilizando β-ciclodextrina e a substância nerol.

Referencial Teórico



3. Referencial Teórico

3.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é aquela espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (ANVISA, 2013). A utilização de plantas medicinais é muito antiga, sabendo-se que, desde 2300 a.C., os egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições tantas outras. Desde a pré-história, os primeiros habitantes da terra com suas crenças queimavam estas plantas de odores agradáveis pra afastar os espíritos maléficos e manter animais perigosos distantes (GIOVANNINI et al., 2016; MIRANDA, 2012).

A diversidade de substâncias ativas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais, no intuito de explorar suas propriedades, sendo contrapartida para pesquisa de novos fármacos com o objetivo de verificar a atividade dos seus metabólitos secundários (JACOBO-HERRERA et al., 2016; VENTUROSO, 2011).

Dentre estes distintos grupos do metabolismo secundário os terpenos se destacam por constituírem a maior parte de produtos secundários. Estes são formados da união de unidades pentacarbonadas, sendo sintetizado a partir da acetil coenzima A ou intermediários glicolíticos. Muitos vegetais possuem uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis chamada de óleos essenciais, os quais conferem aroma característico às folhas (PEIXOTO et al., 2015; SOUZA; PERETIATKO, 2014).

3.1.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas de compostos químicos voláteis, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas. Dentre as principais características estão o fato de serem solúveis em álcool e éter, entretanto insolúveis em água. São comumente empregados como aromas e fragrâncias nas indústrias alimentícias e de perfumaria e cosméticos, além de constituintes de compostos farmacêuticos (UD-DAULA et al., 2016; SILVEIRA, 2012; LOREGIAN, 2013).

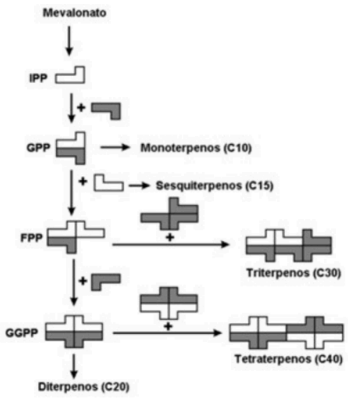
Na fitoterapia, possuem ampla ação farmacológica, sendo utilizados pelo seu poder medicinal e destacam-se por suas atividades farmacológicas, tais como antitumoral, antioxidante, antinociceptivo, antimicrobiana (ANAYA-EUGENIO et al., 2016; UD-DAULA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; NIKOLIC et al., 2014), antipirética (MUHAMMAD et al., 2013), antidepressiva, anticonvulsivante (SHAREEF; YELLU; ACHANT, 2013), analgésicas, expectorantes, estomáquicas, antimicrobianas, sedativas e estimulantes, além de possuírem características como cicatrizante, relaxante, vermífugo e antiviral (MAFUD et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2012; MIRANDA, 2012).

Em geral, apresentam composição química complexa, contendo constituintes químicos de baixa massa molecular, especialmente hidrocarbonetos e derivados oxigenados. Na maioria das vezes são constituídos por substâncias terpênicas, normalmente constituída de 10 a 15 átomos de carbono (monoterpeno e sesquiterpeno). Os principais grupos funcionais das substâncias terpênicas encontradas no óleo são alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (SOUZA; PERETIATKO, 2014).

3.2 Monoterpenos

Os terpenos são hidrocarbonetos classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas formadoras em: hemiterpenos (C5, 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C10, 2 unidades isoprênicas), sesquiterpenos (C15, 3 unidades isoprênicas), diterpenos (C20, 4 unidades isoprênicas) e politerpenos (C5)n (AHARONI et al., 2005). (Figura 1).

Figura 1 – Biossíntese de terpenos.



Fonte: PERES, 2016.

Monoterpenos são caracterizados por terem 10 átomos de carbono e, portanto, duas unidades de isopreno. Apresentam grande variabilidade de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e outros oxigenados e englobam coletivamente muitos não apenas funcionais, mas isômeros posicionais e geométricos. Eles são considerados como uma das maiores famílias de produtos naturais e precussores importantes para a produção biotecnológica (OZ et al., 2015; PAÚL, 2012; PROBST, 2012).

Por sua vez, os monoterpenos são difundidos na natureza, principalmente nas plantas ricas em óleos essenciais, em que representam a classe majoritária na composição destes óleos, constituindo 90% dos mesmos, e possuem várias atividades farmacológicas descritas, como analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante, dentre outras (SILVA, et al., 2015; SILVA, et al., 2014; NOGUEIRA NETO et al., 2013).

A grande maioria dos monoterpenos é volátil e constituinte básico de óleos aromáticos (óleos essenciais ou essências), como o mentol, linalol e citral, presentes na hortelã (*Mentha*, Lamiaceae), alfazema (*Lavandula angustifolia* L., Lamiaceae) e no capim-limão (*Cymbopogon citratus*, Poaceae). Alguns são precursores de uma classe especial de substâncias, os iridóides e seco-iridóides, encontrados, por exemplo, nas raízes de valeriana (*Valeriana officinalis* L., Valerianaceae) ou como unidades presentes nas estruturas de alguns tipos de alcaloides complexos (FERREIRA, 2014).

Os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis são: nerol, linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros. Alguns monoterpenos, como o nerol, são bem conhecidos como constituintes da essência volátil de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes (KNAAK; FIUZA, 2010; PROBST, 2012).

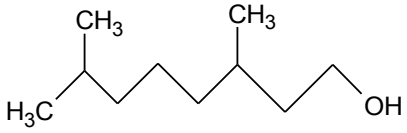
3.2.1 Propriedades físico-químicas do dimetil-octanol

O monoterpeno 3,7-dimetil-1-octanol (Figura 2), conhecido também como dihydrocitronellol, 1-octanol,3,7-dimetil e tetrahidrogeraniol, com fórmula molecular $C_{10}H_{22}O$, apresenta índice de refração em 1,432 ± 0,02 (est), tensão superficial em torno de 28,0 ± 3,0 dina/cm (est), densidade 0,824 ± 0,06 g/cm^3, polaridade de 19,75 ± 0,5, massa molar de 158,284 g/mol, solúvel em álcool, óleos

fixos, propilenoglicol e água (175,4 mg/L a 25 °C) e insolúvel em glicerina. É uma substância química com estabilidade como fragrâncias em soluções alcoólicas, alcoólica antiperspirante, detergente, amaciante de roupa, limpador superfície, xampu e sabão (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Trata-se de uma substância presente em alguns óleos essenciais com potencial atividade fumigante (SEO et al., 2009) e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como aromatizante, substância aromatizante sintético e como aditivo alimentar autorizado para adição direta aos alimentos para consumo humano.

Figura 2 – Estrutura molecular do 3,7-dimetil-1-octanol



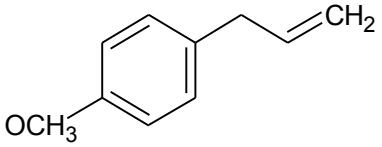
O 3,7-dimetil-1-octanol pode ser preparado a partir da hidrogenação do geraniol ou citronelol, monoterpenos encontrados em muitas plantas aromáticas (LAPCZYNSKI et al., 2008).

3.2.2 Propriedades físico-químicas do Estragol

O monoterpeno estragol (Figura 3), quimicamente identificado como 1-metoxi-alil-benzeno ou 4-metoxialilbenzeno, apresenta fórmula química $C_{10}H_{12}O$ e peso molecular 148,2 g/mol, é capaz de formar misturas azeotrópicas em água e apresenta solubilidade conhecida em álcool e clorofórmio (SMITH et al., 2002).

O estragol é um constituinte natural de plantas medicinais, por exemplo estragão, manjericão e erva-doce. Seus óleos essenciais têm sido amplamente utilizados em produtos alimentares como agentes aromatizantes (DE VINCENZI et al., 2000).

Figura 3 - Estrutura molecular do Estragol



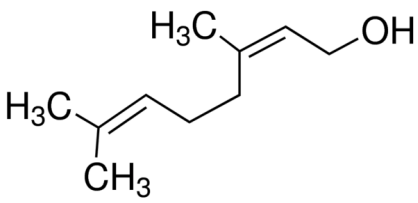
A única diferença estrutural entre estragol e metil eugenol é que o último contém um segundo grupo metoxi no anel benzênico. Uma vez que contêm a mesma estrutura do esqueleto e os substituintes do anel, espera-se que ambas as substâncias exibam destino metabólico semelhante, farmacocinético e potencial toxicológico. Portanto, informações chave sobre o estragol, metileugenol, safrol e outros derivados de p- alilacoxibenzeno fornecem um base biológica e química mais abrangente, a qual se avalia a segurança destas substâncias (SMITH et al., 2002).

Estudos prévios demonstraram atividade de óleos essenciais de *Agastache* contendo 49,42 % de estragol contra espécies fúngicas (SHIN, KANG, 2003). De fato, pesquisas mostraram os efeitos sinérgicos da combinações o entre estragol e cetoconazol, como uma combinação eficaz para o tratamento de infecções por *Candida* spp. (SHIN, PYUN, 2004).

3.3.3 Propriedades físico-químicas do Nerol

Nerol (cis-2,6-dimetil-2,6-octadien-8-ol) é um monoterpeno que pode ser encontrado em várias plantas medicinais, como *Lippia* spp e *Melissa officinales* L., com fórmula química $C_{10}H_{18}O$, peso molecular 154,25 g/mol , ponto de ebulição de 225 ºC e solubilidade em água de cerca de 255,8 mg/L a 25 ºC. Trata-se de um monoterpeno, com radical álcool primário do tipo acíclico que é utilizado como composto de fragrância em perfumaria (Figura 4). Este monoterpeno apresenta atividade antimicrobiana, ansiolítica, antioxidante e propriedades antivirais (ANGELIS, 2002; SAITO, 2004). O Nerol pode apresentar atividade atraente, repelente, e até tóxica a insetos e microorganismos, e apresenta efeito antiespasmódico (ANGELIS, 2012; SAITO, 2004; MARQUES, 2013).

Figura 4- Estrutura molecular do nerol



Para o óleo ser um produto comercializável, o mesmo deve apresentar, no mínimo, 75% de citral na sua composição. O citral, principal componente de óleo de capim-santo, é uma mistura dos isômeros geranial (trans citral) e neral (cis citral), sendo separáveis por cromatografia de gás líquido, o geranial e o neral podem ser transformados em geraniol e nerol, possuindo odor de laranja e rosas respectivamente, usados na fabricação de perfumes finos (MIRANDA, 2012).

Apesar dos relatos acerca das propriedades farmacológicas do nerol, ainda há poucos relatos na literatura acerca das suas propriedades toxicológicas e farmacológicas.

3.3 Pesquisa, desenvolvimento e inovação de monoterpenos para Doenças Negligenciadas

A indústria biotecnológica é importante na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas drogas e apresenta um papel estratégico no setor social e econômico. Como inovar é considerado a base para o sucesso em especial na área da saúde, o setor farmacêutico destina milhões de dólares anualmente para financiar a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico de novos produtos (MADEIRA, BORSCHIVER, PEREIRA JR., 2013).

As doenças negligenciadas (DN) são doenças causadas por agentes infecto-parasitários que provocam importante dano físico, cognitivo e socioeconômico em crianças e adolescentes, principalmente, em comunidades de baixa renda. Para a saúde pública, elas são um desafio, em especial aquelas que chegam a causar impacto no perfil de morbidade (AGUIAR-SANTOS et al., 2013).

Apesar da existência de programas de financiamento para pesquisa na área de Doenças Negligenciadas, eles são insuficientes para dar andamento aos avanços, como por exemplo, a produção de novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo (SOUZA, 2010).

A negligência que permeia o histórico de determinadas doenças transmissíveis associadas à pobreza impacta de forma direta nas condições sociais e econômicas de populações marginalizadas. Atualmente, mesmo com o iminente risco de contaminação de pelo menos 40% da população mundial por uma doença negligenciada,

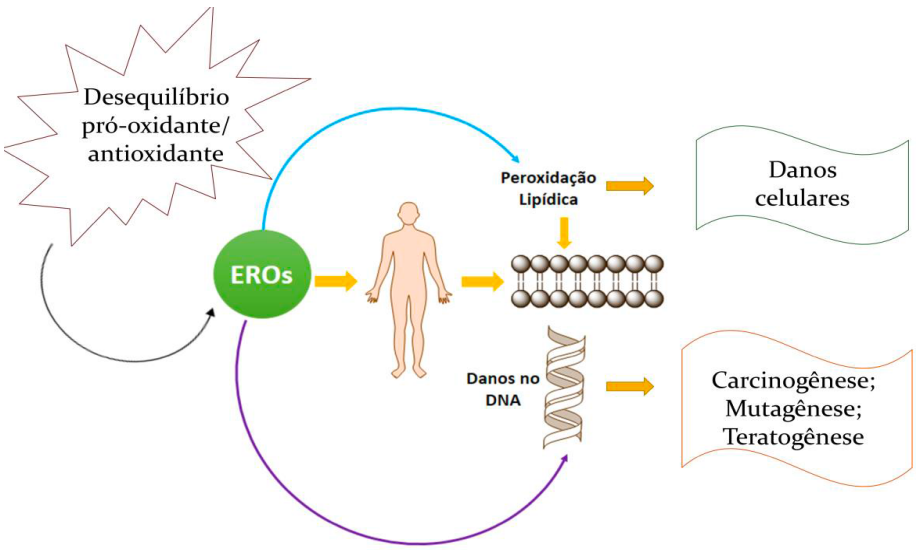
constata-se que elas continuam em grande parte ocultas, concentradas em remotas áreas rurais ou em favelas urbanas (ANDRADE, 2015).

Presentes em 149 países, as doenças tropicais negligenciadas representam um inimigo que se aproveita da fragilidade social e econômica. São vírus, bactérias e parasitos que atingem um bilhão de pessoas, sobretudo na faixa tropical do globo, onde estão concentradas as populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento. Os agravos mais importantes são: malária, dengue, doença de chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose e tuberculose (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2012).

3.4 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode causar uma série de desordens celulares, como peroxidação lipídica, efeitos deleterios em proteínas e enzimas, bem como alterações no DNA. Estes danos, por sua vez, podem estar associado a inúmeras patologias, como a arterosclerose, câncer, diabetes mellitus, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas, problemas respiratórios e o envelhecimento precoce (FLESCHIN et al., 2000; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004), conforme esquema da Figura 5.

Figura 5 – Danos ocasionados pelo estresse oxidativo em organismo humano



Fonte: Adaptado de Fleschin e colaboradores (2000); Hirata e colaboradores (2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Este processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, 2006).

O equilíbrio entre a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes determinam o grau de estresse oxidativo (VELLOSA et al., 2013). Além disso, há evidência que a geração de espécies reativas derivadas do oxigênio e a resposta correspondente ao estresse oxidativo são fatores fundamentais para determinar ou ao menos participar do processo de determinação da longevidade (OLIVEIRA et al., 2009).

Os antioxidantes têm sido propostos como potenciais ferramentas preventivas e terapêuticas para combater os prejuízos e danos à saúde decorrentes do estresse oxidativo. Além disso, podem ser um instrumento na prevenção de doenças (MALDONADO et al., 2011).

3.4.1 Atividade antioxidante de compostos químicos de origem vegetal

A presença de radicais livres tem sido interligada com um grande número de doenças, onde o aumento destes é causado devido à hiperóxia (aumento na quantidade de oxigênio em tecidos e órgãos) e à exposição das células ou indivíduos a certos componentes químicos, à radiação ou à inflamação tecidual local, resultando em estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (SILVA et al., 2010).

Os antioxidantes quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis e que inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos são capazes de estabilizar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos das células (OLIVEIRA, 2014). Os seres vivos monitoram a produção de radicais livres através de diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar, tais como vitamina E, vitamina C, selênio e carotenoides (OLIVEIRA, 2014).

Os antioxidantes são classificados em dois grupos, primários e secundários. Os primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um

radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais (BERGAMASCHI, 2010).

Dentre os métodos para avaliação da atividade antioxidante disponíveis, os métodos de inibição de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS) e Potencial Redutor de Ferro, realizados através do espectrofotômetro, são os mais utilizados.

3.5 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Inicialmente, a doença é assintomática, podendo evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente ao óbito (BRASIL, 2010).

Trata-se de uma parasitose que atinge diversas regiões do mundo: Américas do Sul e Central, África e Oriente Médio, estimando-se que 200.000.000 de pessoas estejam afetadas. Ovos do parasita podem se localizar na parede do intestino induzindo inflamação, fibrose e formação de granuloma no fígado causando fibrose hepática e hipertensão portal, ou podem se instalar nos pulmões, medula espinhal ou outros tecidos (PASSOS-CASTILHO et al., 2016; SADEK et al., 1986).

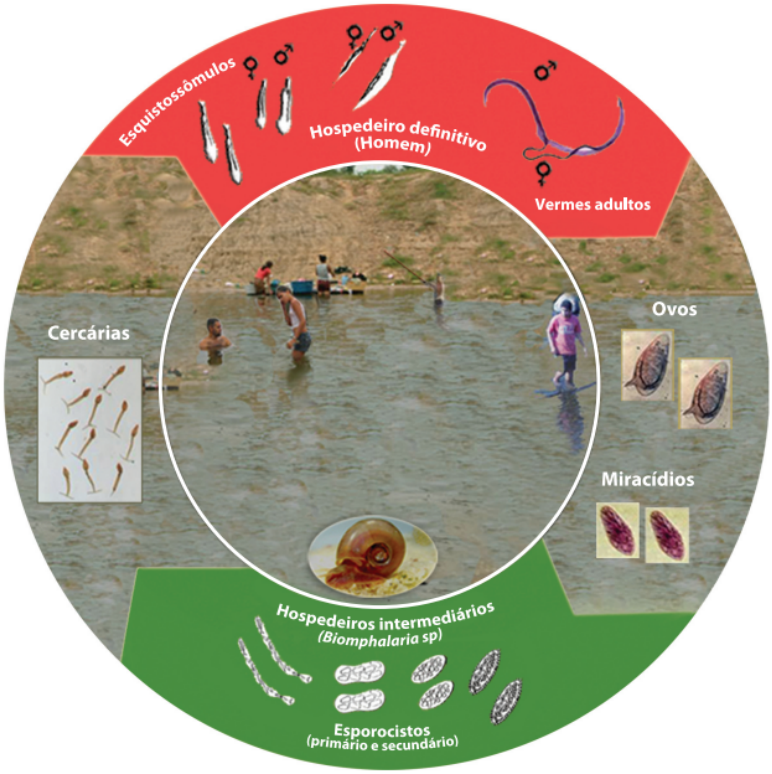
Embora possua uma baixa mortalidade, com 80% dos casos concentrados na África, a esquistossomose consta entre as enfermidades negligenciadas de maior importância após reavaliação da OMS. Consequência da espoliação crônica que acarreta aos pacientes, com comprometimento da capacidade cognitiva e de aprendizado das crianças e da força de trabalho dos adultos jovens (CARVALHO et al., 2008).

Apesar de ter tratamento, a exposição permanente dos grupos de risco aos caramujos e à água contaminada incorre na reincidência cíclica da infecção. Estima-se que 2,5 milhões de pessoas sejam portadoras da doença no Brasil. Em maio de 2012, o Ministério da Saúde adotou a resolução da Assembleia Mundial de Saúde para eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública até 2020. Em junho de 2012, a Fiocruz e o Instituto Oswaldo Cruz divulgaram a aprovação da segurança da primeira vacina contra esquistossomose na fase 1 de testes clínicos (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2012).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo, pois é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo) (Figura 6). Há, ainda, duas passagens de larvas de vida livre no meio aquático, que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias. No molusco, o ciclo é assexuado e também dura, aproximadamente, 40 dias (KATZ, ALMEIDA, 2003).

Os vermes adultos vivem nos vasos sangüíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado. O macho é de cor esbranquiçada e mede de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura. A fêmea é cilíndrica e mais fina e longa que o macho. Mede de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura. Como não apresentam órgão copulador, a cópula ocorre pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino, quando a fêmea está alojada no canal ginecóforo (KATZ, ALMEIDA, 2003).

Figura 6 - Ciclo biológico do *S. mansoni*



Fonte: (CARVALHO et al., 2008).

Neste contexto, programas de controle da esquistossomose devem ser desenvolvidos considerando-se a quimioterapia efetiva, em massa ou individual; controle do hospedeiro intermediário; redução da contaminação da água ou do contato com esta; modificação das condições de vida das populações expostas; educação para a saúde. O tratamento da doença depende da fase em que se encontra a infecção, variando desde anti-histamínicos locais e corticosteroides tópicos na fase aguda, ao uso de praziquantel e oxaminiquine na fase crônica. A principal forma de minimizar o impacto desta doença endêmica é sua profilaxia e controle com medidas que se referem a vários âmbitos da saúde pública (VITORINO et al., 2012).

A ação anti-helmíntica do praziquantel deve-se provavelmente à inibição da bomba Na+, K^+ dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Como consequência, os helmintos se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente

deslocados das veias mesentéricas para o fígado, ao passo que os helmintos intestinais são expelidos (KOROLKOVAS, 1998).

3.6 Atividade Antimicrobiana

Nos últimos anos o interesse científico em investigações químicas e farmacológicas sobre as propriedades biológicas de plantas medicinais tem ganhado ênfase. O consumo excessivo de antibióticos no mundo tem repercutido na resistência bacteriana, o que ocasionou um sério problema de saúde pública. Há o risco do retorno a era pré-antibiótica principalmente, devido à necessidade de descoberta de novos fármacos com esta finalidade. (SAÚDE-GUIMARÃES, 2007; COUTINHO, 2008).

Neste sentido, as propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas e estudadas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas recentemente (LORENZI et al., 2009; ARANA SANCHEZ et al., 2010; KARPANEN et al., 2010; BARRETO et al., 2014). O uso de plantas como fonte para medicamentos é predominante em países em desenvolvimento. Trata-se de uma solução alternativa para a terapêutica de problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE et al., 1999). No Brasil, estudos com esta finalidade são de grande importância, uma vez que plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de infecções e doenças. Vários componentes de extratos podem aumentar a permeabilidade da membrana celular, aumentando a penetração de antibióticos, principalmente compostos apolares como taninos, flavonóides e terpenos, todos com diversos relatos de atividade biológica (MATIAS, 2013).

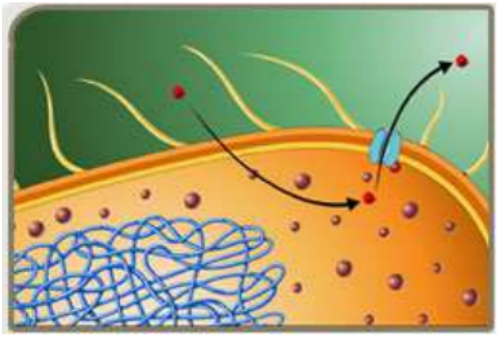
Além disso, os óleos essenciais derivados de plantas medicinais, apresentam uma característica importante dos componentes, a hidrofobicidade, que permite interagir com os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocondrial, alterando a organização das estruturas celulares, tornando-as permeáveis. O extravazamento de moléculas e íons essenciais levará a morte celular dos microrganismos. Silva et al. (2003) relata que a exposição aos antifúngicos provoca danos à membrana celular, deixando-as solúveis e com fraturas significativas, o que acabam expondo o seu conteúdo celular.

Além de aumentar a permeabilidade celular aos antibióticos, os produtos naturais podem também interferir nos sistemas enzimáticos das bactérias que estão

integrados a membrana celular, sejam eles os mecanismos de produção de energia (fosforilação oxidativa) ou sistemas de efluxo (MATIAS, 2013; WENDAKOON,1995). Estes efeitos podem ser obtidos pela combinação de antibióticos com extrato em concentração sub-inibitória aplicada diretamente ao meio de cultura (COUTINHO, 2008).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas, representadas na figura 7. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte activo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS, 2007).

Figura 7 - Representação dos mecanismos de resistência através da existência de bombas de efluxo (ANVISA, 2007).



Este mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, no entanto apresenta maior eficácia na presença de macrolideos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS, 2007).

O uso de extratos como agentes antimicrobianos demonstra um baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação, porque são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana e com isso, menor probabilidade de geração de linhagens resistentes (DAFERERA, 2003). Além da atividade antibacteriana direta, os produtos naturais têm sido estudados também como agentes moduladores da atividade antibiótica, aumentando a atividade de antibióticos contra bactérias resistentes a estas drogas (COUTINHO, 2008).

3.7 Sistema de Vetorização de fármacos utilizando ciclodextrinas

A procura por drogas mais solúveis e menos tóxicas e que trate ou previna doenças humanas tem sido objetivo de vários estudos. Entre as várias estratégias utilizadas para a inserção de novos fármacos na terapêutica, a vetorização de fármacos através de diversos sistemas mostra-se promissora. Estes consistem em operações que visam a modulação e, se possível, o direcionamento da distribuição de uma substância, associando a um sistema apropriado, denominado vetor (SABINO, 2011).

Os sistemas utilizados são de natureza variável e mais ou menos sofisticados, mas, o principio geral da vetorização é igual. Consiste em permitir que a distribuição seja a mais independente possível das propriedades da substancia em si e submetê-la às propriedades de um vetor apropriado, escolhido em função do objetivo visado (PUISIEUX; ROBLOT, 2014).

Os vetores atualmente propostos podem ser divididos em três grupos principais de acordo com suas composições, características e ação no organismo. Os de primeira geração são as microesferas e são caracterizados por liberarem uma substancia ativa no seio do alvo visado. Neste caso é necessário aplicar um modo de administração especial. Os de segunda geração são aqueles propriamente ditos, capazes de veicular o fármaco até o alvo visado, com tamanhos menores que um micrometro e que podem ser administrados por via geral; os de terceira geração reconhecem especificamente o alvo visado podendo ser obtidos por vetores de segunda geração ligados a outras moléculas capazes de dirigi-los aos sítios alvos (FALLEIROS; BRANDL; FONSECA, 2011).

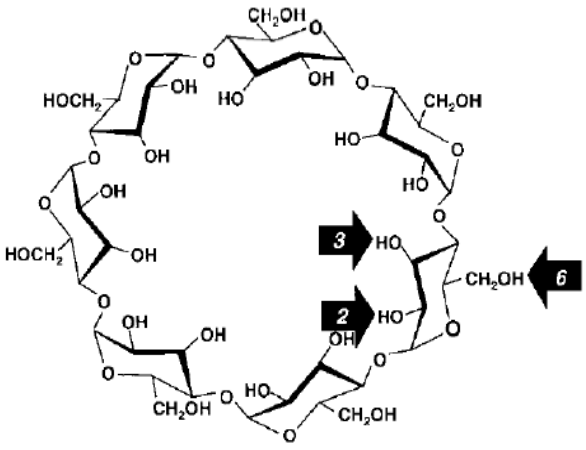
Uma formulação farmacêutica deve ter, como uma das suas principais características, a capacidade de transportar o fármaco e permitir a sua liberação no local desejado (órgão, tecido ou célula). Esta deve conseguir proteger o fármaco de possíveis degradações ao longo do seu transporte no corpo humano, desempenhando atividade farmacológica com menos efeitos adversos. A tendência terapêutica atual e do futuro será a obtenção de complexos de inclusão que atinjam um alvo bem definido, sem haver dispersão farmacológica em outros locais do organismo (FONSECA, 2011).

Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos. A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma importante característica, porque a água é o principal constituinte de toda matéria viva. A solubilidade e a ionização de fármacos na água, juntamente com o coeficiente de

partição dos fármacos entre a água e lipídios, influenciam a facilidade de passagem através de uma membrana celular, assim como transporte de um fármaco desde sua via de administração até o seu sítio de ação (MELO et al., 2007).

As ciclodextrinas são um grupo de oligossacarídeos capazes de formarem complexos de inclusão com diversos fármacos. Através desta complexação, a solubilidade de alguns fármacos hidrofóbicos pode ser melhorada sem que a estrutura da molécula seja alterada (SILVA, 2011) (Figura 8). As ciclodextrinas apresentam uma capacidade de complexação para elevado número de fármacos hidrofóbicos, está disponível em elevadas quantidades a baixo custo e o seu uso esta aprovado como excipiente para fármacos na indústria farmacêutica. As CDs têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes por aumentar a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos; eliminar odores ou sabores desagradáveis e prevenir interações entre diferentes fármacos (ARRAIS, 2012).

Figura 8 - Estrutura química da β-ciclodextrina



Fonte: ARRAIS (2012, p. 31)

Referências

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**. V.10 n.12, p. 594-602, 2005.

ALMEIDA R. N., NAVARRO D. S., BARBOSA-FILHO J. M., Plants with central analgesic activity**. Phytomedicine**, v.8, p. 310-322, 2001.

ALMEIDA, A.A.C.; DE CARVALHO, R.B.F.; DE SOUSA, D.P.; DE SOUZA, G.F.; OLIVEIRA, J.S.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda do epóxilimoneno em camundongos adultos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales,** v.19(2), p. 160-171, 2014.

ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALLANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.77, p. 361-364, 2004.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA-JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ANAYA-EUGENIO, G.D., RIVERO-CRUZ, I., BYE, R., LINARES, E., MATA, R. Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, n. 17, p. 403-411, 2016.

ANGELIS, C. D. **Avaliação da proteção gástrica e duodenal do monoterpeno nerol em roedores**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. Disponível em: < http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/91622/angelis_cd_me_botib.pdf ?sequence=1>. Acesso em: 04 Ago. 2014.

ANVISA. (2007). **Resistência Microbiana**. em Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visualizado a Setembro 20, 2016, no http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web /modulo3/mecanismos.htm

ANVISA. Resolução-rdc nº 14, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.html. Acesso em: 06 set 2016.

ARANA SANCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregan essential oils (Lippia graveolens H.B.K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**. v. 50, p. 585-590, 2010.

ARRAIS, M. A. S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona:βcd e dapsona:sbeβcd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –

Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: < http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/9a_dissertacao_monica_amaral.PDF>. Acesso em: 15 set. 2014.

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

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Glossário-Esquistossomose,** Brasília; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm? [citado 2014 jul. 1].

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; JAGER, W.; PLANK, C.; DIETRICH, H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciencies**, v.82, p. 660–664, 1993.

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 433-439, 2007.

CALO, J.R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C.A., RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARVALHO, O. S. et al. Moluscos brasileiros de importância médica. Belo Horizonte: Fiocruz, **Centro de Pesquisa René Rachou**, 2008.

DE MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A.J. (Ed.) **Current Topics in Tropical Medicine**. Rijeka: InTech, 2012, p. 333-358.

DE SOUSA D. P.; GONÇALVES J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR L.; CRUZ J. S.; ARAÚJO D. A. M.; ALMEIDA R. N., Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters,** v. 401, p. 231—235, 2006.

DE VINCENZI, M. SILANOB, M., MAIALETTI, F., SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia,** v. 71, p.725-729, 2000.

DE VINCENZI, M.; MANCINI, E.; DESSI, M.R. Monographs on botanical flavouring substances used in foods: Part V**. Fitoterapia**, v. 67, p. 241–251, 1996.

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

DOENHOFF, M.J.; SABAH, A.A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***,* v. 81, n. 6, p. 947-951, 1987.

DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. *In Press*. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661816000232. Acesso em: 13 abr 2016.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2002.

FLESCHIN, S. et al. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Romania Biotechnological Letters**, v. 5, p. 479-495, 2000.

GIOVANNINI, P., HOWES, M.J.R., EDWARDSE, S.E. Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, n. 26, p. 58–71, 2016.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: were are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p.1634-1658, 2006.

HASEGAWA, T.; TAKANO, F.; TAKATA, T.; NIIYAMA, M.; OHTA, T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry,** v. 69, p. 747–753, 2008.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

JACOBO-HERRERA, N.J., JACOBO-HERRERA, F.E., ZENTELLA-DEHESA, A., ANDRADE-CETTO,A., HEINRICH, M., PÉREZ-PLASENCIA, C. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal câncer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, n. 17, p. 391-402, 2016.

KARPANEN, T.J. et al. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 278, 2010.

KATZ, Naftale; ALMEIDA, Karina. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, Jan. 2003.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 172, n.2, p. 240-249, 2006.

KOMORI, T., FUJIWARA, R., TANIDA, M., NOMURA, J. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. **European Neuropsychopharmacology,** v. 5, p. 477–480, 1995.

KWEKA, E.J.; LIMA, T.C.; MARCIALE, C.M.; DE SOUSA, D.P. Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of *Anopheles gambiae.* **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,** v. 6 (4), p. 290–294, 2016.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, Ed. Guanabara Koogan, Edição 1997/1998, p.10.18.

LAPCZYNSKI, A., BHATIA, S.P., LETIZIA, C.S., API, A.M. Fragrance material review on 3,7-dimethyl-1-octanol. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 11, p. S139-S141, 2008.

LIU, S. et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant Candida albicans infections and insight into new antifungal agent discovery. **International journal of antimicrobial agents,** Publicado on-line em 22 de janeiro de 2014. pii: S0924-8579(14)00002-8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009, 2014.

LORENZI, M. et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 53, p. 2209-2211, 2009.

MAFUD, A.C., SILVA, M.P.N, MONTEIRO, D.C., OLIVEIRA, M.F., RESENDE, J.G., COÊLHO, M.L., SOUSA; D.P., MENDONÇA, R.Z., PINTO, P.L.S., FREITAS; R.M., MASCARENHAS, Y.P., DE MORAES, J.M. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, n. 25, p. 129-139, 2016.

MALDONADO, O.S. et al. Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates. **Tetrahedron**, v. 67, p. 7268-7279, 2011.

MARQUES, S., STEINER, A.Q., MEDEIROS, M.A. Assessing the performance of the Aichi Biodiversity Targets in Brazil: a test using two regional-scale indices related to coastal and marine ecosystem conservation. **Marine Policy**, v. 67, p. 130-138, 2016.

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

MELO, N. F. et al. Preparação e Caracterização Inicial de Complexo de Inclusão entre Nitrofurazona e 2-Hidroxipropil—Ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas**

Básica e Aplicadas. v. 28, n.1, p.35-44, 2007.

MORAES-FILHO, M.O.D. A biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos inovadores. **Parcerias Estratégicas**, v. 15, n. 31, p. 171-192, 2012.

NGUTA, J.M., APPIAH-OPONG, R., NYARKO, A. K., YEBOAH-MANU, D., ADDO, P.G.A., ISAAC OTCHERE, I., KISSI-TWUM, A. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 182, n. 22, p. 10-15, 2016.

O'CONNELL, D. Neglected diseases. **Nature**, v. 449, p.157, 2007.
OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

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

OZ, M., LOZON, Y., SULTAN, A., YANG, K.H.S., GALADARI, S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 83-97, 2015.

PASSOS-CASTILHO, A.M., DE SENA, A., DOMINGUES, A.L.C, LOPES-NETO, E.P., MEDEIROS, T.B., GRANATO, C.F.H., FERRAZ, M.L. Hepatitis E virus seroprevalence among schistosomiasis patients in Northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Available online 26 March 2016. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141386701630037X

PEIXOTO, M.G., BACCI, L., BLANK, A.F., ARAÚJO, A.P.A, ALVES, P.B., SILVA, J.H.S. SANTOS, A.A., OLIVEIRA, A.P., COSTA, A.S., ARRIGONI-BLANK, M.F. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31-36, 2015.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário das plantas**. Disponível em: http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/. Acesso em 26 jul. 2016.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011. Disponível em: < http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Dissertacao_de_Mestrado_Eliamara_Barroso_Sabino.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014.

SAITO, M., L; **As Plantas Praguicidas:** alternativa para o controle de pragas da agricultura. Jaguariúna, p. 01-05, 2004. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, p. 3–21, 2001.

SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 347-354, 1999.

SEO, S.M., KIM, J., LEE, S.G., SHIN, C.H., SHIN, S.C.; PARK, I.K. Fumigant Antitermitic Activity of Plant Essential Oils and Components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*), Caraway (*Carum carvi*), Dill (*Anethum graveolens*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), and Litsea (*Litsea cubeba*) Oils against Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* v. *57;* n. 15, p. 6596-6602, 2009.

SHI,Y.; ZHU,S.; GE, Y.; HE, Y.; KAZUMA, K.; WANG, Z.; YOSHIMATSU, K.; KOMATSU, K. Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora*. **Fitoterapia,** v. 108, p. 55–61, 2016.

SHIN, S., KANG, C.A. Antifungal activity of the essential oil of Agastache rugosa Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 111–115, 2003.

SHIN, S., PYUN, M. Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 10, p. 827–830, 2004.

SILVA, S.R.S. et al. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca alternifolia Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, p. 63-70, 2003.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC,. cap. v.18, p. 467-495, 2004.

SMITH, R.L., ADAMS, T.B., DOULL, J., FERON, V.J., GOODMAN, J.I., MARNETT, L.J., PORTOGHESE, P.S., WADDELLH, W.J., WAGNER, B.M., ROGERS, A.E., CALDWELL, J., SIPES, I.G. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances — methyl eugenol and estragole. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 851–870, 2002.

SOLAR, R.R.C., BARLOW, J., ANDERSEN, A.N., SCHOEREDER, J.H., BERENGUER, E., FERREIRA, J.N., GARDNER, T.A. Biodiversity consequences of

land-use change and forest disturbance in the Amazon: A multi-scale assessment using ant communities. **Biological Conservation**, v. 197, p. 98-107, 2016.

SOUTO-MAIOR, F.N.; DE CARVALHO, F.L.; DE MORAIS, L.C.S.L.; NETTO, S.M.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 100, p. 259-263, 2011.

UD-DAULA, A.F.M.S., DEMIRCI, F., ABU SALIM, K., DEMIRCI, B., LIM, L.B.L., BASER, K.H.C., AHMAD, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of Etlingera fimbriobracteata (K.Schum.) R.M.Sm.. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 189-198, 2016.

UMEZU, T. Anticonflict effects of plant-derived essential oils. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 64, p. 35-40, 1999.

VELLOSA, J.C. R. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidative. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p.305-312, 2013.

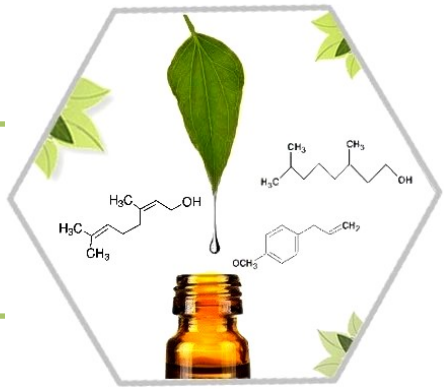
VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 52, p. 253-262, 2000.

VITORINO, R.R.V.; SOUZA, F.P.C.; COSTA, A.P.; FARIA JÚNIOR, F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Bras Clin Med**. v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

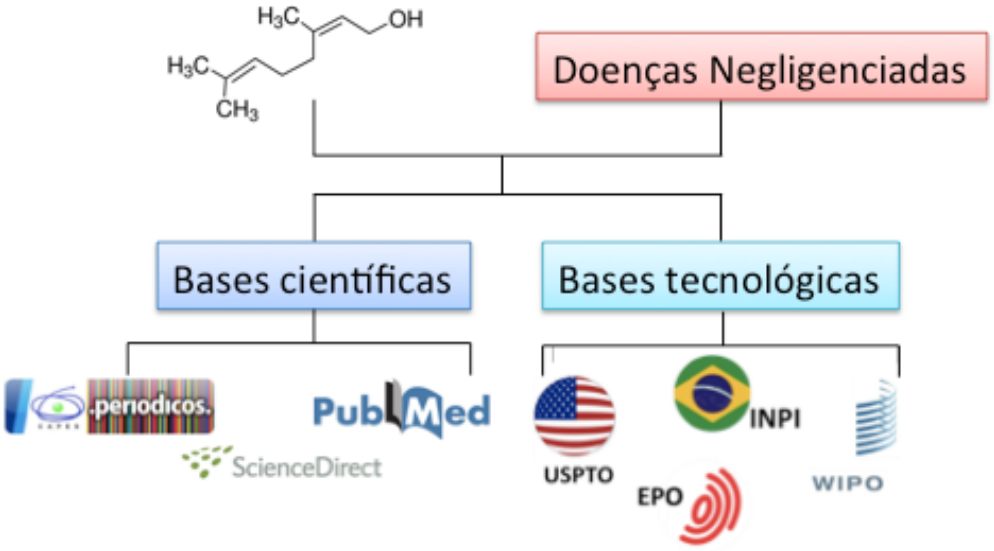
WORLD HEALTH ORGANIZATION: **New WHO guidelines to promote proper use in alternative medicines**. Geneva: WHO, 2004.

XIE, Y.; WANG, K.; HUANG, Q.; LEI, C. Evaluation toxicity of monoterpenes to subterranean termite, *Reticulitermes chinensis* Snyder. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p.163–166, 2014.

Capítulo I



Capítulo I - Aplicações de monoterpenos para o tratamento de doenças negligenciadas: Um estudo prospectivo do nerol



(Artigo aceito – International Archives of Medicine – Qualis B2 – Biotecnologia; Apêndice A)

Capítulo I - Aplicações de monoterpenos para o tratamento de doenças negligenciadas: Um estudo prospectivo do nerol

Resumo

Monoterpenos ocorrem naturalmente em óleos essenciais de várias espécies de plantas e têm uma grande variedade de atividades biológicas. As atenções sobre os compostos naturais, especialmente aqueles que são derivado de plantas, crescem diariamente. O Nerol, um monoterpeno com importantes atividades biológicas, juntamente com suas outras aplicações, pode ser uma ferramenta promissora neste contexto. Ao considerar as circunstâncias acima referidas, o presente estudo teve como objetivo realizar um estudo prospectivo científico e tecnológico sobre este monoterpeno, com ênfase no tratamento de doenças negligenciadas, juntamente com outros monoterpenos. Foi realizada uma pesquisa abrangente e sistemática dos artigos publicados da CAPES, *ScienceDirect* e Pubmed, enquanto para busca de patentes, utilizou-se da base do Instituto Nacional da Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)* e *United States Patent* and *Trademark Office (USPTO)*. Os resultados sugeriram que os monoterpenos têm potenciais terapêuticos contra malária, dengue, esquistossomose, tuberculose, leprose, leishmaniose e doença de Chagas. Especialmente, o nerol tem potencial anti-tuberculose. Em conclusão, mais pesquisas são recomendadas com nerol no contexto do tratamento de doenças negligenciadas.

Palavras-chave: monoterpenos; nerol; doenças negligenciadas.

Abstract

Monoterpenes are naturally occurred essential oils in various plant species having a wide range of biological activities. Attentions on the natural compounds, especially those are plant-derived is growing day by day. Nerol, a monoterpene having some important biological activities along with its other applications, may be a hopeful tool in this context. By considering the above circumstances, this study aimed to perform a scientific and technological prospective study on this charming monoterpene with an emphasis on the treatment of neglected diseases along with other monoterpenes. We conducted a comprehensive and systematic search for published articles, periodicals,

magazines in the *CAPES, ScienceDirect* and *Pubmed,* while for patents we have gone through search in *National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI)*, *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)* and *United States Patent* and *Trademark Office (USPTO)*. Results suggesting monoterpenes have therapeutic potentials against malaria, dengue, schistosomiasis, tuberculosis, leprosies, leishmaniasis and chagas diseases. Nerol has anti-tuberculosis potential. In conclusion, more researches are recommenced with nerol in a context of treatment of neglected diseases.

Keywords: monoterpene; nerol; neglected diseases.

1. Introdução

Hoje em dia, os produtos naturais têm grande atenção para o tratamento de várias doenças (MARQUES et al., 2013). Dentre eles, os ólesos essenciais têm merecido especial importância por apresentarem promissora terapêutica, sendo considerados como ferramentas de promoção da saúde. Monoterpenos, uma classe de terpenos obtidos de OE são evidenciados para um relevante número de atividades biológicas (CRAVEIRO, MACHADO, 1986; COWAN, 1999).

O nerol (*cis*-2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol) é um monoterpeno com potencial atividades biológicas em vários sistemas testes *in vitro* e *in vivo* (MARQUES et al., 2013). Sua ação é reportada no sistema nervosa central (SNC), como antidepressiva, ansiolítica, antinociceptiva e anticonvulsivante, além de apresentar atividades antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e anti-helmíntico (NOGUEIRA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014; COSTA et al., 2014; SILVA et al., 2014). Deve-se mencionar também que o nerol é encontrado em várias plantas medicinais, as quais são reportadas na literatura com atividades antioxidante, antimicrobiana e neuroprotetiva (ALLAHVERDIYEV et al., 2004; ESCOBAR et al., 2010; KENNEDY et al., 2013). Além disso, o nerol é usado como fragrância em cosméticos e produtos de limpeza (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Neste sentido, substâncias de ocorrência natural revelam-se como alternativas terapêuticas para doenças negligenciadas (DN), que são um grupo de patologias que representam risco de morte a mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo (WHO,

2016). A maioria dos afetados são as populações pobres de áreas rurais remotas, favelas urbanas, ou zonas de conflito, muitas vezes em regiões pouco desenvolvidas. Essas doenças não só afetam diretamente a saúde, mas representam um ciclo vicioso de eventos socioeconômicos que reforçam o *feedback* sobre o outro que conduz para inescapável pobreza de um número considerável da população (ANDRADE, 2015). É importante salientar que as terapias existentes para as DNs são em grande parte baseadas em drogas com toxicidade e propensas a efeitos secundários graves, e, este panorama, leva a busca de novos agentes com mais eficácia e segurança (WHO, 2016).

Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática do ponto de vista científico e tecnológico em monoterpenos com as aplicações para as DNs subjacentes, com atenção especial para o nerol.

2. Materiais e métodos

Os artigos foram pesquisados em bancos de dados dos Periódicos da CAPES (http://www.periodicos.capes.gov.br), *Science Direct* (http://www.sciencedirect.com) e *PubMed* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Os artigos encontrados em mais de uma base de dados não foram contabilidados em duplicidade. A busca de patentes foi realizada na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e *United States Patent and Trademark Office* (USPTO). Evidências contendo mesmas informações foram substituídas pelo documento mais recente.

A pesquisa (até novembro de 2015) foi realizada com as palavras chave ‘monoterpenes’, ‘nerol’ e foram pareadas com ‘neglected diseases’, ‘malaria’, ‘leprosy’, ‘leishmaniasis’, ‘dengue’, ‘chagas disease’, ‘tuberculosis’ and ‘schistosomiasis’. Não foram impostas restrições de linguagem.

3. Resultados e Discussão

3.1. Resultados científicos e tecnológicos

Nas buscas por artigo, períodicos e revistas, foram encontrados 57 periódicos e 98 artigos com abordagem para monoterpenos, nas bases eletrônicas utilizadas.

Enquanto o *ScienceDirect* representou 61,29% dos achados, o portal da CAPES e Pubmed ficaram com 36,77% e 1,94%, respectivamente. Dentre as 213 evidências, 66,19% dos artigos pertencem ao banco de dados SD, 27,23% ao periódicos CAPES e 6,57% dos artigos ao PubMed (PM), respectivamente. No entanto, as patentes procuradas as bases de dados, demonstraram que a WIPO constitui 47,06% dos achados, seguido por 41,18% e 11,76% no EPO e INPI, respectivamente para monoterpenos. Nenhuma patente foi encontrada no USPTO. Por outro lado, o nerol faz parte de 76 documentos de patentes, entre as quais 98,68% pertencem à USPTO, enquanto a base de dados WIPO representou apenas 1,32% das patentes encontradas. Não foram encontradas patentes na base de dados brasileira INPI e na européia EPO (Tabela 1).

Tabela 1. Evidências em bases de dados eletrônicas de monoterpenos e nerol em doenças negligenciadas (após triagem).

Substâncias	**Artigos, periódicos e revistas**			**Patentes**			
	CAPES	*PM*	*SD*	*INPI*	*EPO*	*USPTO*	*WIPO*
Monoterpenos	57	3	95	2	7	0	8
Nerol	58	14	141	0	0	75	1

PM: PubMed; SD: ScienceDirect; INPI: Instituto National de Propriedade Industrial do Brasil; EPO: *European Patent Office*; WIPO: *World Intellectual Property Organization*; USPTO: *United States Patent and Trademark Office*

Os resultados da Tabela 2 sugerem que as evidências (periódicos, revistas e artigos) em malária (41,11 %) são promissores para o nerol, seguidos então pelo achados em tuberculose (25,89 %), dengue (8,12 %) = hanseníase (8,12 %), esquistossomose (6,59 %) e leishmaniose (5,08 %) = Doença de chagas (5,08 %), respectivamente. Mais evidências foram encontradas no ScienceDirect, as quais foram seguidas em ordem por portal da Capes e PubMed. A busca de patentes foi relacionada na seguinte ordem de achados, malaria (30,00 %) > leishmaniose (22,50 %) > tuberculose (20,00 %) > dengue (15,00 %) > hanseníase (7,50 %) > esquistossomose (5,00 %) > Doença de chagas (0,00 %). A maioria dos documentos patentários encontrados estavam depositados na base USPTO (98,75 %), enquanto o WIPO

representou 1,25 % dos achados. Não foram encontradas patentes nas bases de dados do INPI e EPO.

Tabela 2. Evidências em bases de dados de aplicação do nerol em doenças negligenciadas.

DNs	**Artigos, periódicos e revistas**			**Patentes**			
	CAPES	*PM*	*SD*	*INPI*	*EPO*	*USPTO*	*WIPO*
Malária	38	2	45	0	0	23	1
Dengue	7	2	7	0	0	12	0
Schistosomose	0	3	10	0	0	4	0
Tuberculose	3	2	48	0	0	16	0
Hanseníase	0	0	16	0	0	6	0
Leishmaniose	0	1	9	0	0	18	0
Doença de Chagas	0	4	6	0	0	0	0

PM: PubMed; SD: ScienceDirect; INPI: Instituto National de Propriedade Industrial do Brasil; EPO: *European Patent Office*; WIPO: *World Intellectual Property Organization*; USPTO: *United States Patent and Trademark Office*

A Figura 1 mostra que Israel é o maior proprietário de patentes (31,06 %) em DNs, as que foram seguidos por AW > US > CA > MA = NL = PA > AT = IN = LU > BS = FG = GA = IT = JP = ML = NO = UY, respectivamente.

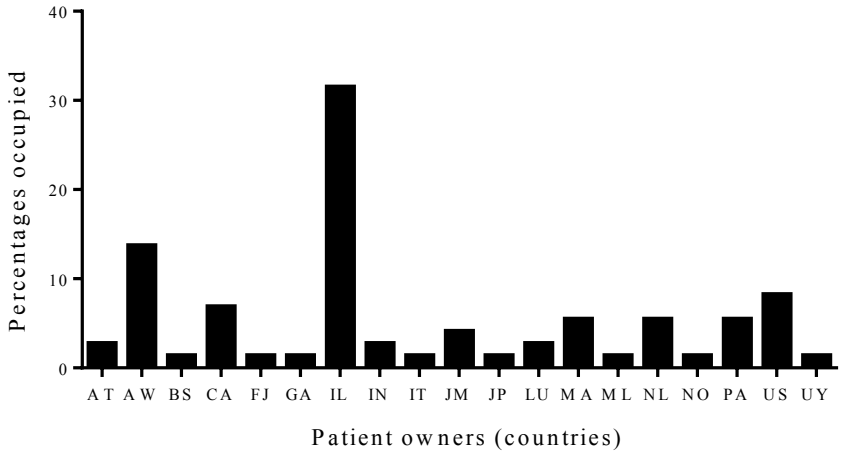


Figura 1. Patentes depositadas em doenças negligencias de acordo com o percentual ocupado pelos países de depósito [AW = Aruba; BS= Bahamas; CA = Canadá; FJ= Fiji; GA= Gabon; GB= Reino Unido; IL = Israel; IN = Índia; IT= Itália; JM= Jamaica; JP= Japão; LU= Luxemburgo; MA= Marrocos; ML= Mali; NL = Holanda; NO= Noruega; PA= Panamá; US= Estados Unidos; UY = Uruguai]

Uma análise temporal demonstra que as patentes que foram encontradas de 1992 a 2014 mostram nos anos de 2004, 2009 e 2013 achados de 8 documentos de patente em cada ano, seguidos pelos anos de 2010 (7) > 2007 (6) > 2003 (5) = 2006 (5) > 2000 (4) = 2001 (4) = 2012 (4) > 1997 (3) = 2002 (3) = 2014 (3) > 1992 (1) = 1994 (1) = 1995 (1) = 1999 (1) = 2011 (1), respectivamente.

3.2. Resultados em Doenças Negligencidas (DNs)

3.2.1. Atividade anti-malária

Os terpenos são potenciais alternativas de atividade antimalárica (Parshikov et al., 2012). Extrato clorofórmico de frutas de *Couroupita guianensis* foi relatado com ação contra uma série de microorganismos patogênicos, incluindo micobactérias. Ele também inibiu significativamente a formação de biofilme dos agentes patogênicos (AL-DABI et al., 2012). O óleo essencial obtido do extrato de folhas de *Plinia cerrocampanensis* foi relatado com significativa atividade antimalárica (DURANT et al., 2014). Kpoviessi e colaboradores (2014) descobriram que o óleo essencial do gênero *Cymbopogon* apresentou potencial atividade contra *Trypanosoma brucei e Plasmodium falciparum*. Óleos essenciais obtidos a partir de *Lippia multiflora* também evidenciaram ação contra *Plasmodium falciparum* (VALENTIN et al., 1995). O extrato etanólico de *Ocimum sanctum* também demonstrou capacidade antimalárica (ARCHANA, NAMASIVAYAM, 2000). Além disso, o geraniol, isômero trans do nerol, demonstrou em modelo *in vivo* atividade anti-malária (SINGH et al., 2003). Parshikov e colaboradores (2012), também introduziram alguns novos terpenos com atividade anti-malária. Um número de OE derivados de plantas, incluindo monoterpenos foram descobertos com potencial atividade repelente de mosquitos por Pohlitet e colaboradores (2011). Vale ressaltar ainda que as nanocápsulas preparadas com onopordopicrina, um sesquiterpeno, apresentaram atividade significativa contra a malária (ESMAEILI et al., 2012).

3.2.2. Atividade contra dengue

Conti e colaboradores (2010) reportaram que as larvas de *Aedes albopictus* são suscetíveis aos óleos essenciais de *Achillea millefolium, Lavandula angustifolia,*

Helichrysum italicum, Foeniculum vulgare, Myrtus communis e *Rosmarinus officinalis*. OEs de folhas de *Salvia dorisiana*, *S. longifolia*, and *S. sclarea* da família Lamiaceae, exibiram potente atividade anti-*A. albopictus* (CONTI et al., 2012). Adicionalmente, OEs de *Citrus sinensis*, *C. limon* e *C. paraíso* e seus componenetes foram relatados com potencial atividade larvicida contra um número considerável de mosquistos (GIATROPOULOS et al., 2012). Pohlit e colaboradores (2011) fizeram uma revisão demonstrando que os OEs tem promissora capacidade repelente.

Uma pesquisa conduzida por Pandey e colcaboradores (2013) atribuiu significante atividade contra *A. aegypti* para o acetatto de eugenil, acetate de linalil, acetate de terpinil, acetate de mentil, acetate de geranil juntamente com os monoterpenos eugenol, linalool, terpineol, L-mentol e geraniol, com um valor de LC_{50} entre 50.2 a 415 ppm. A pesquisa feita por Nyasembe e colaboradores (2014) mostra que compostos fitoquímicos voláteis podem ser boas opções como repelente de mosquisto.

3.2.3. Atividade esquistossomicida

Mors e colaboradores (1967) mostraram que o trans (-)-14,15-epoxigeranil-geraniol tem potencial atividade esquistossomicida. Timol, β-citronelol, carvacrol e geraniol inibem fortemente o vetor do *Schistosoma mansoni* (RADWAN et al., 2008). OEs isolados a partir de *Cymbopogon winterianus* exibiram significativa atividade esquistossomicida com valores de LC_{50} entre 22,0 and 181,0 mg/L (RODRIGUES et al., 2013).

3.2.4. Potencial anti-tuberculose

Os OEs de frutas de *C. guianensis* tiveram ação relatada contra *Mycobacterium tuberculosis* (AL-DHABI et al., 2012). Neste sentido, Kumar e colaboradores (2013) observaram que os extratos de *Plumeria bicolor* inibem significativamnete o crescimento *M. tuberculosis*, bem como de cepas de *M. tuberculosis* mutiressistentes. Juntamente com o nerol, plumericina e isoplumericina foram citados como potenciais candidatos a atividade anti-tuberculose. A atividade anti-tuberculose de OEs também foi observada por Kumar e colaboradores (2013) com extratos de *Plumeria bicolor*. Vale ressaltar que o ácido *meso*-dihidroguaiarético também apresentou potencial anti-*M.*

tuberculosis (CLEMENTE-SOTO et al., 2014). De acordo com Chinsembu (2015), OEs são uma alternativa potencial com atividade anti-tuberculose.

3.2.5. Atividade contra hanseníase

Ross (1949) sugeriu que o timol (um monoterpeno fenólico natural derivado do cimeno) tem atividade contra hanseníase. Em 1955, Floch e Gelard também demonstraram atividade semelhante.

3.2.6. Potencial atividade leishmanicida e contra Doença de Chagas

Os monoterpenos com este tipo de atividade ainda estão sendo investigados, a despeito de um grande número de plantas medicinais com potencial atividade leishmanicida (ROCHA et al., 2005; MEDEIROS et al., 2011; ROHLOFF et al., 2013; MELO et al., 2013; SINGH et al., 2014; BAHMANI et al., 2015; DEMARCHI et al., 2015; BOSQUIROLI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015). Saponinas obtidas a partir de *Calliandra pulcherrima* e *Quillaja saponaria* foram relatadas com atividade leishmanicida significante contra as espécies *Leishmania donovani* e *L. chagasi* (NICO et al., 2007). Dois monoterpenos, minutin A e B extraídos e purificados de folhas de *Micromelum minutum* demonstraram ação contra *Leishmania major* com valores de IC_{50} entre 9,8 a 26,2 μM (SAKUNPAK et al., 2013). OEs de *Thymus capitellatus tem capacidade evidente contra* leishmaniose com os valores de IC_{50} *entre* 35 a 62 μg/mL (MACHADO et al., 2014). De outra forma, Morais e colaboradores (2014) encontraram alguns derivados de timol e eugenol com atividade leishmanicida potente.

4. Conclusão

Resultados consistentes obtidos apontam para o número significativo de trabalhos científicos e depósitos de patentes envolvendo o monoterpeno nerol. Contudo, quando o relaciona às doenças negligenciadas há uma deficiência no número de publicações específicas, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas neste campo e o potencial desta substância para estudos inéditos neste sentido.

5. Referências

AL-DHABI, N. A., BALACHANDRAN, C., RAJ, M.K., DURAIPANDIYAN, V., MUTHUKUMAR, C., IGNACIMUTHU, S., ALI KHAN, I., RAJPUT, V. S. Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 242, 2012.

ALLAHVERDIYEV, A., et al. Antiviral activity of the volatile oils of Melissa officinalis L. against Herpes simplex virus type-2. **Phytomedicine**, v. 11, p. 657-66, 2004.

ALMEIDA, A. A. C. et al. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 118, p. 69-78, 2014.

ANDRADE, B. L. ALVES; ROCHA, D. G. Neglected diseases, and bioethics: dialogue of an old problem with a new area of knowledge. **Revista Bioética**, v. 23, n. 1, p. 105-113, 2015.

ARCHANA, R., NAMASIVAYAM, A. Effect of *Ocimum sanctum* on noise induced changes in neutrophil functions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 81-5, 2000.

BAHMANI, M., SAKI, K., EZATPOUR, B., SHAHSAVARI, S., EFTEKHARI, Z., JELODARI, M., RAFIEIAN-KOPAEI, M., SEPAHVAND, R. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 695-701, 2015.

BOSQUIROLI, L. S. S., DEMARQUE, D. P., RIZK, Y. S., CUNHA, M. C., MARQUES, M. C. S., MATOS, M. F. C., KADRI, M. C. T., CAROLLO, C. A., ARRUDA, C. C. P. *In vitro* anti-*Leishmania infantum* activity of essential oil from *Piper angustifolium*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 124-128, 2015.

CHINSEMBU, K. C. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. **Acta Tropica**, v. 153, p. 46-56, 2016.

CLEMENTE-SOTO, A. F., BALDERAS-RENTERÍA, I., RIVERA, G., SEGURA-CABRERA, A., GARZA-GONZÁLEZ, E., CAMACHO-CORONA, M. R. Potential Mechanism of Action of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid on*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20170-20182, 2014.

CONTI, B., BENELLI, G., LEONARDI, M., AFIFI, F. U., CERVELLI, C., PROFETI, R., PISTELLI, L., CANALE, A. Repellent effect of *Salvia dorisiana, S. longifolia*, and *S. sclarea* (Lamiaceae) essential oils against the mosquito *Aedes albopictus Skuse* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p 291-9, 2012.

CONTI, B., CANALE, A., BERTOLI, A., GOZZINI, F., PISTELLI, L. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1455-61, 2010.

COSTA, J. P., et al. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 547, p. 34-42, 2014.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CRAVEIRO, A. A., MACHADO, M. I. L. Aromas, insetos e plantas. **Science Today**, v. 23, p. 54, 1986.

DEMARCHI, I. G., THOMAZELLA, M. V., TERRON, M. S., LOPES, L., GAZIM, Z. C., CORTEZ, D. A. G., DONATTI, L., ARISTIDES, S. M. A., SILVEIRA, T. G. V., LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128-137, 2015.

DURANT, A. A., RODRÍGUEZ, C., HERRERA, L., ALMANZA, A., SANTANA, A. I., SPADAFORA, C., GUPTA, M. P. Anti-malarial activity and HS-SPME-GC-MS chemical profiling of *Plinia cerrocampanensis* leaf essential oil. Malaria Journal, v. 13, p. 13-18, 2014.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. **Memories of the Oswaldo Cruz Institute**, v. 105, p. 184-190, 2010.

ESMAEILI, A., SAREMNIA, B. Preparation of extract-loaded nanocapsules from *Onopordon leptolepis* DC. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 1, p. 259-263, 2012.

FLOCH, H., GELARD, A. Mechanism of action of sulfones in leprosy. IX. Mechanism of action of thymol derivatives of sulfone (silver or non-silver salts) administered orally. **Publ Inst Pasteur Guyane Fr Inini**, v. 16, n. 357, p. 1-11, 1955.

GIATROPOULOS, A., PAPACHRISTOS, D. P., KIMBARIS, A., KOLIOPOULOS, G., POLISSIOU, M. G., EMMANOUEL, N., MICHAELAKIS, A. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2253-63, 2012.

KENNEDY, D. et al. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of Melissa office- nalis (lemon balm) with human CNS nicotinic and mus-carinic receptor-binding properties. **Neuropsycho pharmacology**, v. 28, p. 1871-188, 2003.

KPOVIESSI, S., BERO, J., AGBANI, P., GBAGUIDI, F., KPADONOU-KPOVIESSI, B., SINSIN, B., ACCROMBESSI, G., FRÉDÉRICH, M., MOUDACHIROU, M., QUETIN-LECLERCQ, J. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-9, 2014.

KUMAR, P., SINGH, A., SHARMA, U., SINGH, D., DOBHAL, M.P., SINGH, S. Anti-mycobacterial activity of plumericin and isoplumericin against MDR Mycobacterium tuberculosis. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 332-5, 2013.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on nerol. **Food and Chemical Toxicology**, v.8, p.241-244, 2008.

MACHADO, M., DINIS, A.M., SANTOS-ROSA, M., ALVES, V., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., SOUSA, M.C. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 39-49, 2014.

MARQUES, T. H. C., et al. Evaluation of the neuropharmacological properties of nerol in mice. **World Journal of Neuroscience**, v.3, p. 32-38, 2013.

MEDEIROS, M.G.F., SILVA, A.C., CITÓ, A.M.G.L., BORGES, A.R., LIMA, S.G., LOPES, J.A.D., FIGUEIREDO, R.C.B.Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, n. 3, p. 237-241, 2011.

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

MORAIS, S.M., VILA-NOVA, N.S., BEVILAQUA, C.M.L., RONDON, F.C., LOBO, C.H., MOURA, A.A.A.N., SALES, A.D., RODRIGUES, A.P.R., FIGUEREIDO, J.R., CAMPELLO, C.C., WILSON, M.E., ANDRADE, J.R. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6250-6255, 2014.

MORS, W. B., DOS SANTOS FILHO, M.F., MONTEIRO, H.J., GILBERT, B., PELLEGRINO, J. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. **Science**, v. 25, n. 157, p. 950-1, 1967.

NICO, D., SANTOS, F.N., BORJA-CABRERA, G.P., PALATNIK, M., PALATNIK DE SOUSA, C.B. Assessment of the monoterpene, glycidic and triterpene-moieties' contributions to the adjuvant function of the CP05 saponin of *Calliandra pulcherrima*. Benth during vaccination against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 4, p. 649-658, 2007.

NOGUEIRA NETO, J.D. et al. Evaluation of antioxidant potential in vitro of nerolidol. **Journal of Pharmaceutical Sciences Basic and Applied**, v. 34, p. 125-130, 2013.

NYASEMBE, V.O., TORTO, B. Volatile phytochemicals as mosquito semiochemicals. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p.196-201, 2014.

PANDEY, S.K., TANDON, S., AHMAD, A., SINGH, A.K., TRIPATHI, A.K. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235-8, 2013.

PARSHIKOV, I.A., NETRUSOV, A.I., SUTHERLAND, J.B. Microbial transformation of antimalarial terpenoids. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1516-1523, 2012.

POHLIT, A.M., LOPES, N.P., GAMA, R.A., TADEI, W.P., NETO, V.F. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils--a review. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 598-617, 2011.

RADWAN, M.A., EL-ZEMITY, S.R., MOHAMED, S.A., SHERBY, S.M. Potential of some monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against Schistosomiasis snail vector, Biomphalaria alexandrina. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 889-94, 2008.

ROCHA, L.G., ALMEIDA, J.R.G.S., MACÊDO, R.O., BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6–7, p. 514-535, 2005.

RODRIGUES, K.A., DIAS, C.N., DO AMARAL, F.M., MORAES, D.F., MOUCHREK FILHO, V.E., ANDRADE, E.H., MAIA, J.G. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of Cymbopogon winterianus. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 10, p. 1293-7, 2013.

RODRIGUES, K.A.F., AMORIM, L.V., DIAS, C.N., MORAES, D.F.C., CARNEIRO, S.M.P., CARVALHO, F.A.A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent *α*-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, n. 3, p. 32-40, 2015.

ROHLOFF, J., HYMETE, A., TARIKU, Y. Chapter 11 - Plant-Derived Natural Products for the Treatment of Leishmaniasis. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 39, p. 381-429, 2013.

ROSS, H. The thymol turbidity and cephalin-cholesterol tests, euglobulin, albumin-globulin ratio and serology in leprosy. 1949.

SILVA, M. P. N., OLIVEIRA, G.L., DE CARVALHO, R.B., DE SOUSA, D.P., FREITAS, R.M., PINTO, P.L., DE MORAES, J. Antischistosomal Activity of the TerpeneNerolidol. **Molecules**, v. 19, p. 3793-3803, 2014.

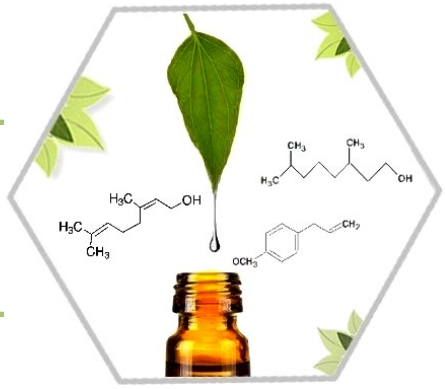
SINGH, C., GUPTA, N., PURI, S.K. Geraniol-derived 1,2,4-trioxanes with potent in-vivo antimalarial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 20, p. 3447–3450, 2003.

SINGH, N., MISHRA, B.D., BAJPAI, S., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.

VALENTIN, A., PÉLISSIER, Y., BENOIT, F., MARION, C., KONE, D., MALLIE, M., BASTIDE, J.M., BESSIÈRE, J.M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1439-42, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases. Accesso em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

Capítulo II



Capítulo 2 - Formulações farmacêuticas contendo monoterpenos: uma prospecção tecnológica



Artigo publicado - Revista Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias – Qualis B4 – Biotecnologia.

Capítulo II - Formulações farmacêuticas contendo monoterpenos: uma prospecção tecnológica

Resumo

Atualmente, a busca de novos produtos farmacêuticos à base de plantas revela uma alternativa ao desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. Nesse sentido, os monoterpenos são hidrocarbonetos derivados de plantas medicinais que já possuem diversos estudos sobre suas propriedades farmacológicas. O objetivo desse trabalho foi realizar uma prospecção tecnológica de formulações monoterpênicas, analisando a participação do país e o estado da arte nos depósitos de pedidos de patentes em bases nacionais e internacionais até o momento. Para isso, a prospecção foi realizada no Banco Europeu de Patentes, no banco da Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Banco Americano de Marcas e Patentes e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil. As classificações internacionais mais abundantes nessa prospecção foram A01N, A61K e C09D. O maior número de patentes foi depositado nos últimos 10 anos. A China é o país com maior número de patentes já depositadas.

Palavras-chave: formulação; monoterpeno; prospecção.

Abstract

Currently, the search for new herbal pharmaceutical products reveals an alternative to developing the national pharmaceutical industry. In this sense, monoterpenes are hydrocarbons derived from medicinal plants which already have several studies about its pharmacological properties. This work aimed perform a technologic prospection of monoterpenic formulations, analyzing the country's participation and the state of the art in the filings of patents in international bases yet. This way, prospection was performed on European Patents Office, on World Intellectual Property Organization, on United States Patent and Trademark Office and on Institute of Industrial Property of Brazil database. The most abundant international classifications on this prospection were A01N, A61K e C09D. The largest number of patents was filed in the last 10 years. China is the country with highest number of patents already filed.

Key-words: formulation; monoterpene; prospection.

1. Introdução

O presente trabalho relata o estágio de desenvolvimento tecnológico e científico da utilização de monoterpenos em formulações farmacêuticas. Monoterpenos são os principais componentes das resinas (cola ou goma das árvores), podendo compor os óleos essenciais. Essas substâncias são produzidas e emitidas pelas folhas de árvores e possuem propriedades de grande interesse médico, dentre elas antimicóticas, cardiovasculares, antihelmínticas, antibióticas e anti-inflamatórias (BELANGER, 1998; FERNANDES et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

Apesar do uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações, constituindo um recurso alternativo de grande aceitação (SANTOS et al., 2008). Entretanto, a total aceitação de drogas derivadas de plantas e a fitoterapia na medicina científica poderão ocorrer somente se estes produtos cumprirem os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade que os produtos sintéticos (RATES, 2001), já que os produtos derivados de plantas devem ter eficácia avaliada e confirmada, assim, como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para sua saúde (BRASIL, 2010).

No contexto social moderno, algumas limitações atuais do uso de medicamentos, como altos custos de alguns produtos disponíveis no mercado, favorecem o retorno ao estudo de plantas com propriedades medicinais para o controle de diversas doenças (HAMMOND et al., 1997). As necessidades do mercado farmacêutico aliadas ao reconhecimento de que pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novas drogas levaram a um aumento do número de publicações neste campo, em virtude do reconhecimento da importância desta área de estudo por parte das instituições privadas ou governamentais (RATES, 2001).

2. Metodologia

No presente trabalho, a prospecção foi baseada na pesquisa de patentes nas bases de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), no *United States Patente and Trademark Office* (USPTO) e na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), utilizando as palavras-chaves *formulation* ou formulação, *monoterpene* ou monoterpeno e *formulation and monoterpene* ou formulação *and* monoterpeno.

A pesquisa de patentes foi realizada em abril de 2013. Foram analisados todos os pedidos de patentes existentes entre 1984 (ano do primeiro depósito) até o presente momento.

3. Resultados e Discussão

A prospecção tecnológica foi utilizada como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos, os quais são capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2012, p. 505; SERAFINI et al., 2012, p. 427).

Primeiramente, foi avaliado o número de pedidos de patentes depositados por base de dados de acordo com os termos utilizados (Tabela 1). Foram encontrados muitos documentos envolvendo os termos monoterpeno ou *monoterpene*, principalmente nas bases EPO (570) e WIPO (382). O mesmo foi observado com o termo formulação ou *formulation*, com 54813 documentos na WIPO e 77226 documentos na EPO. Entretanto, quando confrontados os termos *monoterpene* and *formulation* e monoterpeno e formulação, pode ser observado que o número de pedidos de patentes depositados é bastante reduzido (Tabela 1), o EPO possui 11 pedidos, enquanto que a WIPO possui 5. Além disso, nenhum pedido de patente está depositado no INPI.

Tabela 1 - Número de patentes depositadas por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados.

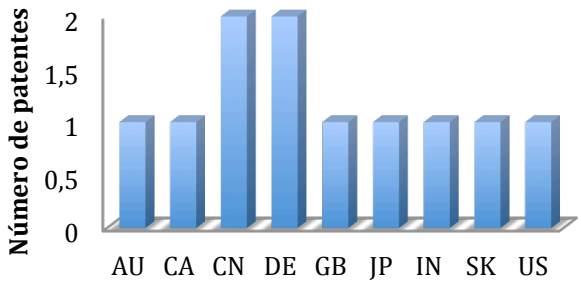
Palavra-chave	INPI	EPO	USPTO	WIPO
Monoterpene ou monoterpeno	10	570	6	382
Formulation ou formulação	6436	77226	1432	54813
Monoterpene and formulation ou monoterpeno e formulação	0	11	1	5

Considerando que as bases do EPO e WIPO possuíam um número maior de patentes depositadas envolvendo o termo *monoterpene and formulation*, a pesquisa foi conduzida no sentido de explorar melhor as informações que essas bases pudessem fornecer a respeito da distribuição de patentes por país, ano de depósito e por Classificação Internacional de Patente (CIP).

3.1. Patentes depositadas no EPO

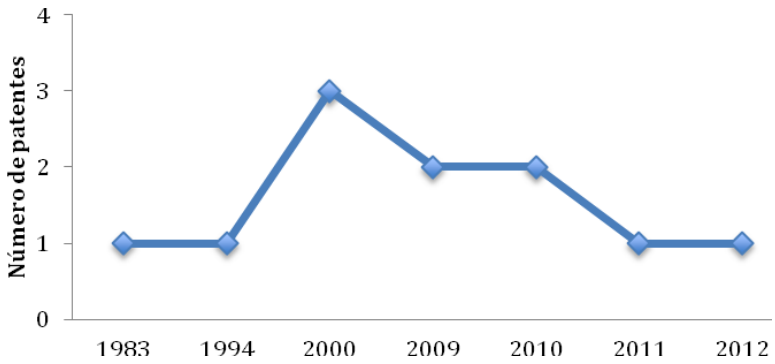
De acordo com a Figura 2, a China e a Alemanha são os maiores detentores de patentes envolvendo formulações monoterpênicas. Não há registro de depósito de patente por nenhuma patente brasileira e apenas uma patente australiana, países detentores das maiores biodiversidades de plantas, do qual se esperava mais registros de produtos desenvolvidos a partir de plantas medicinais.

Figura 1 – Número de patentes depositadas na base europeia por país, sendo AU (Austrália), CA (Canadá), CN (China), DE (Alemanha), GB (Reino Unido), JP (Japão), IN (Índia), SK (Eslováquia) e US (Estados Unidos da América).



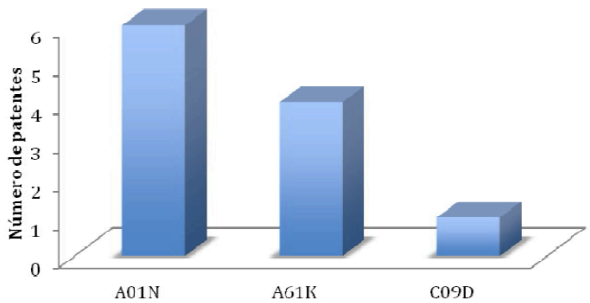
Os 11 pedidos de patentes encontrados com as palavras *monoterpene and formulation* foram analisados quanto ao ano de depósito (Figura 3). Um aumento no número de patentes a partir de 2000 foi verificado, e posteriormente uma queda foi registrada, retornando a mesma quantidade de registros inicial.

Figura 2 – Evolução anual do número de depósitos de patentes na base de dados europeia.



Dentre os 11 depósitos de pedidos de patentes encontrados, 6 estão alocados na subclasse A01N, que trata da conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos; Biocidas, por ex., desinfetantes, pesticidas, herbicidas; Repelentes ou atrativos de pestes; reguladores do crescimento de plantas. Contudo, um número de 4 patentes estão inseridas na subclasse A61K, que engloba preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas, comprovando que os monoterpenos vêm sendo estudados com a perspectiva de gerar produtos com potencial terapêutico. Além disso, uma patente está inserida na classe C09D, que trata de composições de revestimento, removedores químicos de tintas para pintar ou imprimir; tintas para imprimir; fluídos corretores ou corantes para madeira.

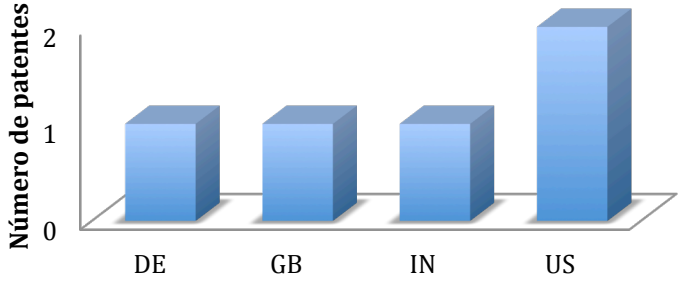
Figura 3 – Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontrados na base europeia.



3.2 Patentes depositadas na WIPO

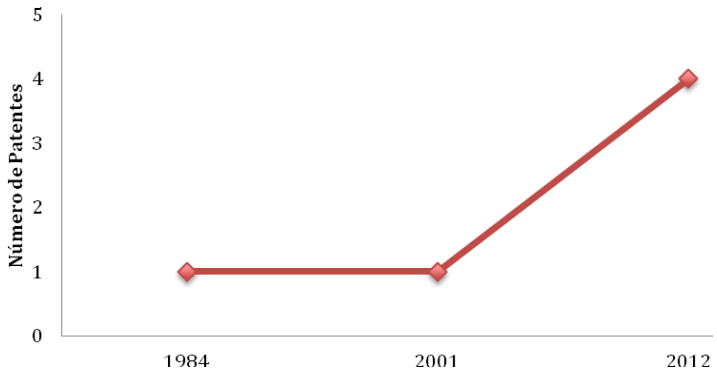
Da mesma forma que no banco de dados europeu, nenhum país latino americano nem a Austrália apresentaram pedido de depósito de patente na WIPO, tendo em vista o potencial em biodiversidade que esses países têm em desenvolver formulações à base de plantas medicinais (Figura 5).

Figura 4 – Número de patentes depositadas no WIPO por país, sendo DE (Alemanha), GB (Reino Unido), IN (Índia) e US (Estados Unidos da América).



Analisando a evolução anual de patentes depositadas (Figura 5), foi possível verificar que os depósitos de pedidos de patentes nessa base surgiram no ano de 1984, sendo que houve um destaque em 2012, quando foi depositado o maior número de patentes, o que não corrobora com a evolução anual do número de patentes na base de dados europeia demonstrada na Figura 3.

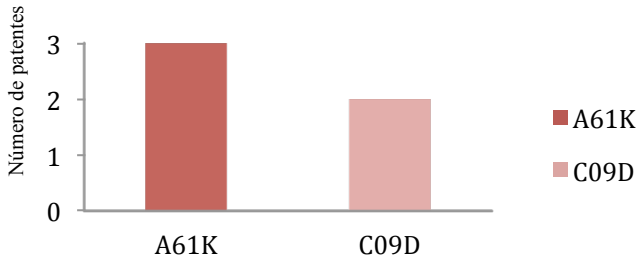
Figura 5 – Evolução anual do número de depósitos de patentes na WIPO.



Foi avaliada também a distribuição de patentes por CIP (Figura 6), tempo em que foi possível observar um perfil semelhante ao que foi verificado na base EPO.

Apesar de não haver nenhuma patente na classificação A01N, as duas classes anteriormente descritas foram encontradas.

Figura 6 – Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontradas na WIPO.



4. Conclusões

Por meio da análise nas bases consultadas, foi possível observar que até o presente momento houve um número ainda insatisfatório de patentes envolvendo formulações à base de monoterpenos, apesar do verificado aumento no número de pedidos de patentes a partir do ano 2000. Além disso, foi constatado a ausência de patentes brasileiras envolvendo formulações monoterpênicas, o que demonstra a necessidade de investimento nacional em pesquisa, inovação e desenvolvimento na área de desenvolvimento de novos produtos com fins terapêuticos.

Referências

BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html. Acesso em: 10 ago. 2016.

BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. 1st ed. **Oregon Medical Press**. Princeton, Minnesota, U.S.A, 2001.

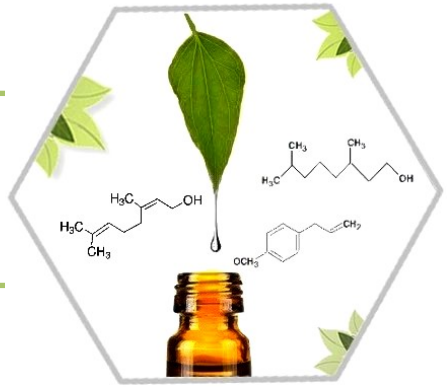
HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine**. Veterinary Research Communications**, v. 21, p. 213-28, 1997.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

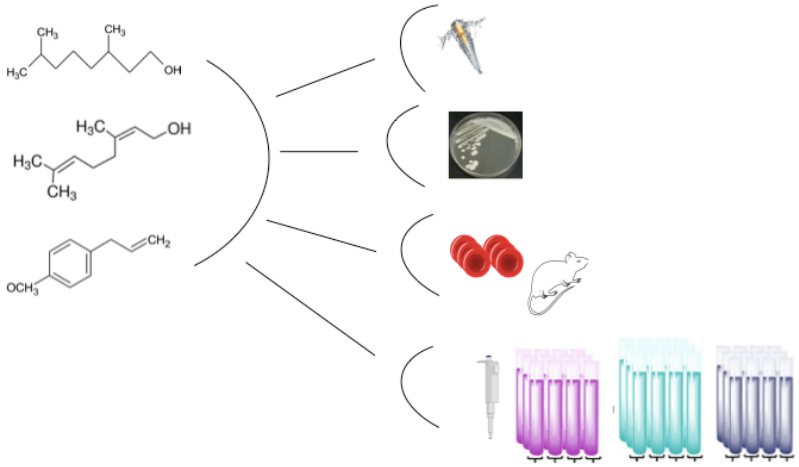
SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO. **Química Nova**, v. 31(3), p. 601, 2005.

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; QUITANS-JUNIOR, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

Capítulo III



CAPÍTULO III - Avaliação tóxica, citotóxica, hemolítica, oxidante/antioxidante de monoterpenos oxigenados em múltiplos ensaios *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae*



Artigo submetido à revista Journal of Pharmacy and Pharmacology– Qualis B1 - Biotecnologia.

CAPÍTULO III - Avaliação tóxica, citotóxica, hemolítica, oxidante/antioxidante de monoterpenos oxigenados em múltiplos ensaios *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

As plantas medicinais são de importância terapêutica para diversas patologias, incluindo as doenças negligenciadas. Seus fitoquímicos apresentam diversas atividades biológicas. Os monoterpenos, a exemplo do dimetil-octanol, estragol e nerol, possuem atividades antimicrobianas, antifúngica, anti-helmínica e antioxidante *in vitro.* O estudo teve como objetivos avaliar a toxicidade e a atividade antioxidante dos monoterpenos oxigenados dimetil-octanol, estragol e nerol. Os ensaios de toxicidade foram realizados em *Artemia salina* e em eritrócitos de camundongos. A atividade antioxidante foi avaliada por meio dos ensaios com DPPH, ABTS e potencial redutor do ferro, bem como em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em enzimas antioxidantes. Atividades antioxidantes foram evidenciadas pela captura de radicais livres induzidos pelo *ABTS*•+ e DPPH•. Corroborando com esses dados, os monoterpenos não oxidaram o material genético de *S. cerevisiae*, apresentando atividades antioxidantes na modulação dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, com percentuais acima de 60 % para as linhagens *SODWT,* Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1/Sod2Δ, Cat1Δ, Cat1/Sod1Δ. Esses dados apontam que os monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol são antioxidantes naturais incapazes de gerar danos oxidativos ao material genético. Nas concentrações testadas apenas o nerol apresentou-se tóxico à *A. salina*. Os terpenos não foram citotóxico nas concentrações testadas no ensaio de hemólise. Os monoterpenos não oxidaram o DNA de células eucarióticas (leveduras), aspecto de importância para o uso desses bioativos em formulações farmacêuticas para terapias mais seguras, especialmente as relacionadas às doenças negligenciadas.

Palavras-chave: Monoterpenos, antioxidantes, dimetil octanol, nerol, estragol.

ABSTRACT

Medicinal plants are of therapeutic importance for various diseases, including neglected diseases. His phytochemicals have various biological activities. The monoterpenes, like the neroli, estragole and dimethyl-octanol, have antimicrobial, antifungal, anti-helmínica and antioxidant in vitro. The study evaluated the toxicity, cytotoxics, oxidants/antioxidants in modulating oxidative damage induced by hydrogen peroxide in vitro assays (DPPH and ABTS and potential iron reductant) in Artemia salina in mouse erythrocytes, and Saccharomyces cerevisiae proficient and mutated in antioxidant enzymes. The compounds were tested at concentrations of 0.9; 1.8; 3.6; 7.2; 14.4 μl/mL. The monoterpenes showed no cytotoxicity in *Artemia salina* and hemolysis testes. Antioxidant activities were highlighted by the capture of free radicals induced by ABTS • + and DPPH •. Corroborating these data, the monoterpenes not oxidize the genetic material of S. cerevisiae, with antioxidant activity in modulating oxidative damage induced by hydrogen peroxide, with percentages above 60% for SODWT lines, Sod1Δ, Sod2Δ, SOD1 / Sod2Δ, Cat1Δ, Cat1 / Sod1Δ. These data indicate that the neroli monoterpenes, estragole and dimethyl-octanol are natural sources of antioxidants that are safe in relation to genetic material. At the concentrations tested showed low toxicity in *A. salina*. The nerol was not cytotoxic at low concentrations in the hemolysis test. The monoterpenes not oxidize the DNA of eukaryotic cells (yeasts), an aspect of importance to the use of such bioactives in pharmaceutical formulations for safer therapies, especially those related to diseases neglected.

Keywords: Monoterpenes, antioxidants, dimethyl octanol, nerol, estragol.

1 INTRODUÇÃO

O homem vem buscando alternativas para melhorar sua condição de vida e encontrou nas plantas não somente alimento, mas especialmente fonte de princípios ativos com fins medicinais (PROBST, 2012). Os monoterpenos são constituintes de óleos essenciais de plantas medicinais caracterizados por odor agradável, ampla aplicação industrial, como aromatizantes em produtos de perfumaria e limpeza. Além disto, apresenta uma gama de atividades biológicas como antioxidantes, antifúngico, anti-inflamatório, antibacteriano, analgésico e esquistossomicida que ampliam o seu

interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em diferentes produtos (KNAAK, 2010; MARQUES et al., 2011, PROBST, 2012; SOUZA et al., 2014).

Os monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol são fitoquímicos presentes nas plantas aromáticas, os quais apresentam atividades sedativas, estimulante de apetite e alívio de distúrbios intestinais; atraente, repelente e até ação tóxica contra insetos e microrganismo. Estes bioativos presentes nos óleos essenciais são extraídos de diversas espécies vegetais, como *Croton zehntneri, Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cítrus bergamani*, *Zingiber officinalle* e *Lavandula sp* (PROBST, 2012; KNAAK, 2010).

Estudos recentes demonstraram atividades importantes para monoterpenos, como ação sobre o sistema nervoso central, incluindo atividade sedativa, antinociceptiva e antidepressiva, anti-inflamatória e analgésica. O nerol apresenta atividades antiespasmódica e anti-helmíntica (NETO, SOUSA, FREITAS, 2012).

O estresse oxidativo está envolvido no surgimento e/ou desenvolvimento de muitas doenças crônicas como câncer, diabetes mellitus, arteriosclerose, depressão, obesidade e doenças neurodegenerativas, como o Parkinson e a Doença de Alzheimer (DA) (SALLA et al., 2016; HAIDA et al., 2011). Determinados mecanismos de defesa atuam com o propósito de manter os níveis de radicais e espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro de condições normais e evitar o dano oxidativo, como a ação de enzimas antioxidantes a saber: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa (GSH). Existem ainda compostos antioxidantes que impedem ou retardam a oxidação, tais como as vitamina E, fenóis, carotenos e vitamina C, através de diversos meios, como a inibição e sequestro de radicais livres e a complexação com metais (ZHAO e t al., 2015; MAURYA et al., 2016). Neste sentido, tem-se buscado substâncias capazes de inibir a formação dos radicais livres, substâncias químicas que têm um ou mais elétrons desemparelhados e que têm como principal característica a facilidade de doar seus elétrons para outras moléculas causadoras de reações em cadeia, evitando assim os danos oxidativos nos constituintes celulares (CORNELIUS et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a toxicidade, os possíveis efeitos antioxidantes e o potencial redutor do ferro dos monoterpenos nerol, estragol e dimetil-octanol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação dos compostos

2.2 Bioensaio com *Artemia salina*

A avaliação da possível toxicidade dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol em *Artemia salina* foi feita conforme Amaral (2008). Os cistos de *A. salina* foram incubados em um pequeno aquário contendo solução salina (50mg de cistos, para 300 mL da solução marinha), onde permaneceu durante 24h com iluminação direta. Após este período, observou-se a eclosão dos cistos. Foram preparados tubos de ensaios com nerol, dimetil-octanol e estragol diluídos em solução marinha nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL, em triplicata com volume final de 1 mL. Foram acrescentadas dez larvas em cada tubo e, após 24h, realizou-se a leitura dos tubos, observando-se a quantidade de larvas vivas e mortas. O controle negativo foi utilizado com DMSO e solução marinha.

2.3 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos

A atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos foi realizada de acordo com Girish (2012) e Jamialahmadi (2014). Para avaliação da capacidade hemolítica pela interação dos bioativos estudados foram utilizados 300 µL da suspensão de eritrócitos (10%) e misturou-se com 500 µL de cada monoterpeno (31,25-500 µg/mL). Em seguida, colocou-se em banho-maria a 37 °C por 120 minutos. Após o tempo de reação, a mistura reacional foi centrifugada em 2000 rpm durante 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medida em 540 nm. Para comparação, o mesmo procedimento experimental foi realizado simultaneamente para o controle positivo Triton X-100 (31,25-500 µg/mL).

2.4 Capacidade antioxidante em capturar a estrutura do cátion radical *ABTS*•+

O ensaio foi aplicado de acordo com Carvalho (2012). Inicialmente, o radical ABTS•+ foi obtido a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS•+ com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16h. Na preparação do trolox (controle positivo), pipetou-se 30µl do mesmo e completou-se o balão até o menisco com solução

salina. Transcorrido esse tempo, ABTS •+ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de 1,00. Após, adicionou-se 1.960 µL do radical ABTS e agitou-se manualmente por 10 segundos em ambiente escuro. A mistura reacional foi em seguida mantida em repouso por seis minutos. Posteriormente, nomeou-se os tubos nas concentrações (0,9; 1,8 ;3,6; 7,2; 14,4 µg/mL), onde pipetou-se a solução mãe em cada tubo e completou-se com a solução salina. O mesmo procedimento foi realizado com o trolox (controle positivo). Logo após, adicionou-se o radical em cada tubo (em triplicata) e deixou-se em repouso por 30 minutos onde realizou-se a leitura da absorbância em 515 nm no espectrofotômetro.

2.5 Capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre DPPH.

O ensaio DPPH foi realizado conforme Abderrahim (2013). Preparou-se uma solução inicial 30µL dos monoterpenos, o qual foi dissolvido em Tween 80, e em seguida realizou-se as diluições para obtenção de concentrações finais (0,9; 1,8; 3,6; 7,2; 14,4 µl/mL). As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH• na concentração de 40µg/mL), foram realizadas em triplicata para o trolox e controles no tempo 30 minutos. Uma mistura de etanol (2,7 mL) e de cada monoterpeno (0,3 mL) foi utilizada como branco. Posteriormente, os tubos foram identificados com as concentrações citadas anteriormente e realizou-se a leitura absorbância em 515 nm no espectrofotômetro.

2.6 Potencial redutor de ferro

O ensaio foi aplicado de acordo com Singhal (2013). Para a avaliação do potencial redutor de ferro, foi preparada uma mistura reacional contendo 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6 e 500 µL de Ferricianeto de potássio 1% em cada concentração (0,9; 1,8; 3,6; 7,2; 14,4 µl/mL). Em seguida os tubos contendo as diferentes misturas, foram colocados em banho-maria a 50 ºC por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético 10%, 500 µL de água destilada e 250 µL de cloreto férrico 0,1% e logo depois foi transferida aos outros tubos em triplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 700nm.

2.7 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

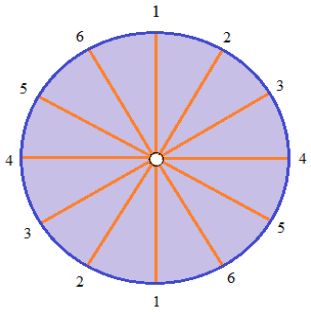
O teste foi aplicado de acordo com Oliveira e colaboradores (2008). As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no ensaio de atividade antioxidante com seus genótipos relevantes estão apresentadas na **Tabela 1**. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene *sod1*), enquanto a EG110 apresenta mutação na *SOD* mitocondrial (MnSOD - produto do gene sod*2*); EG133 é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *SOD2*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*CAT1*); a EG é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *CAT1*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas.

Tabela 1. Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1::URA3 todos os outros marcadores EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2::TRP1 todos os outros marcadores EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 duplo mutante em todos os outros marcadores EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, exceto cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, exceto sod1:: URA3 e cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5 %, 2 % de Bacto-peptona, 2 % de glucose) a 28 °C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo (**Figura 1**). A avaliação antioxidante foi feita frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (10 mM).

Figura 1. Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae.*



1. SODWT
2. *Sod1*Δ
3. *Sod2*Δ
4. *Sod1*Δ*Sod2*Δ
5. *Cat1*Δ
6. *Sod1*Δ*Cat1*Δ

2.8 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Newman-Keuls* como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright©. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos dos resultados obtidos neste estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Carvalho (2012), os testes de toxicidade devem ser considerados como análises indispensáveis no biomonitoramento de extratos de plantas. Em geral, o ensaio para avaliação da capacidade hemolítica *in vitro* é utilizado como método de triagem tóxica, estimando o dano eritrocitário que poderá induzir *in vivo*. Tal parâmetro vem sendo utilizado pela comunidade científica para avaliação toxicológica de diferentes plantas (ARANHA, 2014).

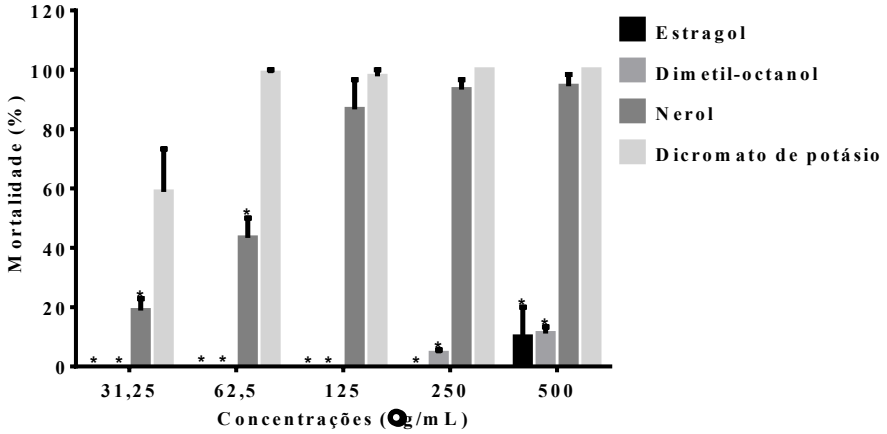
3.1 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina* e em hemácias de camundongos dos monoterpenos dimetil-octanol , estragol e nerol.

Os resultados dos ensaios de toxicidade em *A. salina* podem ser observados na Figura 2. Após 24 horas de exposição nas concentrações de 31,2 a 500 µg/mL (**Figura 2A)** o dimetil-octanol e estragol apresentaram menor toxicidade em relação ao nerol. Entretanto, após 48 horas de exposição (**Figura 2B)** o nerol mostrou-se tóxico

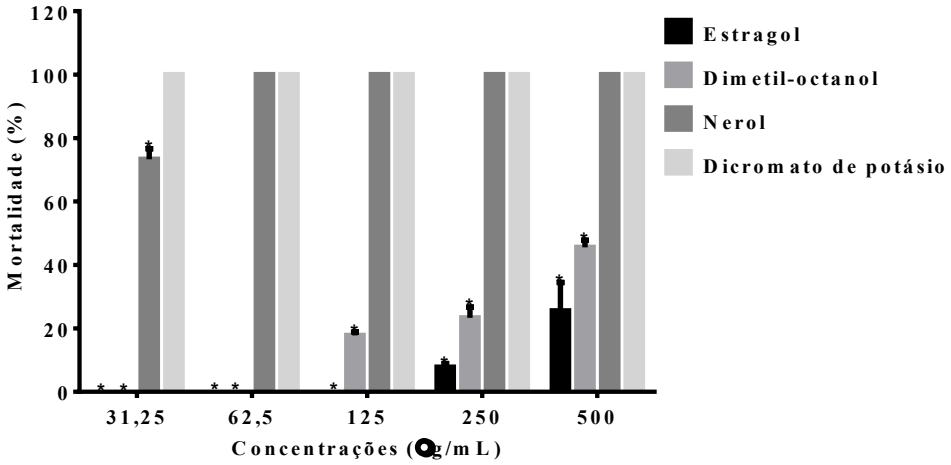
aos crustáceos. Essa avaliação é considerada como um dos critérios essenciais para identificar uma molécula bioativa promissora do ponto de vista farmacológico e mercadológico (ZANON, 2010).

Figura 2 Percentuais de mortalidade de *A. salina* após (**A)** 24 horas e (**B)** 48 horas de exposição aos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol, bem como ao dicromato de potássio em diferentes concentrações (31,25-500 μg/mL).

A



B



Os resultados representam a média ± E.P.M. de três experimentos independentes em triplicata. *p<0,05 em relação ao dicromato de potássio (31,25-500 μg/mL) (ANOVA e Neuman-Keuls como post hoc teste).

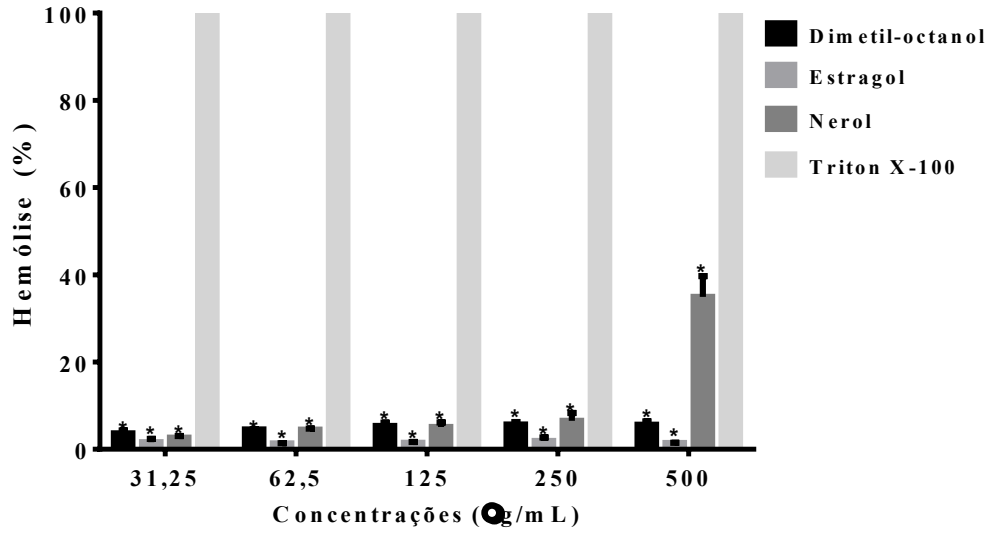
A classificação da toxicidade de substâncias vegetais em *A. salina* pode ser assim atribuída: substâncias que apresentam CE50 > 1000 μg/mL são consideradas

inativas (ou atóxicas) e aquelas com CE50 < 100 µg/mL são muito ativas (muito tóxicas) (MEYER et al., 1982).

O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica. Nesse teste, obtém- se uma taxa de sobrevivência de *A. salina* ao produto testado, ou seja, observando-se os danos causados ao organismo teste e a concentração que provoca a morte de 50% dos mesmos, representada pela sigla CE50 (CAVALCANTE et al., 2000). Os índices de mortalidade das larvas no bioensaio de toxicidade do nerol, extraído de plantas medicinais, através do teste de *Artemia salina* variam de 0 e 100%. A concentração necessária pra matar 50% das larvas (CE50) foi de 76,61 µg/mL mostrando ser uma substância tóxica. Após 48 horas de exposição, a CE50 de 26,22 µg/mL, demonstrado que o nerol é considerados muito ativo frente a *A. salina* (CE50<100) (AGUIAR, 2013).

Entretanto, na avaliação de hemólise em camundongos a taxa de hemólise para os monoterpenos observada foi menor que 25% até a concentração de 250 µg/mL, especialmente para o nerol. Esse fato sugere que o composto pode não ser citotóxico em nível celular, pois quanto menor a taxa de hemólise, menor a citotoxicidade (**Figura 3**). Mas, na concentração de 500 µg/mL, o nerol já mostrou efeito hemolítico e citotóxico a nível celular, provocando a ruptura da membrana.

Figura 3 - Capacidade hemolítica do dimetil-octanol, estragol, nerol, e Triton X-100 em hemácias de camundongos.



Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores *in vitro*, n = 3, dos experimentos em duplicata. *p<0,05 versus Triton X-100 (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A análise citotóxica avalia o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana. A verificação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos se caracteriza pelo mecanismo citotóxico direto sobre a membrana plasmática das células, já que os mesmos possuem grande equivalência com os eritrócitos humanos, principalmente quanto à sensibilidade (SILVA, 2015). Este método é um ótimo indicador para averiguar agressão *in vitro* por causa da estabilidade mecânica característica da membrana eritrocitária (SHARMA; SHARMA, 2001). A atividade hemolítica do nerol mostrada na concentração de 500 μg/mL sugere uma citotoxidade, mostrando uma indução de dano ao nível de membrana plasmática, e não por uma possível interferência com os mecanismos intracelulares.

3.2 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol frente aos radicais DPPH•, ABTS•+ e Potencial redutor (Fe^{3+}/Fe^{2+})

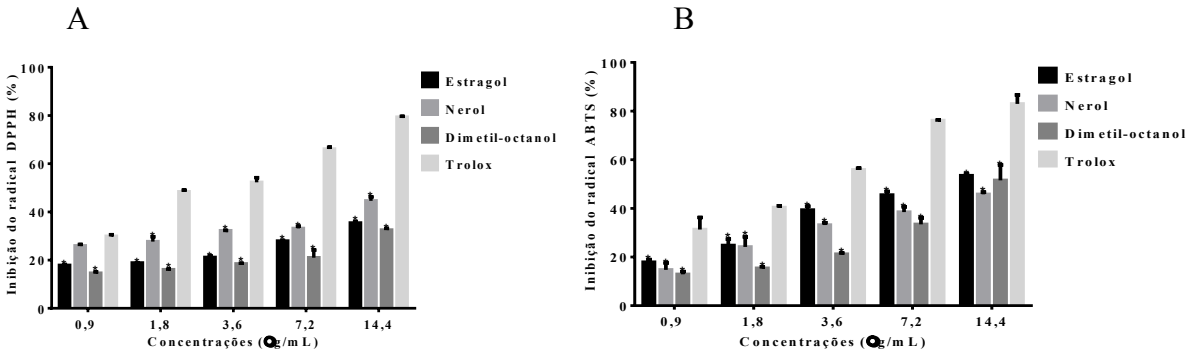
Extratos, frações e substâncias isoladas de inúmeras espécies naturais também têm demonstrado potencial atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* a nível sanguíneo e/ou tecidual, o que os tornam interessantes fontes para pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos e aplicação na terapêutica de patologias associadas ao estresse oxidativo (HAIDA et al., 2011; CHTOUYI et al., 2016).

Os monoterpenos apresentaram capacidade antioxidante frente à liberação do radical DPPH• (**Figura 4 A**) e em relação ao radical ABTS•+ (**Figura 4 B**). O DPPH• é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas substâncias redutoras fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico, onde sua baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al., 2007).

Os dados apresentados na **Figura 4 A e B** apontam variação na inibição do radical de forma concentração-dependente da amostra, indicando atividade antioxidante. Método este que envolve a eliminação do DPPH•, sendo um dos mais utilizados devido à facilidade e rapidez de execução. A capacidade antioxidante foi determinada por

análise de diminuição da absorbância de DPPH• nas concentrações de 0,9 µg/mL a 14,4 µg/mL (CARVALHO, 2012). Segundo Oliveira (2012), nas concentrações de 7,83 a 500 µg/mL, o máximo valor encontrado de atividade antioxidante foi de 73,4% do timol na concentração de 200 µg/mL (OLIVEIRA, 2012).

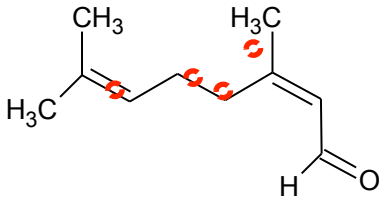
Figura 4. Efeitos do dimetil-octanol, estragol e nerol e trolox na inibição dos radicais DPPH• **(A)** e ABTS•+



Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 3, dos experimentos em duplicata. *p<0,05 versus Trolox (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

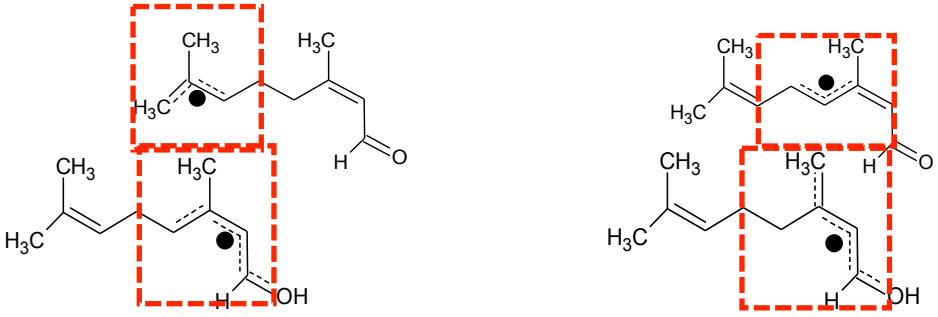
Assim, os bioativos demonstraram atividade antioxidante através da inibição dos radicais DPPH• e ABTS•+, devido suas estruturas apresentarem um grande número de hidrogênios alílicos, 13 no total (nerol), apresentando-se como substâncias potencialmente antioxidantes. O nerol ao reagir com estes radicais pode clivar as ligações dos hidrogênios alílicos, doando hidrogênio radicular para reduzir o DPPH• ou o ABTS• +, gerando, nas suas estruturas, radicais estabilizados por conjugação, podendo ocorrer em todas as posições alílicas (**Figura 5**).

Figura 5. Indicação dos hidrogênios do tipo alílicos na estrutura do Nerol



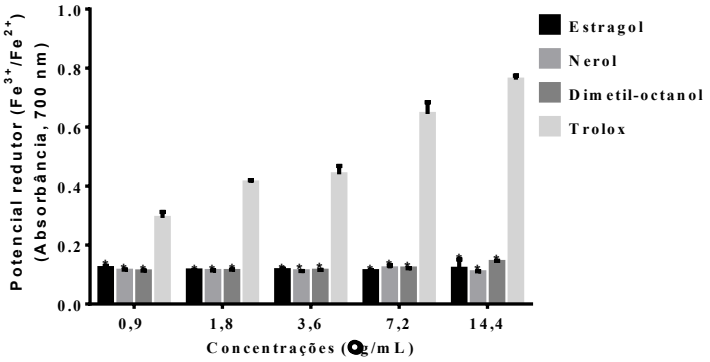
Neste contexto, a reação se inicia pela abstração do átomo de hidrogênio alílico presente na estrutura do nerol figura 6. Esta abstração se dá pelo radical HER, resultando na formação de quatro Rad-+. Existe, no entanto, quatro caminhos pelos quais a reação pode seguir (BICAS et al., 2009) (**Figura 6**).

Figura 6. Possível mecanismo para ação antioxidante do nerol na neutralização de R+



A técnica de redução do ferro é frequentemente usada como um indicador de atividade de doação de elétrons. Nesse método, a coloração amarela da solução em análise muda de tonalidades, do verde ao azul, dependendo do poder de redução de cada substância, ou seja, a presença de agentes redutores (antioxidantes) reduz Fe^{3+}/ferricianeto para forma ferrosa (Fe^{2+}), sendo a concentração de Fe^{2+}monitorada a 700 nm (MACÊDO, 2011). Os monoterpenos estudados apresentaram baixa ou nenhuma atividade antioxidante frente ao potencial redutor de ferro, comparado com o controle positivo (trolox). Tendo em vista tratar-se de um método de complexação e as moléculas testadas não apresentam atividade antioxidante por não ter uma estrutura compatível para fazer a redução do ferro (**Figura 7**).

Figura 7. Potencial redutor (Fe^{3+}/Fe^{2+}) do dimetil-octanol, estragol e nerol e trolox



Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 3, dos experimentos em duplicata. $^{*}p<0,05$ versus Trolox (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A redução de íons ferrosos é influenciada pela solubilidade dos compostos solúveis em cada extrato aquoso, que por sua vez é influenciada pela presença de outros componentes acíclicos, monocíclicos, e monoterpenos bicíclicos, derivados de propano fenílicos e lactonas sesquiterpênicas. E, como representado na figura 7, a estrutura do

nerol mostra apenas componentes alílicos, justificando a não atividade antioxidante com o potencial redutor de ferro (ABREU, 2013).

3.3 Avaliação oxidante dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol em *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, perante o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais usados em testes biológicos, inclusive para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (GUARIENT, 2010). Várias razões tornam a levedura *S. cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Trata-se de um organismo provido de núcleo e de organelas com metabolismo semelhante à de eucariotos superiores. Em estudos de mutagenicidade e genotoxicidade os resultados obtidos mostraram correlação de, aproximadamente, 80%, com aqueles observados em humanos (HENRIQUES et al., 2001).

Os monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol (**Tabela 2**) não induziram danos oxidativos em nenhuma da linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas e em nenhuma concentração testada, quando em comparação com a solução salina (dados com $p>0,05$). Não foram observadas diferenças entre as concentrações testadas, diferentemente do observado nos ensaios *in vitro* DPPH e ABTS (**Figura 4**). Entretanto, significâncias ($p<0,0001$) foram observadas para o H_2O_2.

Em contraponto, estudos anteriores relatam que o nerolidol, um sequisterpeno, apresentou uma atividade pró-oxidante (RUBERTO et al., 2000). Por sua vez, estudos com extratos vegetais de cana do brejo (*Costus spicatus* Swartz) demonstraram baixo efeito antioxidante em linhagens tratadas com doses mais baixas (25-50μL/mL suspensão celular); também se verificou um efeito pró-oxidante nas linhagens tratadas com a dose mais alta (250μL/mL suspensão celular), tanto em fase exponencial, quanto em fase estacionária. O efeito pró-oxidante observado com extrato hidroalcoólico foi atribuído à presença de compostos de menor polaridade, as quais não devem estar presentes na fração metanólica e sim, na hidroalcoólica (GASPARRI, 2005). Contudo, apesar da baixa polaridade dos monoterpenos, não observou-se efeito pró-oxidante.

Tabela 2. Avaliação do dano oxidante dos monoterpenos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxidos dismutases e catalases

Nerol

	Linhagens					
Tratamentos	SODWTΔ	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1Cat1Δ
Salina 0,9%	0,75 ± 0,47	1,75 ± 0,70	0,50 ± 0,28	2,75 ± 1,59	0,50 ± 0,37	1,25 ± 0,50
DMSO 0,05%	0,75 ± 0,47	0,75 ± 0,47	0,9 ± 0,28	0,8 ± 0,32	1,1 ± 0,54	0,5 ± 0,15
H_2O_2 10 mM	30,75 ± 5,0***	25,50 ± 4,2***	25,25 ± 6,18***	27,00 ± 5,09***	24,25 ± 4,03***	22,25 ± 4,57***
0,9 μg/mL	1,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	1,00 ± 0,28	2,00 ± 1,41	1,50 ± 0,70	2,50 ± 2,10
1,8 μg/mL	1,50 ± 0,70	2,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70
3,6 mg/mL	1,00 ± 0,28	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	4,00 ± 1,2	3,00 ± 1,41
7,2 μg/mL	2,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41
14,4 μg/mL	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	3,00 ± 0,54	3,00 ± 0,54	3,00 ± 1,41
32 μg/mL	2,00 ± 1,41	3,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	4,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70
64 μg/mL	2,00 ± 1,41	1,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41
128 μg/mL	1,00 ± 0,28	2,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70
256 mg/mL	2,00 ± 0,24	2,50 ± 0,70	2,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41
500 mg/mL	1,00 ± 0,28	2,00 ± 0,24	2,00 ± 0,24	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70

Estragol

	Linhagens					
Tratamentos	SODWTΔ	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1Cat1Δ
Salina 0,9%	0,75 ± 0,47	1,75 ± 0,70	0,50 ± 0,28	2,75 ± 1,59	0,50 ± 0,37	1,25 ± 0,50
DMSO 0,05%	0,75 ± 0,47	0,75 ± 0,47	0,9 ± 0,28	0,8 ± 0,32	1,1 ± 0,54	0,5 ± 0,15
H_2O_2 10 mM	30,75 ± 5,0***	25,50 ± 4,2***	25,25 ± 6,18***	27,00 ± 5,09***	24,25 ± 4,03***	22,25 ± 4,57***
0,9 μg/mL	2,00 ± 0,54	2,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	3,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	3,50 ± 0,70
1,8 μg/mL	1,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	4,50 ± 0,70	4,00 ± 2,82
3,6 mg/mL	1,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	2,00 ± 0,54	2,50 ± 0,70	4,00 ± 1,41	4,00 ± 1,41
7,2 μg/mL	2,00 ± 1,41	2,00 ± 1,41	2,00 ± 0,54	2,50 ± 0,70	1,50 ± 2,12	3,50 ± 0,70
14,4 μg/mL	2,50 ± 0,70	2,00 ± 0,54	3,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	4,50 ± 2,12	5,00 ± 0,0
32 μg/mL	2,00 ± 0,54	2,50 ± 0,70	2,00 ± 0,54	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	4,50 ± 0,70
64 μg/mL	2,00 ± 0,54	2,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	7,00 ± 1,41*	3,00 ± 1,41
128 μg/mL	1,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	4,50 ± 2,12
256 mg/mL	3,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 2,12	3,00 ± 1,41	3,00 ± 2,82
500 mg/mL	1,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	4,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70

Dimetil-octanol

	Linhagens					
Tratamentos	SODWTΔ	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1Cat1Δ
Salina 0,9%	0,75 ± 0,47	1,75 ± 0,70	0,50 ± 0,28	2,75 ± 1,59	0,50 ± 0,37	1,25 ± 0,50
DMSO 0,05%	0,75 ± 0,47	0,75 ± 0,47	0,9 ± 0,28	0,8 ± 0,32	1,1 ± 0,54	0,5 ± 0,15
H_2O_2 10 mM	30,75 ± 5,0***	25,50 ± 4,2***	25,25 ± 6,18***	27,00 ± 5,09***	24,25 ± 4,03***	22,25 ± 4,57***
0,9 μg/mL	1,50 ± 0,70	0,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70
1,8 μg/mL	1,50 ± 0,70	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,00 ± 1,41	3,50 ± 0,70	3,00 ± 0,00
3,6 mg/mL	2,00 ± 0,00	1,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	2,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	4,00 ± 1,41
7,2 μg/mL	2,50 ± 0,70	1,00 ± 0,00	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	4,00 ± 0,00	3,00 ± 1,41
14,4 μg/mL	2,00 ± 1,41	1,00 ± 1,41	1,50 ± 0,70	2,00 ± 0,00	3,50 ± 0,70	2,00 ± 2,82
32 μg/mL	2,00 ± 0,00	2,50 ± 0,70	3,00 ± 0,00	2,50 ± 0,70	3,50 ± 2,12	3,50 ± 0,70
64 μg/mL	1,50 ± 0,70	3,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	3,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41
128 μg/mL	1,00 ± 1,41	1,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	3,50 ± 0,70	3,50 ± 2,12	4,00 ± 1,41
256 mg/mL	0,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	1,00 ± 1,41	3,00 ± 1,41	2,50 ± 2,12	3,00 ± 0,00
500 mg/mL	2,50 ± 0,70	3,00 ± 0,00	2,50 ± 0,70	2,50 ± 0,70	3,00 ± 1,41	3,50 ± 0,70

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. N: Nerol. ANOVA two-way, pós-teste de Tukey. *p<0,05 e ***p<0,0001 comparado à Salina 0,9%.

3.4 Avaliação antioxidante dos monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol diante dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*

Os dados obtidos indicam que os resultados das atividades antioxidantes *Saccharomyces cerevisiae* corroboram com os obtidos nos ensaios *in vitro* DPPH e ABTS. Os monoterpenos nerol (**Figura 8**), estragol (**Figura 9**) e dimetil-octanol (**Figura 10**) apresentaram significantes atividades antioxidantes frente aos danos oxidativos induzidos pelos H_2O_2 em todas as linhagens e concentrações testadas. Os percentuais de modulação dos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 para os monoterpenos foram acima de 60%, especialmente para o estragol, indicando que os compostos são antioxidantes naturais capazes de inibir os danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 em células eucarióticas.

Figura 8. Efeito do nerol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio

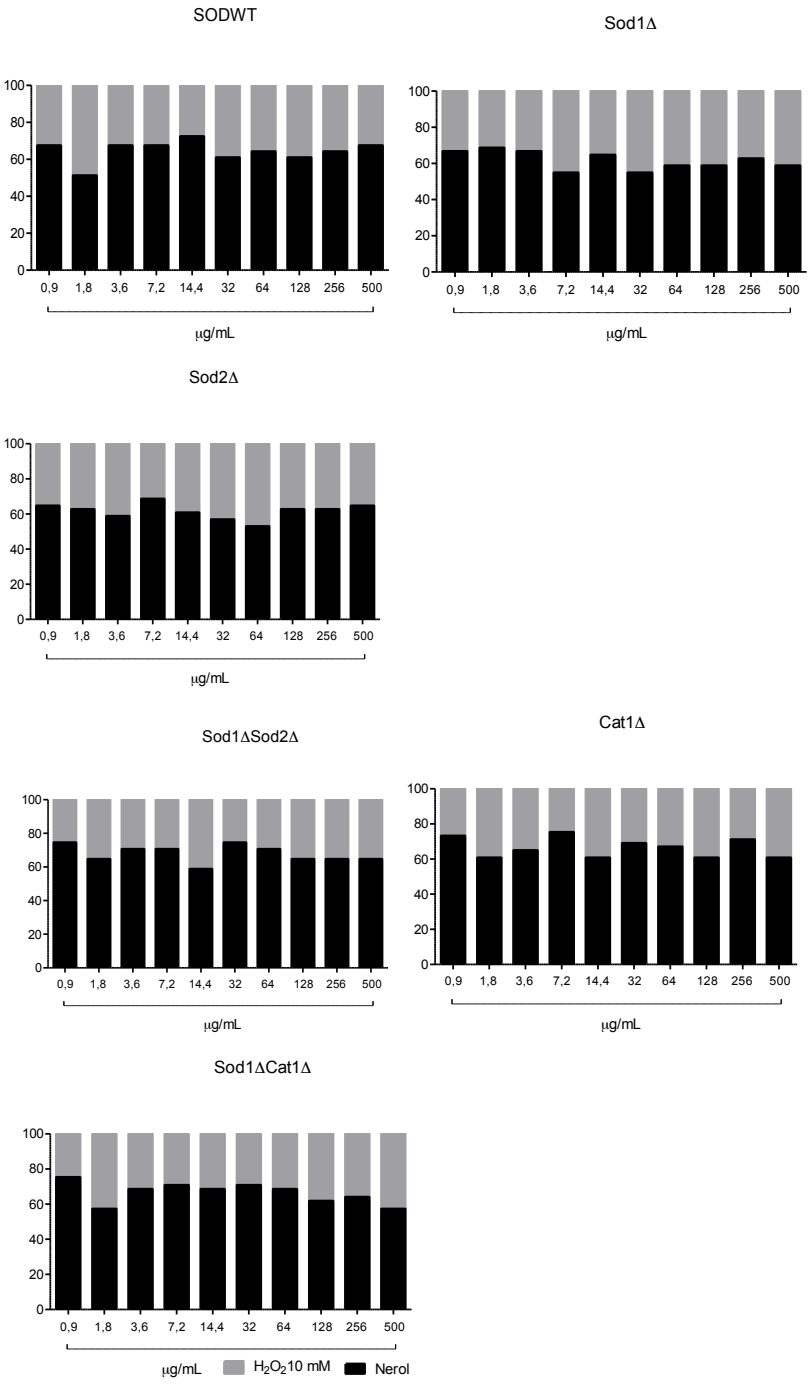


Figura 9. Efeitos do estragol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio

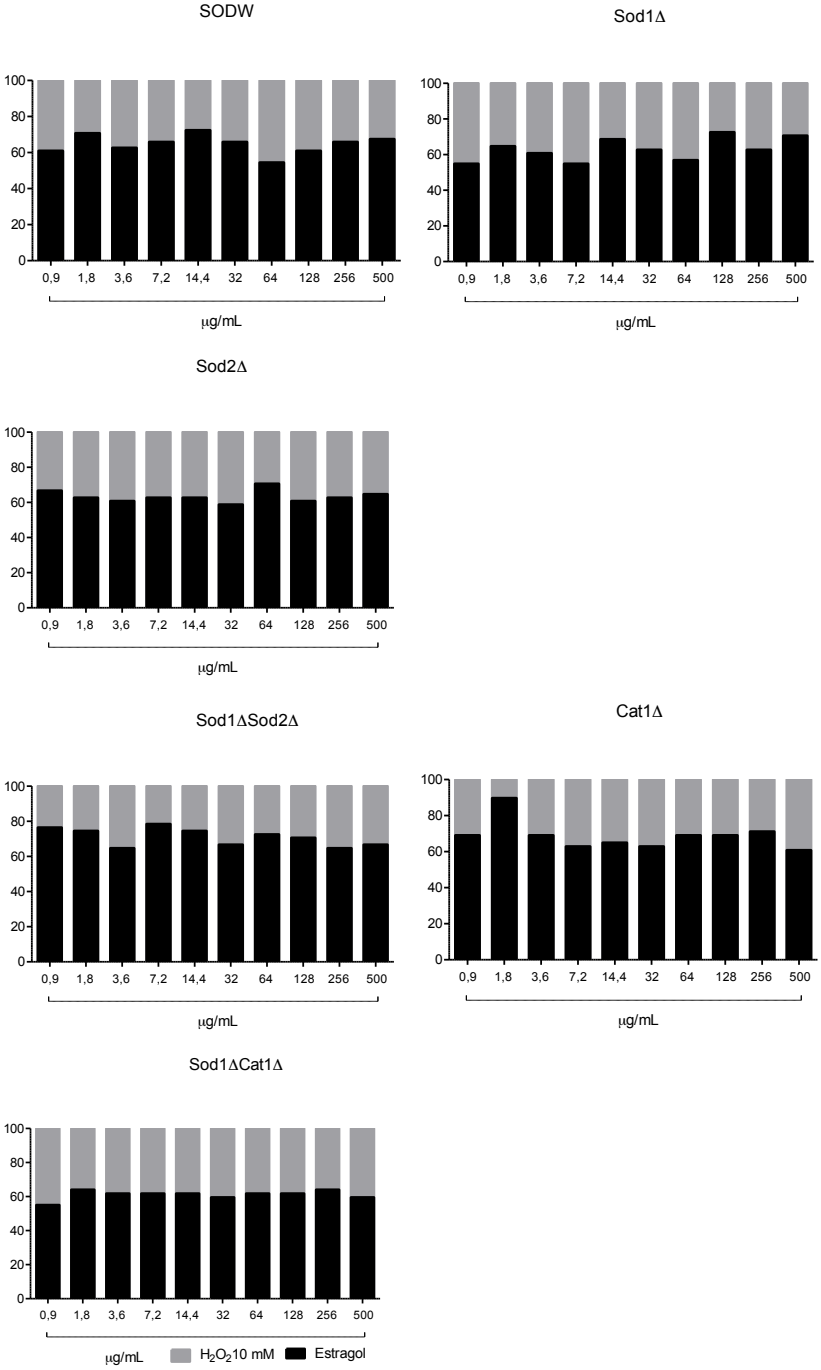
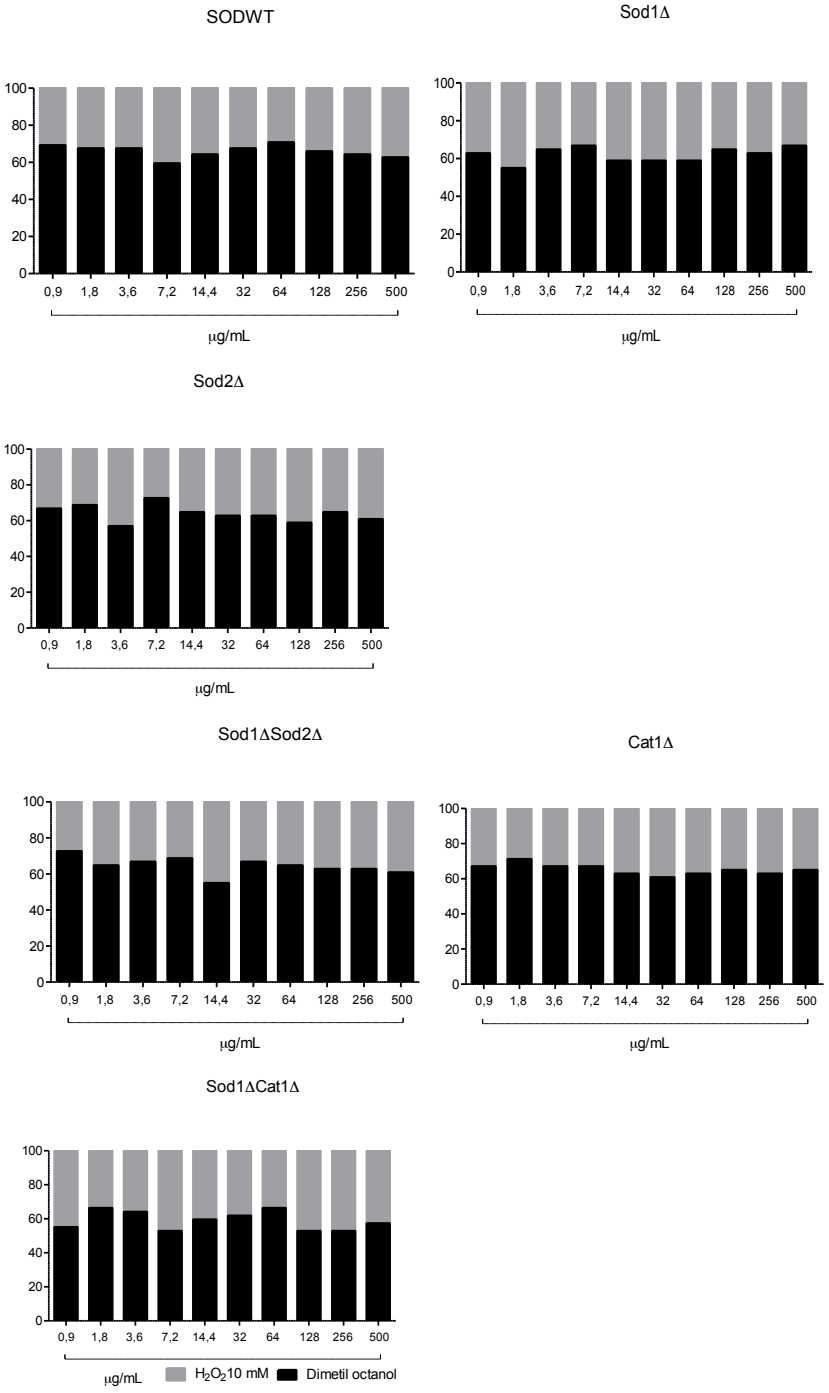


Figura 10. Efeitos do dimetil-octanol na modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio.



Os antioxidantes ensaiados mostraram-se efetivos em proteger as células de levedura contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio, um agente estressor capaz de gerar radical superóxido (LAI & YU, 1997; MENA et al.,1997; BLUM et al., 2000).

Em contraponto, outro terpeno o nerolidol, apresentou efeito citotóxico mais pronunciado em comparação quando comparado com o óleo essencial do qual foi extraído (*P. gaudichaudianum*), porém este sesquiterpeno não induziu qualquer tipo de efeito mutagênico (GONÇALVES et al., 2011; PÍCULO et al., 2011). Além disso, observa-se em estudos anteriores que é mais frequente a indução de citotoxicidade em óleos essenciais (OE) do que em substâncias puras obtidas de OE (GONÇALVES et al., 2011). Mostrando que o isolamento de novos produtos naturais é uma importante estratégia para o descobrimento de novas drogas antioxidantes.

CONCLUSÃO

O nerol apresentou-se tóxico à *A. salina*, e com potencial hemolítico na concentração de 500 ug/mL. Baixo efeito antioxidante foi observado no ensaio do potencial redutor (Fe^{3+}/Fe^{2+}). Entretanto, em ensaios *in vitro* para avaliação do potencial antioxidante, o perfil tóxico e citotóxico não influenciou, pois os monoterpenos apresentaram capacidade de captura dos radicais *ABTS*•+ e DPPH•, especialmente para o nerol devido a presença de hidrogênio do tipo alílico em sua estrutura. Nos estudos com *S. cerevisiae,* os monoterpenos não induziram danos oxidativos em linhagens proficientes e mutadas para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, bem como para catalase e duplo mutantes catalase e superóxido dismutase. Nessas linhagens, os monoterpenos em co-tratamento com o peróxido de hidrogênio modularam com percentual acima de 60% os danos oxidativos induzidos por essa espécie reativa de oxigênio. Os estudos apontam para o uso dos monoterpenos em foco como compostos bioativos em formulações farmacêuticas para prevenção e terapias de doenças relacionadas ao estresse oxidativos.

REFERÊNCIAS

ABDERRAHIM, F.; ARRIBAS, S.M.; GONZALEZ, M.C.; CONDEZO-HOYOS, L. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 788-794, 2013.

AGUIAR, U. N. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com β-ciclodextrina. **Química Nova**. v. 37, n.1, p. 50-55, 2014.

AMARAL, E.N; SILVA, R.M.G. Avaliação da Toxidade Aguda de Angico (Anadenanthera Falcata), Pau-santo (Kilmeyera Coreacea), Aroeira (Myracrodruon

Urundeuva) e Cipó-de-São-João (Pyrostegia Venusta), por meio do Bioensaio com Artemia Salina. **Revista Eletrônica da Pesquisa,** p. 1-16, 2008.

BAYER, J. L. et al. Brain , Behavior , and Immunity Biobehavioral and neuroendocrine correlates of antioxidant enzyme activity in ovarian carcinoma. **Brain Behavior and Immunity**, v. 50, p. 58–62, 2015.

BICAS, J.L.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 4518-4531, 2009.

BLUM, D.; TORCH, S.; NISSOU, M.F.; BANABIB, A.L.; VERNA, J.M. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. **Neurosci. Lett**., v. 283, p. 193- 196, 2000.

CAVALCANTE , M. F., OLIVEIRA, M. C. C.e VELANDIA, J. R. e ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5- Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a Artemia salina Leach, **Química Nova**, v. 23, p. 20-22, 2000.

CENGIZ, S. et al. Variations in antioxidant enzyme levels of rats exposed to ethanol extracts of *Convolvulus* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 304–308, 2015.

CHANAJ-KACZMAREK, et al. Effects of plant extract antioxidative phenolic compounds on energetic status and viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells undergoing oxidative stress. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 364–377, 2015.

CORNELIUS, C., CRUPI, R., CALABRESE, V., GRAZIANO, A., MILONE, P., PENNISI, G., RADAK, Z., CALABRESE, E.J., CUZZOCREA, S. Traumat ic brain injury: oxidat ive stress and neuroprotect ion carolin, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 836–853, 2013.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae:* insights into ageing , apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, 2001.

GASPARRI, S. Estudos das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. **Dissertação de mestrado**. Universidade luterana do Brasil. 2005.

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, n. 5, p. 1690-1696, 2012.

GONÇALVES, O.; PEREIRA, R. GONÇALVES, F.; MENDO, S.; COIMBRA, M.A.; ROCHA, S.M. Evaluation of the genotoxicity os sesquisterpenic compounds and their influence on antibiotic susceptibility of two clinically relevant bacteria. **Mutation Research**, v. 723, p. 17-25, 2011.

HAIDA, K. S. et al. Propriedade sequestrante de radicais livres e determinação do teor

de fenólicos totais da sálvia e eucalipto. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61-66, 2011.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFREÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. (2001) Espécies Reativas de Oxigênio e Avaliação de Antioxidantes em Sistemas Biológicos. In: Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária; Luciana Serafini, Neiva Barros e João Lúcio Azevedo (Ed.) Agropecuária, Instituto de Biotecnologia de Caxias do Sul.

JAMIALAHMADI, K.; ARASTEH, O.; MATBOU RIAHI, M.; MEHRI, S.; RIAHI-ZANJANI, B.; KARIMI, G. Protective effects of glucosamine hydrochloride against free radical-induced erythrocytes damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** v. 38, n. 1, p. 212-219, 2014.

KAUR, S.; KAUR, A. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Variability in antioxidant / detoxi fi cation enzymes of Labeo rohita exposed to an azo dye , acid black (AB). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 167, p. 108–116, 2015.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M.; **Potencial dos Óleos Essenciais de Plantas no Controle de Insetos e Microrganismo**. São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-123, 2010.

LAI, C.T.; YU, P.H. Dopamine and L-b-3-4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-DOPA)- induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem. Pharmacol**., v. 53, p. 317-328, 1997.

LERM, D.; PEINADO, J.; PEINADO, A. *In vitro* and *in viv*o antioxidant activity of musts and skin extr acts from off-vine dried *Vitis vinifer* cv. "Tempranillo" grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1–9, 2013.

LOPEZ-HUERTAS, E.; RÍO, L. A. Characterization of antioxidant enzymes and peroxisomes of olive (*Olea europaea* L.) fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 16, p. 1463–1471, 2014.

MARCHI, F. E. DE et al. Flax meal supplementation on the activity of antioxidant enzymes and the expression of oxidative stress- and lipogenic-related genes in dairy cows infused with sunflower oil in the abomasum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 199, p. 41–50, 2015.

MARQUES T. H. C., CARDOSO, K.M. F., ALMEIDA, A.A.C., TOMÉ, A.R., FREITAS, R.M. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with Bellis perennis in pilocarpine-induced seizures. Bol. Latinoam. **Caribe Plantas Med. Aromát**., 10: 338-344, 2011.

MENA, M.A.; CASAJEROS, M.J.; CARAZO, A.; PAÍNO, C.L.; GARCIA DE YÉBENES, J. Glia protect midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. **J. Neural Transm**., v. 104, p. 317-328, 1997.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

NETO, J.D.N.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R,M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 125-130, 2012.

NI, L. et al. Effect of linoleic acid sustained-release microspheres on Microcystis aeruginosa antioxidant enzymes activity and microcystins production and release. **Chemosphere**, v. 121, p. 110–116, 2015.

PÍCULO, F.; MACEDO, C.G.; ANDRADE, S.F., MAISTRO E.L. In vivo genotoxicity assessment of nerolidol. **Applied Toxicology**, 2010.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; DEANS, S.G.; DORMAN, H.J. Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum culgare and Crithmum maritimum essential oils. **Planta Medica**, v. 66, n. 8, p. 687-93, 2000.

SALLA, S. et al. Food Science and Technology Antioxidant activity of papaya seed extracts against H_2O_2 induced oxidative stress in HepG2 cells. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 1497.e1–1497.e, 2016.

SANTOS, et al. Influencia do processamento e da torrefacao sobre a atividade do cafe (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, p. 604-610, 2007.

SOWNDHARARAJAN, K.; HONG, S.; JHOO, J. Effect of acetone extract from stem bark of Acacia species (*A . dealbata , A . ferruginea and A . leucophloea*) on antioxidant enzymes status in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 685–691, 2015.

SILVA, T.C.L.; ALMEIDA, C.C.B.R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; AMORIM, E.L.C.; COSTA, E.P.; ARAÚJO, J.M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 32, n. 2, p.193-200, 2010.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes – Byplant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives**. Journal of Saudi Chemical Society,** v. 18, n. 2, p. 121–127, 2014.

TORRE-RUIZ, M. A. DE; PUJOL, N.; SUNDARAN, V. Coping With Oxidative Stress: The Yeast Model. **Current Drug Targets**, v.16, n.1, p. 2–12, 2015.

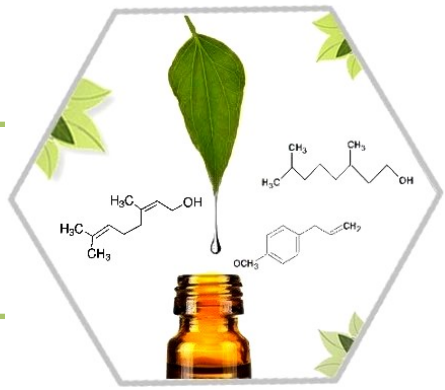
ZHANG, J., HOU, X., AHMAD, H., ZHANG, H., ZHANG, L., WANG, T. Assessment of free radicals scavenging act ivity of seven natural pigments and protect ive effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes, **Food Chemistry**, v. 145, p. 57–65, 2014.

ZHAO, S. et al. NeuroToxicology Full length article Puerarin attenuates learning and memory impairments and inhibits oxidative stress in STZ-induced SAD mice. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 166–171, 2015.

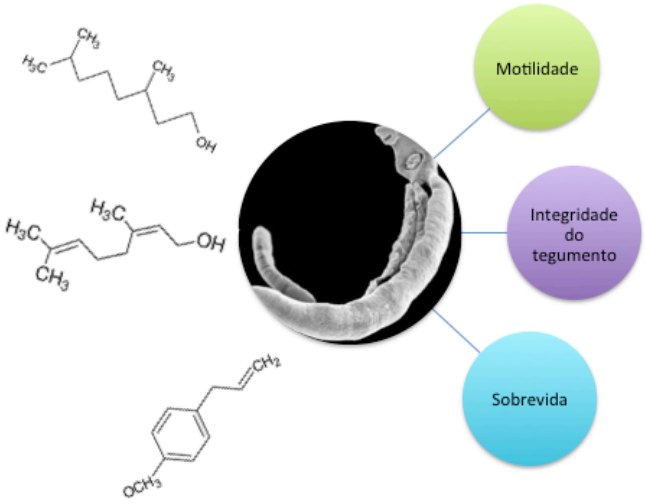
WU, B. et al. Postharvest Biology and Technology Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 157–163, 2014.

YI, D.; HUH, W. Biochemical and Biophysical Research Communications UDP-glucose pyrophosphorylase Ugp1 is involved in oxidative stress response and long-term survival during stationary phase in Saccharomyces cerevisiae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 657–663, 2015.

Capítulo IV



Capítulo IV - Parâmetros moleculares, propriedades moleculares, e evolução biológica de alguns terpenos usados para o parasita *Schistosoma mansoni*.



Artigo publicado - Chemico-Biological Interactions - Qualis A2 – Biotecnologia

Capítulo IV – Parâmetros estruturais, propriedades moleculares, e evolução biológica de alguns terpenos usados contra o parasita *Schistosoma mansoni*.

RESUMO

O uso de produtos naturais tem uma longa tradição na medicina, e eles são comprovadamente uma importante fonte de novos compostos no desenvolvimento de novas drogas. Entre os compostos naturais, os terpenos apresentam amplo espectro de atividade contra agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e parasitas helmintos. Nesse estudo, relatamos uma triagem biológica de 38 terpenos caracterizados quimicamente de diferentes classes, que possuem um grupo hidroxila ligado a uma cadeia hidrofóbica ou a um receptor local, contra o verme adulto de *Schistosoma mansoni*, o parasita responsável pela esquistossomose. Ensaios biológicos *in vitro* revelaram que o dihidrocitronelol (10) foi o terpeno mais ativo e, desse modo, investigamos essa atividade esquistossomicida com maiores detalhes. A microscopia confocal de varredura a laser revelou que o composto 10 induziu fortemente danos no tegumento do *Schistosoma* adulto e a correlação entre mudanças de viabilidade e modificações tegumentares foi observada. Além disso, comparamos estruturalmente todos os compostos inativos com dihidrocitronellol usando modelagem de forma e carga. Lipofilicidade (miLog P) e outra propriedades moleculares (por exemplo, área de superfície molecular e potencial eletrostático molecular) também foram calculadas. Dos 38 terpenos estudados, o composto 10 é o único com melhor flexibilidade, com uma região apolar suficiente para poder interagir em um sítio ativo. Em conclusão, a integração das análises biológicas e químicas indicam o potencial do terpeno dihidrocitronelol como um agente antiparasitário.

ABSTRACT

The use of natural products has a long tradition in medicine, and they have proven to be an important source of lead compounds in the development of new drugs. Among the natural compounds, terpenoids present broad-spectrum activity against infective agents such as viruses, bacteria, fungi, protozoan and helminth parasites. In this study, we report a biological screening of 38 chemically characterized terpenes from different classes, which have a hydroxyl group connected by hydrophobic chain or an acceptor

site, against the blood fluke *Schistosoma mansoni*, the parasite responsible for schistosomiasis mansoni. In vitro bioassays revealed that 3,7-dimethyl-1-octanol (dihydrocitronellol) (10) was the most active terpene (IC50 values of 13e52 mM) and, thus, we investigated its antischistosomal activity in greater detail. Confocal laser scanning microscopy revealed that compound 10 induced severe tegumental damage in adult schistosomes and a correlation between viability and tegumental changes was observed. Furthermore, we compared all the inactive compounds with dihydrocitronellol structurally by using shape and charge modeling. Lipophilicity (miLogP) and other molecular properties (e.g. molecular polar surface area, molecular electrostatic potential) were also calculated. From the 38 terpenes studied, compound 10 is the one with the greatest flexibility, with a sufficient apolar region by which it may interact in a hydrophobic active site. In conclusion, the integration of biological and chemical analysis indicates the potential of the terpene dihydrocitronellol as an antiparasitic agent.

1. Introdução

Esquistossomose é uma doença parasitária comum que afeta a população pobre e periférica na África, Ásia e América Latina e bastante negligenciada pela indústria farmacêutica e governo (COLLEY et al., 2014). Baseados nas estimativas, aproximadamente 200 milhões de pessoas são infectadas atualmente no mundo, com aproximadamente 800 milhões de pessoas com risco de infecção (STEINMANN et al., 2006). Essa doença é também conhecida como barriga d´água e é causada pelo trematoda do gênero *Schistosoma.* Três espécies principais de *Schistosoma* infectam os humanos: *Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum.* O ciclo de transmissão requer a contaminação da superfície da água por excretas, especificamente por lesmas de água doce que são hospedeiros intermediários, e humanos contaminados com a água (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS, 2012).

O controle da esquistossomose se baseia principalmente no saneamento básico e educação em saúde, controle das lesmas, e sobretudo, no tratamento com medicamentos (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS, 2012). Vacinas ainda não foram elaboradas, e a eficácia do tratamento é limitada ao praziquantel (PZQ), com uso liberado em 1970. Entretanto, o *Schistosoma* desenvolveu resistência ao tratamento com esta droga (FALLON; DOENHOFF, 1994; ISMAIL et al., 1996). O desenvolvimento de um novo,

seguro, e mais efetivo composto antiesquistossomico trata-se de um desafio permanente porque estas drogas não são prioridades para a indústria farmacêutica.

O uso de produtos naturais tem tradição na medicina, e eles se mostram componentes importantes para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2010. Dentre os componentes naturais, terpenos têm atividade de amplo espectro contra agentes infectantes como vírus, bactérias, fungos e protozoários, parasitas e helmintos (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; MAIMONE; BARAN, 2007). A revisão de outros autores enfatiza que alguns terpenos são mais reportados na atividade contra o *Schistosoma* (DE MORAES, 2015).

Diferentes ferramentas computacionais de química têm sido desenvolvidas para entender e predizer a atividade biológica de novos compostos, especialmente com o objetivo de determinar a atividade biológica específica (SCHUSTER; WOLBER, 2010). Entretanto, apesar dos diversos anos de experimentos destinados a encontrar o modo de ação do PZQ, a identificação precisa e localização do alvo molecular da droga ainda são indefinidos (ARAGON et al., 2009; CIOLI, 2014).

Nesse estudo, 40 terpenos foram selecionados para testes biológicos em casais vermes adultos machos e fêmeas do *Schistosoma mansoni.* Em seguida, foram incubados com diferentes concentrações dos compostos. A atividade biológica do dimetil-octanol, também chamado de dihidrocitronelol, foi revelada *in vitro* (composto 10) que foi o terpeno mais ativo, assim, investigamos a atividade esquistossomicida mais importante. Finalmente, para melhor entender a atividade dos compostos, a análise da estrutura e molecular foi executada para comparar a estrutura molecular do composto 10 com terpenos inativos e procurar algumas características comuns.

2 Métodos

2.1 Compostos e reagentes

Todos os terpenos (tabela 1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o PZQ da Merck. As drogas foram dissolvidas em dimetil sulfóxido. Os vermes foram cultivados em meio RPMI – 1640 contendo vermelho de fenol e L-glutamina, soro bovino fetal inativado pelo calor, penicilina G, e sulfato de estreptomicina obtidos de Vitrocell. O ácido HEPES e DMSO foram obtidos de Sigma-Aldrich.

2.2 Análise estrutural e propriedades moleculares

Utilizou-se um grupo de 40 terpenos relatados de diferentes classes (tabela 1); todas estruturas do grupo foram construídas e geradas em 3D usando o MarvinSketch e ChemAxon. Propriedades estruturais e moleculares foram calculadas com a ferramenta de internet Molinspiration Property Engine. O momento dipolo foi calculado com a designação das interações de Van der Waals.

2.3 Manutenção de animais e parasitas

Schistosoma mansoni foi obtido de forma experimental para a infecção de hamsters *Mesocricetus auratus* seguindo os padrões produzidos por nosso laboratório. Animais com 3 semanas de idade foram infectados por injeção via subcutânea com aproximadamente 150 cercárias de *S. mansoni* cada, o que resultou da infecção dos hospedeiros intermediários lesmas do tipo *Biomphalaria glabrata* (DE MORAES, 2012). Os roedores foram mantidos com livre acesso para dieta e água. Para os estudos *in vitro*, o esquistossomas foram coletados da veia porta hepática e das veias mesentéricas de hamsters infectados com 7 semanas após a infecção (SMITHERS; TERRY, 1965). A coleta recente foi colocada no meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10 % de soro bovino fetal contendo 200 UI/mL de penicilina e 200µg/mL de streptomicina a 37 ºC, 5 % CO_2 até o uso.

2.4 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Piauí, PI, Brasil (número de aprovação 013/11). Todos os animais foram cuidados em rígido acordo de boas práticas com animais definidos pela UFPI, de acordo com a legislação brasileira (Comissão de ética de uso de animais, CEUA).

2.5 Análise esquistossomicida *in vitro*

Os testes com drogas no verme adulto foram realizados conforme previamente relatados (DE MORAES et al., 2014; CARVALHO et al., 2014). Um par de vermes foi adicionado para poços de cultura com 24 poços contendo o previamente mencionado RPMI 1640. Na primeira etapa, todos os componentes foram testados na concentração de 100 μM nas porções de cultura com volume final de 2 mL. Posteriormente, o composto de maior atividade, o dihidrocitronelol, foi utilizado para obter as concentrações finais do teste de 10 a 160 μM (DE MORAES et al., 2015). Os controles negativos continham os vermes cultivados em RPMI puro e RPMI com 0,5 % DMSO. O controle positivo continha vermes cultivados no PZQ a 3 μM. As culturas foram incubadas a 37 ºC e 5 % CO_2, e os parasitas mantidos por 120 h e monitorados 24h por dia usando um microscópio invertido. O efeito do medicamento foi avaliado com ênfase na mudança da atividade motora dos vermes e alteração do tegumento. A mortalidade dos vermes foi avaliada por falta de movimento (DE MORAES et al., 2014; SILVA et al., 2014).

2.6 Estudos de microscopia confocal de varredura a laser

O efeito do dihidrocitronelol no tegumento do *S. mansoni* adulto foi observado usando a microscopia confocal de varredura a laser. Após a morte, os helmintos foram fixados em FAA (fixador composto de formaldeído, ácido acético e etanol) e analisados sob um microscópio confocal (CARVALHO et al., 2014; DE MORAES et al., 2015). Autofluorescência foi estimulada a 488 nm a partir de um laser de argônio, a luz emitida foi coletada a 505 nm (DE MORAES et al., 2009).

Para avaliação de mudanças no tegumento dos parasitas, obtiveram-se imagens tridimensionais de microscopia confocal a laser que foram utilizadas para um método quantitativo, de acordo com procedimentos convencionais (DE MORAES et al., 2013a; DE MORAES et al., 2011a). Durante as análises microscópicas, o número de tubérculos intactos na superfície dorsal dos parasitas machos foram contados em área de 20000 μm^2.

2.7 Análises estatísticas

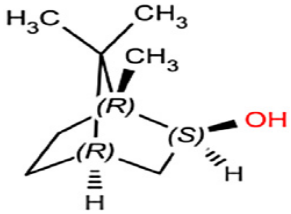
Os testes estatísticos foram realizados com o software Graphpad Prism. Diferenças significativas foram determinadas com aplicação do teste Turkey's para múltiplas comparações. Um valor de $p<0,05$ foi considerado significante e as concentrações inibitórias 50% (IC_{50}) também foram calculadas utilizando as curvas de dose resposta. Os de intervalos de confiança 95% foram incluídos em parênteses.

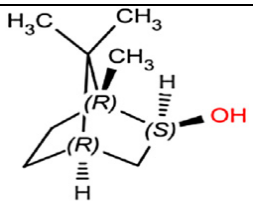
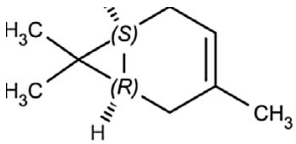
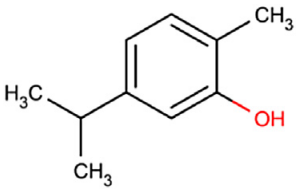
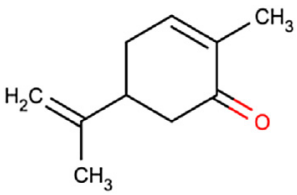
3. Resultados e discussão

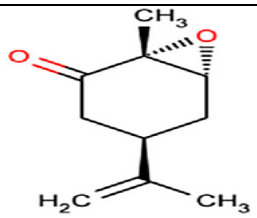
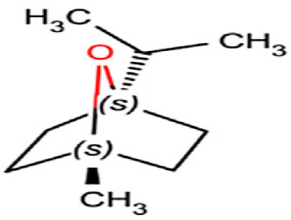
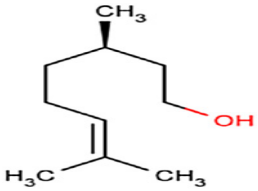
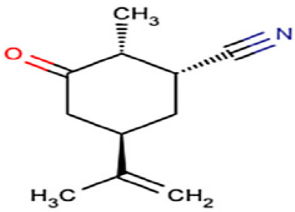
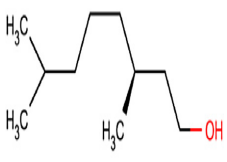
3.1 Compostos

O grupo com 40 terpenos, no qual tem o grupo hidroxila associado por ligação hidrofóbica ou um sítio de aceptor (Tabela 1) foram rastreados para sua segurança (por exemplo, ausência de toxicidade aguda nas células dos mamíferos) e facilidade de sua aquisição. Além disso, 9 dos 10 podem ser considerados um *Pan Assay Interference Compound* (PAIN) já que eles possuem 9 atividades misturadas. Além disso, todos os compostos do grupo são bem caracterizados e estudados e são amplamente aplicados na medicina alternativa, nutricional e na indústria farmacêutica.

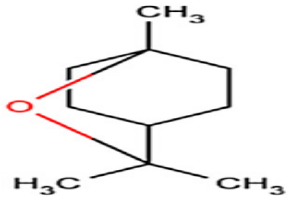
Tabela 1. Conjunto de compostos e parâmetros estruturais

Monoterpenos	Estrutura Molecular 2D	Parâmetros Estruturais e Moleculares	
1		MilogP	**2,35**
		N° átomos	**11**
		MW	**154,25**
		Área Superf.	**200,1 Å^2 (ds=8,0Å)**
		Valor médio	**-0,0020±0,0251**
		Área polar (PSA)	**44,3Å^2(apolar = 293,9Å^2)**
		Valor médio	**-4,9820±0,4574**
	-(-)Borneol		

2	 (+)-borneol	MilogP TPSA N° átomos MW Área Superf. Valor médio Área polar (PSA) Valor médio	**2,35** **20,23** **11** **154,25** **200,1 Å2 (ds=8,0Å)** **-0,0020±0,0251** **44,3Å^2(apolar = 293,9 Å2)** **-4,9820±0,4574**
3	 (+)-3-careno	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 346,8 Å^2)** **Valor médio**	**3,45** **10** **136,24** **187,8 Å^2 (ds=7,7Å)** **-0,017±0,0089** **0,0Å^2** **-5,1520±0,4416**
4	 Carvacrol	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 346,8 Å2)** **Valor médio**	**3,815** **11,0** **150,221** **215,3 Å^2 (ds=8,3 Å)** **-0,0008±0,0189** **73,5 Å^2** **-3,2943±0,2560**
5	 Carvona	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 429,7 Å^2)** **Valor médio**	**2,513** **11,0** **150,221** **216,4 Å2 (ds=8,3 Å)** **0,0004±0,0376** **90,7 Å^2** **-3,4348±0,2064**
6		**MilogP** **N°atomos** **MW**	**1,713** **12,0** **166,22**

7		**Área Super** 216,9 Å^2 (ds=8,3 Å) **Valor Médio** 0,0004±0,0320 **Área Polar (PSA)** 95,8 Å^2 **(apolar = 426,0 Å^2)** **Valor médio** -3,4295±0,2094
8	 1,4- Cineol	**MilogP** 2,72 **TPSA** 9,23 **N°atomos** 11 **MW** 154,25 **Área Super** 211,0 Å^2 (ds=8,2Å) **Valor Médio** -0,0059±0,0357 **Área Polar (PSA)** 4,6Å^2 **(apolar = 351,7 Å^2)** **Valor médio** -5,2724±0,3856
9	 Citronelol	**MilogP** 3,152 **N°atomos** 11,0 **MW** 156,269 **Área Super** 242,9 Å^2 (ds=8,8 Å) **Valor Médio** 0,0002±0,0202 **Área Polar (PSA)** 89,9 Å^2 **(apolar = 481,7 Å^2)** **Valor médio** -4,0699±0,4337
10	 Ciano-carvona	**MilogP** 2,348 **N°atomos** 13,0 **MW** 177,247 **Área Super** 231,3 Å^2 (ds=8,6 Å) **Valor Médio** 0,0034±0,0282 **Área Polar (PSA)** 136,3 Å^2 **(apolar = 407,5 Å^2)** **Valor médio** -3,6679±0,2452
	 3,7- dimetil-1-octanol	**MilogP** 3,126 **N°atomos** 11,0 **MW** 158,285 **Área Super** 253,6 Å^2 (ds=9,0 Å) **Valor Médio** -0,0011±0,0198 **Área Polar (PSA)** 99,9 Å^2 **(apolar = 502,5 Å^2)** **Valor médio** -4,2963±0,4543

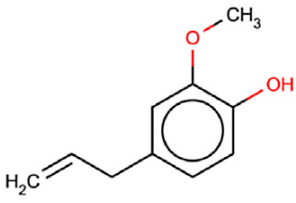
11



Eucaliptol

MilogP	**2,716**
N°atomos	**11,0**
MW	**154,253**
Área Super	**207,0 Å^2 (ds=8,1 Å)**
Valor Médio	**-0,0029±0,0221**
Área Polar (PSA)	**4,4 Å^2**
(apolar = 505,0 Å^2)	
Valor médio	**-4,2495±0,1142**

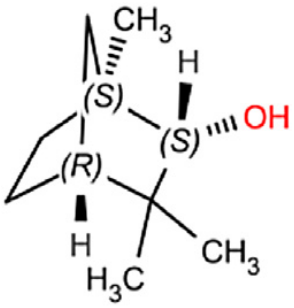
12



o-eugenol

MilogP	**2,10**
TPSA	**29,46**
MW	**164,20**
Área Super	**241,9 Å^2 (ds=8,8 Å)**
Valor Médio	**-0,0012±0,0435**
Área Polar (PSA)	**66,6 Å^2**
(apolar = 371,7 Å^2)	
Valor médio	**-3,1853±0,5627**

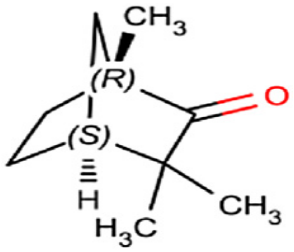
13



(+)-Fenchol

MilogP	**2,35**
N°atomos	**11**
MW	**154,25**
Área Super	**200,5 Å^2 (ds=8,0 Å)**
Valor Médio	**-0,0014±0,0247**
Área Polar (PSA)	**32,2 Å^2**
(apolar = 307,9 Å^2)	
Valor médio	**-4,9608±0,3719**

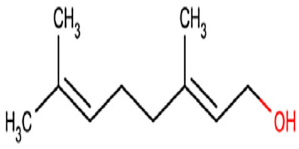
14



(+)-fenchona

MilogP	**2,16**
N°atomos	**11**
MW	**152,24**
Área Super	**201,0 Å^2 (ds=8,0 Å)**
Valor Médio	**0,0020±0,0305**
Área Polar (PSA)	**32,4 Å^2**
(apolar = 304,9 Å^2)	
Valor médio	**-4,9752±0,3404**

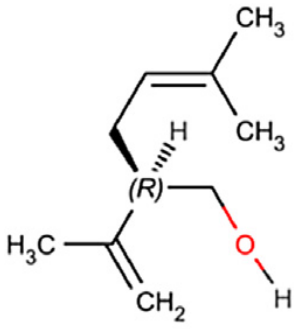
15



Geraniol

MilogP	**3,202**
N°atomos	**11,0**
MW	**152,253**
Área Super	**236,8 Å^2 (ds=8,7 Å)**
Valor Médio	**-0,0023±0,0209**
Área Polar (PSA)	**76,1 Å^2**
(apolar = 483,4 Å^2)	
Valor médio	**-3,7782±0,3924**

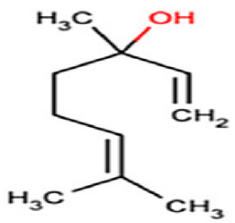
16



Lavandulol

MilogP	**3,19**
N°atomos	**11**
MW	**154,25**
Área Super	**222,2 Å^2 (ds=8,4 Å)**
Valor Médio	**-0,0007±0,0266**
Área Polar (PSA)	**54,7 Å^2**
(apolar = 334,2 Å^2)	
Valor médio	**-4,7202±0,6196**

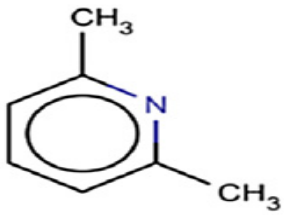
17



Linalol

MilogP	**3,213**
N°atomos	**11,0**
MW	**154,253**
Área Super	**216,4 Å^2 (ds=8,3 Å)**
Valor Médio	**0,0004±0,0376**
Área Polar (PSA)	**90,7 Å^2**
(apolar = 429,7 Å^2)	
Valor médio	**-3,4348±0,2064**

18

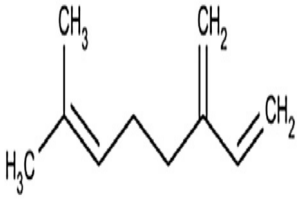
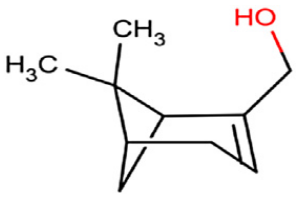
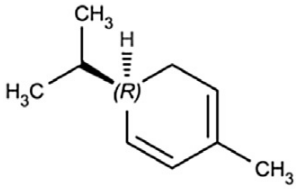
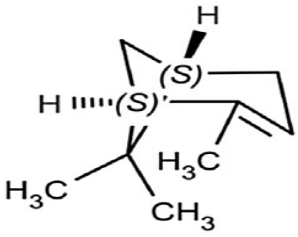


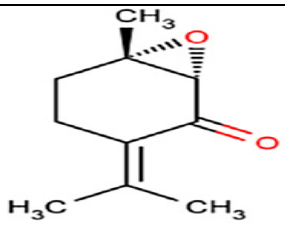
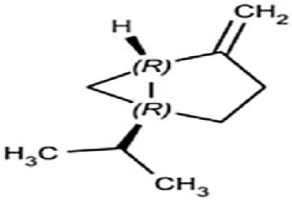
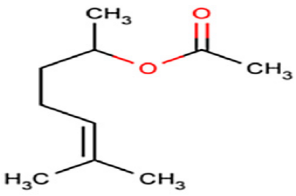
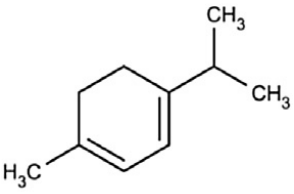
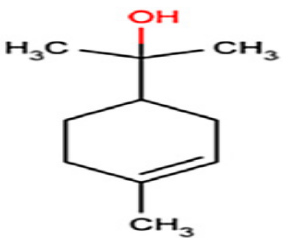
2,6-Lutidina

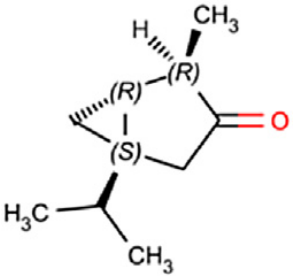
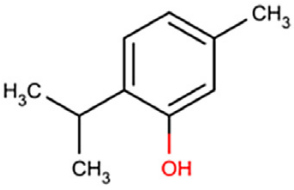
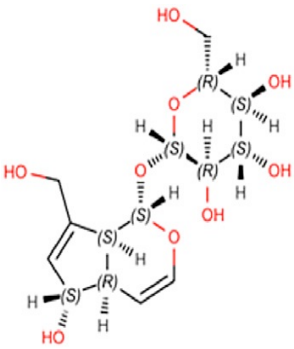
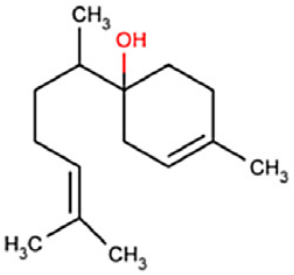
MilogP	**0,80**
N°atomos	**8**
MW	**107,16**
Área Super	**147,5 Å^2 (ds=6,9 Å)**
Valor Médio	**-0,0027±0,0305**
Área Polar (PSA)	**11,5 Å^2**
(apolar = 282,8 Å^2)	
Valor médio	**-3,1611±0,2478**

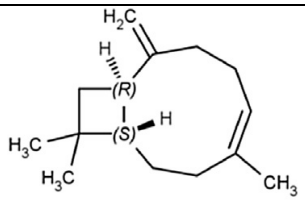
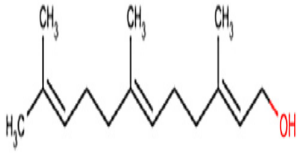
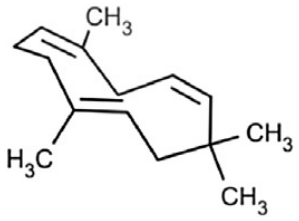
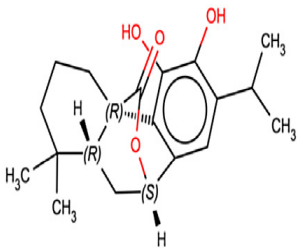
19

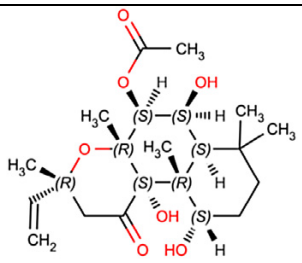
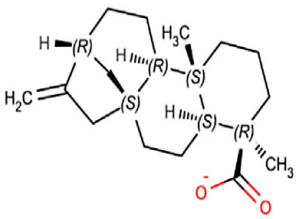
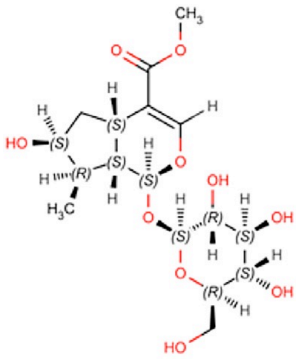
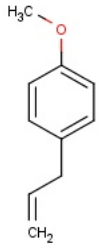
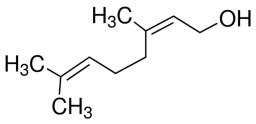
MilogP	**-3,99**

	 B- mirceno	**N°atomos**	**10**
		MW	**136,24**
		Área Super	**104,2 Å^2 (ds=5,8 Å)**
		Valor Médio	**-0,0001±0,0058**
		Área Polar (PSA)	**0,0 Å^2**
		(apolar = 243,0 Å^2)	
		Valor médio	**-2,3520±0,2563**
20	 Mirtenol	**MilogP**	**2,301**
		N°atomos	**11,0**
		MW	**152,237**
		Área Super	**205,2 Å^2 (ds=8,1 Å)**
		Valor Médio	**-0,0021±0,00217**
		Área Polar (PSA)	**71,6 Å^2**
		(apolar = 432,6 Å^2)	
		Valor médio	**-3,6407±0,2843**
21	 α-felandreno	**MilogP**	**3,79**
		N°atomos	**10**
		MW	**136,24**
		Área Super	**197,0 Å^2 (ds=7,9 Å)**
		Valor Médio	**-0,0026±0,0120**
		Área Polar (PSA)	**0,0 Å^2**
		(apolar = 357,2 Å^2)	
		Valor médio	**-5,1542±0,4306**
22	 α-pineno	**MilogP**	**3,54**
		N°atomos	**10**
		MW	**136,24**
		Área Super	**186,4 Å^2 (ds=7,7 Å)**
		Valor Médio	**-0,0027±0,0090**
		Área Polar (PSA)	**0,0 Å^2**
		(apolar = 345,1 Å^2)	
		Valor médio	**-5,2388±0,3606**
23		**MilogP**	**1,765**
		N°atomos	**12,0**
		MW	**166,22**
		Área Super	**216,4 Å^2 (ds=8,3 Å)**
		Valor Médio	**0,0004±0,0376**

24	 Rotundifolona	**Área Polar (PSA)** **(apolar = 429,7 Å^2)** **Valor médio**	**90,7 Å^2** **-3,4348±0,2064**
25	 Sabinene	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 344,5 Å^2)** **Valor médio**	**3,10** **10** **136,24** **196,2 Å^2 (ds=7,9 Å)** **-0,0016±0,0088** **0,0 Å^2** **-5,1537±0,4224**
26	 Acetato de sucatil	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 528,4 Å^2)** **Valor médio**	**3,202** **12,0** **170,252** **253,4 Å^2 (ds=9,0 Å)** **-0,0037±0,0204** **51,1 Å^2** **-3,8614±0,3195**
27	 α-terpineno	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 356,4 Å^2)** **Valor médio**	**3,36** **10** **136,24** **201,1 Å^2 (ds=8,0 Å)** **-0,0023±0,0121** **0,0 Å^2** **-5,0965±0,4597**
28	 α-terpineol	**MilogP** **N°atomos** **MW** **Área Super** **Valor Médio** **Área Polar (PSA)** **(apolar = 479,8 Å^2)** **Valor médio** **MilogP** **N°atomos**	**2,6** **11,0** **154,253** **219,5 Å^2 (ds=8,4 Å)** **-0,0019±0,0201** **52,8 Å^2** **-3,8799±0,2399** **2,16** **11**

	 (-)-α-thujone	**MW** 152,24 **Área Super** 208,7 Å^2 (ds=8,1 Å) **Valor Médio** 0,0063±0,0391 **Área Polar (PSA)** 45,6 Å^2 **(apolar = 307,5 Å^2)** **Valor médio** -4,9361±0,4495
29	 Timol	**MilogP** 3,342 **N°atomos** 11,0 **MW** 150,221 **Área Super** 214,7 Å^2 (ds=8,3 Å) **Valor Médio** -0,0011±0,0190 **Área Polar (PSA)** 67,6 Å^2 **(apolar = 450,4 Å^2)** **Valor médio** -3,2943±0,2183
30	 Aucubina	**MilogP** -2,25 **N°atomos** 24 **MW** 346,33 **Área Super** 362,0 Å^2 (ds=10,7 Å) **Valor Médio** 0,0005±0,0413 **Área Polar (PSA)** 292,3 Å^2 **(apolar = 273,4 Å^2)** **Valor médio** -2,6477±0,5969
31	 β-bisabolol	**MilogP** 4,679 **N°atomos** 16,0 **MW** 222,372 **Área Super** 301,6 Å^2 (ds=9,8 Å) **Valor Médio** -0,0026±0,0169 **Área Polar (PSA)** 51,5 Å^2 **(apolar = 618,0 Å^2)** **Valor médio** -5,2572±0,3561

32	 β-cariofileno	**MilogP** 5,17 **TPSA** 0,00 **N°atomos** 15 **MW** 204,36 **Área Super** 117,1 Å^2 (ds=6,1 Å) **Valor Médio** 0,0011±0,0082 **Área Polar (PSA)** 0,0 Å^2 **(apolar = 255,7 Å^2)** **Valor médio** -3,8851±0,4037
33	 Farsenol	**MilogP** 5,04 **N°atomos** 16,0 **MW** 222,372 **Área Super** 326,8 Å^2 (ds=10,2 Å) **Valor Médio** -0,0024±0,0194 **Área Polar (PSA)** 74,9 Å^2 **(apolar = 642,9 Å^2)** **Valor médio** -5,0676±0,5886
34	 α-humuleno	**MilogP** 5,30 **N°atomos** 15 **MW** 204,36 **Área Super** 251,1 Å^2 (ds=8,9 Å) **Valor Médio** -0,0026±0,0101 **Área Polar (PSA)** 0,0 Å^2 **(apolar = 408,1 Å^2)** **Valor médio** -7,1338±0,5534
35	 Carnosol	**MilogP** 4,61 **N°atomos** 24 **MW** 330,42 **Área Super** 349,6 Å^2 (ds=10,5 Å) **Valor Médio** 0,0079±0,1298 **Área Polar (PSA)** 65,9 Å^2 **(apolar = 283,6 Å^2)** **Valor médio** -8,7695±1,4221
		MilogP 1,71 **N°atomos** 29 **MW** 410,51

36	 Forscolina	**Área Super**	**403,9 Å^2 (ds=11,3 Å)**
		Valor Médio	**-0,00285±0,1209**
		Área Polar (PSA)	**91,9 Å^2**
		(apolar = 312,0 Å^2)	
		Valor médio	**-9,1633±1,1826**
37	 Ácido Caurenoico	**MilogP**	**1,95**
		N°atomos	**22**
		MW	**301,45**
		Área Super	**319,9 Å^2 (ds=10,1 Å)**
		Valor Médio	**-0,2185±0,1231**
		Área Polar (PSA)	**60,2 Å^2**
		(apolar = 421,8 Å^2)	
		Valor médio	**-7,9712±0,8589**
38	 Loganino	**MilogP**	**-1,25**
		N°atomos	**27**
		MW	**390,38**
		Área Super	**409,8 Å^2 (ds=11,4 Å)**
		Valor Médio	**-0,0003±0,0383**
		Área Polar (PSA)	**270,2 Å^2**
		(apolar = 366,5 Å^2)	
		Valor médio	**-3,6278±0,7711**
39	 Estragol	**MilogP**	**2,89**
		N°atomos	**23**
		MW	**148,20**
		Área Super	
		Valor Médio	
		Área Polar (PSA)	**9,2**
		Valor médio	
40	 Nerol	**MilogP**	**3,02**
		N°atomos	**29**
		MW	**154.25**
		Área Super	
		Valor Médio	
		Área Polar (PSA)	**20,2**
		Valor médio	

Área Molecular de superfície polar (PSA) e miLogP foram calculados usando o software Molinspiration . Peso Molecular (MW) .Tamanho do ponto (ds).

3.2 Estudos *in vitro*

O efeito anti esquistossomose de todos os terpenos adultos foi avaliado primeiramente na concentração de 100 μM. O efeito dos compostos foi avaliado com ênfase nas mudanças da atividade motora da larva, na viabilidade e na alteração do tegumento. De todos os 40 compostos testados, apenas o composto 10 teve atividade esquistossomicida após o tempo máximo de 120 h em 100 μM. O composto 10, também conhecido por dihidrocitronelol, é um álcool monoterpenico presente nos óleos de rosas (HANIF; QINENG; ZHAN, 1998; LAPCZYNSKI et al., 2008). É um ingrediente aromático usado em muitos compostos de fragrância e é encontrado nos produtos cosméticos e não cosméticos. Por exemplo, até hoje, dihidrocitronelol é usado como cosméticos de decoração, sabonete de banheiro, shampoo, e outros cosméticos, assim como nos detergentes e produtos de limpeza doméstica (LAPCZYNSKI et al., 2008). Foi incluído pelo Council of Europe na lista de substâncias do cargo B, e os compostos foram aprovados pela FDA como um odor. Além disso, o Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives que as substâncias não apresentam preocupação com a segurança. Com base nos dados revisados, a dose oral aguda de DL_{50} de dihidrocitronelol é maior que 5000 mg/kg, indicando que este composto é, na prática, não tóxico.

Dado que o composto 10 foi o mais promissor para estudos computacionais e mais ativo contra cultura de vermes do que outros terpenos, investigamos suas propriedades antiesquistossomodais mais detalhadamente.

3.3 Efeitos do dihidrocitronelol na atividade motora e viabilidade do *S. mansoni*

As atividades do composto em relação à viabilidade do esquistossomo é mostrado na Figura 1. Incubação com o composto 10 nas concentrações maiores que 10 μM reduziu a mobilidade quando comparados com os controles negativos (meio RPMI 1640 ou meio contendo 0,5% de DMSO). O controle positivo (3 μM PZQ) resultou na morte de todos os parasitas dentre 24h. De forma notável, o composto 10 na

concentração de 80 µM resultou na morte de 100 % dos parasitas dentre 24h, e 20µM matou os vermes em 120h (Figura 1). Valores de IC_{50} de 52, 35 µM (40, 52 – 55,02) e 13,61 µM (10,12 -15,38) foram calculados para dihidrocitronelol após 24 h e 120 h, respectivamente.

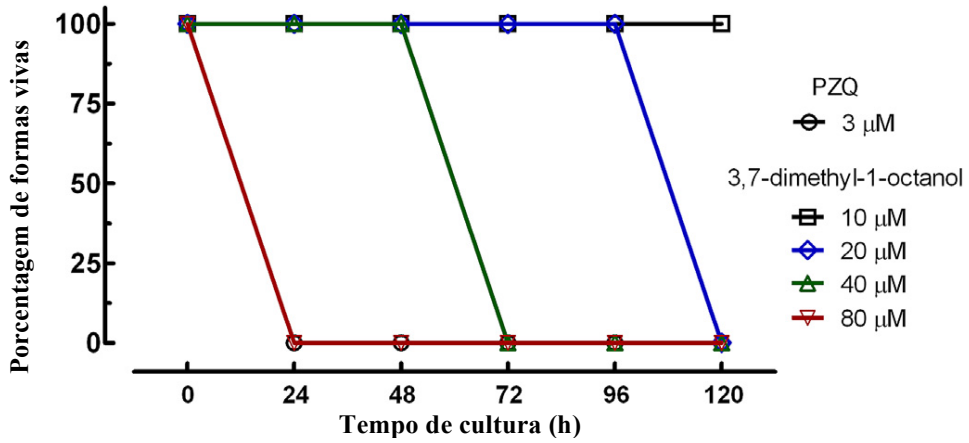


Figura 1. Efeito *in vitro* do dihidrocitronelol sobre a sobrevivência de vermes . Nestas experiências, os pares de vermes adultos foram incubados em cultura de 24 poços de placas contendo meio RPMI 1640. O praziquantel foi utilizado como controle positivo. A percentagem mostrada é de 20 parasitas.

Durante o período de incubação com o composto 10, os parasitas permaneceram acoplados e nenhuma diferença significativa foi observada na taxa de mortalidade entre fêmeas e machos parasitas. Diferenças na susceptibilidade entre *S. mansoni* machos e fêmeas tem sido descritas na literatura anterior. Por exemplo, estudos com o nerolidol mostraram que vermes masculinos são mais suscetíveis do que as fêmeas (SILVA et al., 2014), e estudos com o fitol de terpenos mostraram que as fêmeas foram mais suscetíveis que os machos (DE MORAES et al., 2014). Neste estudo, tanto esquistossomos masculinos como femininos foram sensíveis à ação de dihidrocitronelol.

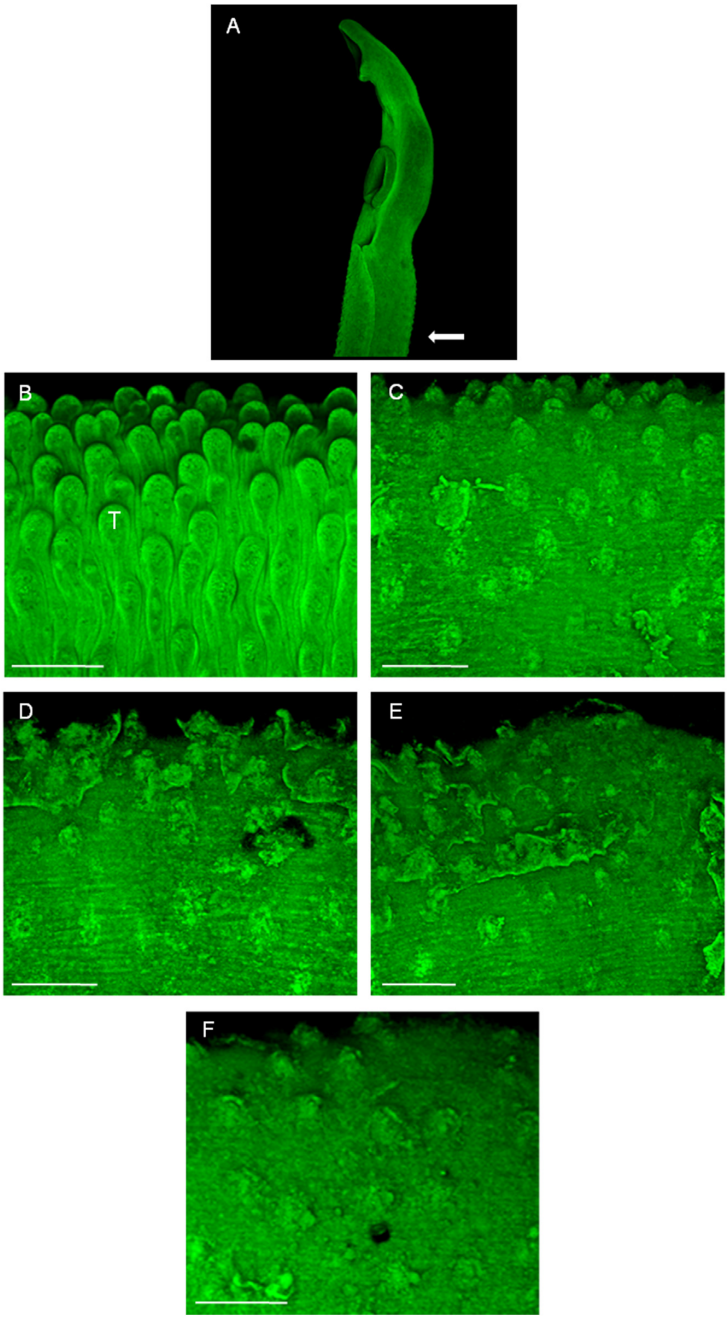
Resultados semelhantes, não mostraram nenhuma diferença entre machos e fêmeas, com terpenos como (+) –epóxido de limoneno (DE MORAES et al., 2013b) e acetato de carvacril (DE MORAES et al., 2013c) ou com outros metabólitos secundários de plantas com o alcaloide epiisopiloturine (VERAS et al., 2012), a amida piplartina (DE MORAES et al., 2011b) e a composição benzofenona garcinielliptone FC (SILVAet al., 2015).

3.4. Efeito de dihidrocitronelol no tegumento de *S. mansoni*

Para entender melhor os efeitos do composto 10 sobre o tegumento do verme, a interface entre hospedeiro e parasita, usamos um microscópio laser confocal para examinar a superfície de vermes sob diferentes concentrações.

Os resultados da microscopia confocal de *S. mansoni* tratados com o composto 10 e grupo controle são apresentados na Fig. 2. Formas adultas de *S. mansoni* pertencentes ao grupo controle negativo mostraram intacta estrutura de superfície e topografia (Fig. 2A). Em contraste, o tratamento de esquistossomas adultos com composto 10, levou a uma mudança acentuada no aspecto dos tubérculos, que muitas vezes apareceu em colapso e perturbada. Além disso, houve evidente descamação na superfície tegumentar. Estas alterações morfológicas no tegumento ocorreram de forma concentração-dependente (Fig 2B e E). Para parasitas expostas a PZQ em 3μM, observou-se interrupção substancial do tegumento, e todos os vermes examinados mostraram extensa descamação e erosão da superfície (Fig. 2F).

Figura 2. Investigação de Microscopia de *Schistosoma mansoni* do sexo masculino após incubação *in vitro* com dihidrocitronelol.



Nestas experiências, os pares de vermes adultos foram incubados em placas de cultura de 24 poços contendo meio RPMI 1640 e tratados com diferentes concentrações de dihidrocitronelol. A: Visão geral da região anterior do verme mostrando o local onde tegumento foi analisado (seta) B: Controle negativo (RPMI 1640); tubérculos tegumentares dorsais mostrando superfície (T). C: tratado com dihidrocitronelol 20 mM. D: tratado com dihidrocitronelol 40 mM . E: verme tratado com dihidrocitronelol 80 mM. E: Controle positivo (PZQ 3 mM). As imagens de autofluorescência verde dos parasitas foram obtidas por microscopia confocal à laser. As barras em escala ¼ 50 mm.

Figura 3. Análise quantitativa das alterações morfológicas no tegumento do *S. mansoni* após exposição a dihidrocitronelol

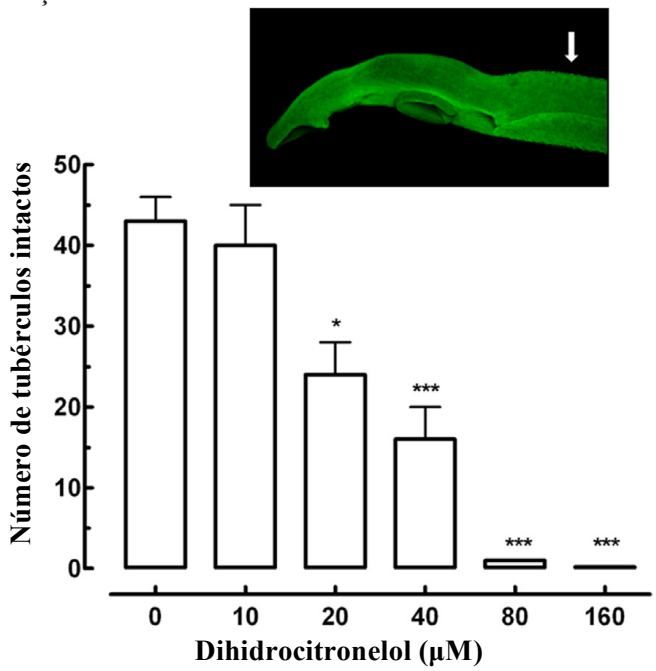


Figura 3. Análise quantitativa das alterações morfológicas no tegumento do *S. mansoni* após exposição a dihidrocitronelol. A quantificação do número de tubérculos foi realizada utilizando imagens tridimensionais obtidas a partir de microscopia de varredura confocal a laser. O número de tubérculos intactos são indicadas, e estes números foram medidos em 20.000 mm^2 de área numa região dorsal do verme adulto do sexo masculino (seta), e calculados com o software Image Browser Zeiss LSM . Um mínimo de três áreas do tegumento de cada parasita foram avaliados. Os valores são médias ± DP (barras) de 10 vermes adultos do sexo masculino. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo não tratado.

Considerando que o composto 10 causou mudanças nos tubérculos de *S. mansoni* de forma concentração-dependente, também realizamos uma análise quantitativa contando os tubérculos na superfície dorsal dos parasitas machos usando microscopia confocal, seguindo os procedimentos padrão, apresentados em outro lugar (DE MORAES et al., 2014; DE MORAES et al., 2013b). Como mostrado na Fig. 3, o composto 10 causou mudanças nos tubérculos de vermes masculinos e quase nenhum tubérculo intacto foi visto nas maiores concentrações utilizadas (80 e 160 µM).

Alterações induzidas por diversos compostos no tegumento de *S. mansoni* também têm sido descritos (DE MORAES et al., 2014; EL RIDI et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, alguns estudos têm demonstrado o efeito de compostos naturais, de forma dose-dependente, causando mudanças no número de tubérculos (DE MORAES et al., 2013c).

3.5. Análise estrutural e propriedades moleculares

Como mencionado aqui, o completo mecanismo de ação de PZQ é ainda incerto (CIOLI, 2014; CHAN; ZAROWIECKI; MARCHANT, 2013), de modo que seu alvo molecular permanece desconhecido (SALVADOR-RECATAL; GREENBERG, 2012). O mesmo ocorre com outros terpenos com atividade antiesquistossomal contra *S. mansoni* (DE MORAES et al., 2013c; RAMALHETE et al., 2012). No entanto, é conhecido que alguns terpenos podem facilmente atravessar o tegumento do verme e causar a sua destruição (DE MORAES et al., 2014; DE MORAES et al., 2013c). No presente estudo, verificou-se uma relação entre danos tegumentares e a morte dos vermes, mas o mecanismo detalhado da ação do composto 10 na esquistossomose continua a ser investigado.

Para entender melhor o comportamento do composto 10, dados estruturais como potencial molecular eletrostática (MEP) da área de superfície, superfície polar (PSA) e Lipofilicidade (miLogP) foram calculado com base no método Molinspiration. Entre as moléculas estudadas, o composto 10 apresenta 11 átomos, e tem uma área grande e apolar na extremidade, como compostos de 8 e 15. A principal diferença entre estes álcoois de cadeia aberta encontra-se nos carbonos saturados em 10. É importante notar que sua superfície não é permeada por áreas polares, concentrou-se no final da cadeia, o que melhorou o momento dipolar (8 = 1.5024; 10 = 16023; 15 = 0.1280 Debye). Esse recurso como surfactante do composto 10 pode chamar atenção e a principal diferença de todos os outros terpenos. Outra característica importante que deve ser observada é que o composto 10 tem pelo menos uma cadeia ramificada, única entre todos os terpenos estudados. Além disso, para moléculas com o mesmo número de átomos, o composto 10 é aquele com o maior número de títulos rotativos, envolvendo uma maior mobilidade para se adaptar a uma cavidade de sítio ativo.

3.6 Conclusão

Neste estudo, avaliamos o potencial de antiesquistossomo de 40 terpenos. A avaliação da triagem biológica resultou na identificação de um terpeno, 3,7-dimetil-1-octanol (dihidrocitronelol). Semelhante a praziquantel, mas em concentrações diferentes, o dihidrocitronelol foi capaz de matar os parasitas, e a análise microscópica confocal à laser revelou danos tegumentares de *S. mansoni* de forma concentração e

tempo dependente. Considerando que o dihidrocitronelol é seguro, com baixa toxicidade e alta tolerância nos mamíferos, os resultados descritos aqui confirmam o potencial do dihidrocitronelol como um novo composto esquistossomicida. Entretanto, mais estudos, principalmente ensaios *in vivo*, são necessários para determinar completamente o potencial de dihidrocitronelol para tratar a esquistossomose e para elucidar o seu modo de ação.

Referências

ARAGON, A.D.; IMANI, R.A.; BLACKBURN, V.R.; CUPIT, P.M.; MELMAN, S.D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E.S.; CUNNINGHAMA, C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Mol. Biochem. Parasito**l., v.164, n.1, p.57-65, 2009.

BAELL, J.; WALTERS, M.A. Chemistry: chemical con artists foil drug discovery. **Nature**, v.513, p.481-483, 2014

CARVALHO, A.A.; MAFUD, A.C.; PINTO, P.L.; MASCARENHAS, Y.P.; DE MORAES, J. Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.44, n.4, p.372-374, 2014.

CHAN, J.D.; ZAROWIECKI, M.; MARCHANT, J.S. $Ca2^{+}$ channels and praziquantel: a view from the free world. **Parasitol. Int**., v.62, n.6, p.619-628, 2013.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol**., v.195, n.1, p.23-29, 2014.

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human schistosomiasis. **Lancet**, v.383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

DE MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens, in: A.J. Rodriguez-Morales (Ed.), **Current Topics in Tropical Medicine**, **InTech**, p.333-358, 2012.

DE MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Med. Chem**., v.7, n.6, p.801-820, 2015.

DE MORAES, J.; ALMEIDA, A.A.; BRITO, M.R.; MARQUES, T.H.; LIMA, T.C.; SOUSA, D.P.; NAKANO, E.; MENDONÇA, R.Z; FREITAS, R.M. Anthelmintic activity of the natural compound (.)-limonene epoxide against Schistosoma mansoni. **Planta Med**., v.79, n.3-4, p.253-258, 2013b.

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

DE MORAES, J.; DARIO, B.S.; COUTO, R.A.; PINTO, P.L.; DA COSTA FERREIRA, A.M. Antischistosomal activity of oxindolimine-metal complexes. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.59, n.10, p.6648-6652, 2015.

DE MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S.M.; PINTO, P.L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLoS Negl. Trop. Dis**., v.8, n.1, p. 2617, 2014.

DE MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L.F.; BITTENCOURT, C.R.; BEMQUERER, M.P.; LEITE, J.R.; KATO, M.J.; NAKANO, E. In vitro synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against Schistosoma mansoni schistosomula and adult worms. **Curr. Med. Chem**., v.20, n.2, p.301-309, 2013a.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Exp. Parasitol**., v.127, n.2, p.357-364. 2011b.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L.M.; LEITE, J.R.; NAKANO, E. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against Schistosoma mansoni. **Chem. Biodivers.**, v.8, n.3, p.548-558. Março 2011a.

DE MORAES, J.; SILVA, M.P.; OHLWEILER, F.P.; KAWANO, T. Schistosoma mansoni and other larval trematodes in Biomphalaria tenagophila (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo, State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**., São Paulo, v.51, n.2, p.77-82, 2009.

DE OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.; OLIVEIRA, A.S.; DE L. JERALDO, V.; LINHARES, A.X.; ALLEGRETTI, S.M. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of Baccharis trimera (Less) DC against immature and adult worms of Schistosoma mansoni. **Exp. Parasitol**., v.139, p.63-72, 2014.

EL RIDI, R.; ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA, H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S.H.; FAHMY, O.M. In vitro and in vivo activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*, **Antimicrob. Agents Chemother**., v.54, n.8, p.3383-3389, 2010.

FALLON, P.G.; DOENHOFF, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v.51, n.1, p.83-88, 1994.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am**., v.26, n. 2, p.383-397, 2012.

HANIF, R.M.L.; QINENG, P.; ZHAN, G. Penetration enhancing effect of tetrahydrogeraniol on the percutaneous absorption of 5-fluorouracil from gels in excised rat skin. **J. Control Release**, v.55, n.2-3, p.297-302. Novembro 1998.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L.F.; BENNETT, J.L. Characterization of isolates of Schistosoma mansoni from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v.55, n.2, p.214-218, 1996.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol. Res**., v.90 Suppl 2:S55-S62, 2003.

LAPCZYNSKI, A.L.; BHATIA, S.P.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on 3,7-dimethyl-1-octanol. **Food Chem. Toxicol**., v.46, Suppl.11: S139-S141, 2008.

MAIMONE, T.J.; BARAN, P.S. Modern synthesis efforts toward biologically active terpenes. **Nat. Chem. Biol**., v.3, n.7, p.396-407, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod**., v.75, n.3, p.311-335, 2012.

RAMALHETE, C.; MAGALHÃES, L.G.; RODRIGUES, V.; MULHOVO, S.; DA SILVA FILHO, A.A.; FERREIRA, M.J.U. In vitro schistosomicidal activity of balsaminol F and karavilagenin C. **Planta Med**., v.78, n.18, p.1912-1917, 2012.

RIFM EXPERT, P.; BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; TAGAMI, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. **Food Chem. Toxicol**., v.46, Suppl.11:S1-S71, 2008.

SALVADOR-RECATAL, V.; GREENBERG, A, R.M. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers, Wiley Interdiscip. **Rev. Membr. Transp. Signal**, v.1, n.1, p.85-93, 2012.

SCHUSTER, D.; WOLBER, G. Identification of bioactive natural products by pharmacophore-based virtual screening. **Curr. Pharm. Des**., v.16, n.15, p.1666-1681. Março 2010.

SILVA, A.P.; SILVA, M.P.; OLIVEIRA, C.G.; MONTEIRO, D.C.; PINTO, P.L.; MENDONÇA, R.Z.; COSTA JUNIOR, J.S.; FREITAS, R.M.; DE MORAES, J. Garcinielliptone FC: antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Toxicol. Vitro**, v.29, n.4, p.681-687, 2015.

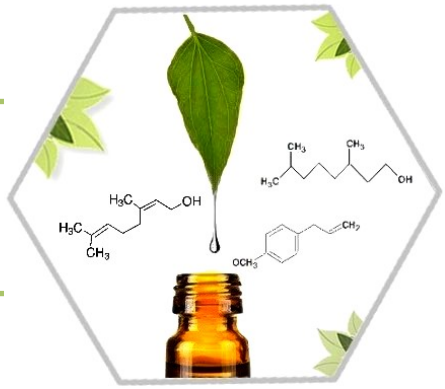
SILVA, M.P.; OLIVEIRA, G.L.; DE CARVALHO, R.B.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; PINTO, P.L.; DE MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v.19, n.3, p.3793-3803, 2014.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. **Parasitology**, v.55, n.4, p.695-700, 1965.

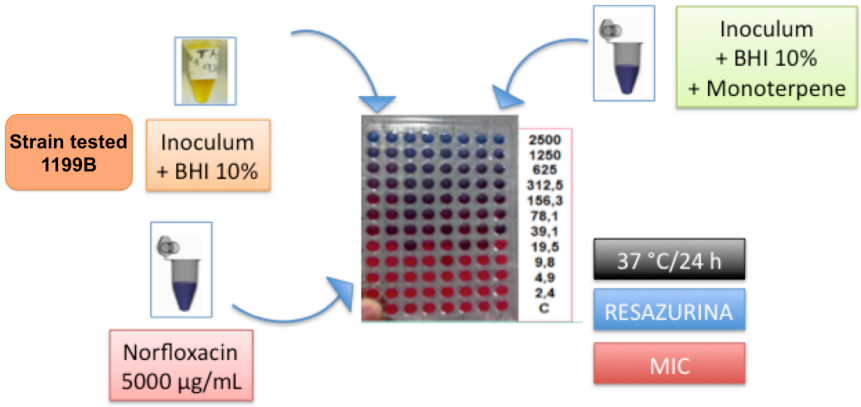
STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect**. **Dis**., v.6, n. 7, p.411-425, 2006.

VERAS, L.M.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPELO, Y.D.; VIEIRA, M.M.; NASCIMENTO, C.; MORAES, A.C. J. Activity of epiisopiloturine against Schistosoma mansoni. **Curr. Med.Chem**., v.19, v.13, p.2051-2058, 2012.

Capítulo V



Capítulo V – Atividade antimicrobiana e inibidora do transportador multi-droga NorA por monoterpenos oxigenados



Artigo publicado – Microbial Pathogenesis – Qualis B1 Biotecnologia

Capítulo V - Atividade antimicrobiana e inibidora do transportador multi-droga NorA por monoterpenos oxigenados

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana intrínseca de três monoterpenos, dimetil-octanol, estragol e nerol, contra bactérias e leveduras, bem como, investigar se estes compostos são capazes de inibir a bomba de efluxo NorA relacionada com a resistência de fluoroquinolona em *Staphylococcus aureus*. Concentrações inibidoras mínimas (CIMs) dos monoterpenos contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foram determinadas por ensaio de micro-diluição. CIMs de norfloxacina contra uma cepa de *S. aureus* que super-expressa a proteína NorA foram determinados na ausência ou na presença de concentrações sub-inibitórias dos monoterpenos, com o objetivo de verificar a capacidade destes compostos atuarem como inibidores da bomba de efluxo. Os monoterpenos foram inativos contra *S. aureus,* no entanto, o nerol foi ativo contra *E. coli* e *C. albicans*. A adição dos compostos no meio de crescimento, em concentrações subinibitórias aumentou a atividade de norfloxacina contra *S. aureus* SA1199-B. Este resultado mostra que os bioativos testados, especialmente o nerol, são capazes de inibir a bomba de efluxo de *S. aureus* NorA, indicando uma potencial utilização como adjuvantes de norfloxacina no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas.

Palavras-chave: Monoterpeno; fluoroquinolona; NorA; inibidor de bomba de efluxo, resistência bacteriana.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the intrinsic antimicrobial activity of three monoterpenes, dimethyl octanol, estragole and nerol, against bacteria and yeast strains, as well as, investigate if these compounds are able to inhibit the NorA efflux pump related to fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the monoterpenes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* strains were determined by micro-dilution assay. MICs of the norfloxacin against a *S. aureus* strain overexpressing the NorA protein were determined in the absence or in the presence of the monoterpenes at subinhibitory concentrations,

aiming to verify the ability of this compounds act as efflux pump inhibitors. The monoterpenes were inactive against *S. aureus* however the nerol was active against *E. coli* and *C. albicans.* Addition of the compounds in the growth medium at sub-inhibitory concentrations enhanced the activity of norfloxacin against *S. aureus* SA1199-B. This result shows that bioactives tested, especially the nerol, are able to inhibit *S. aureus* efflux pump NorA indicating a potential use as adjuvants of norfloxacin in the treatment of infections caused by multi-drug resistant *S. aureus* strains.

Keywords: Monoterpene; fluoroquinolone; NorA; efflux pump inhibitor, bacterial resistance.

1. Introdução

A prevalência de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes a múltiplas drogas tem aumentado dramaticamente em todo o mundo (LAXMINARAYAN, 2014; BRUSSELAERS; VOGELAERS, BLOT 2011) apesar da larga gama de agentes anti-microbianos disponíveis. As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Escherichia coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas são comumente adquiridas em hospitais e comunidades de todos os países do mundo **(**UHLEMANN et al., 2014; CHUA et al., 2013) As fluoroquinolonas têm sido propostas como uma alternativa possível para a terapia de vancomicina contra infecções por *S. aureus* resistência à meticilina (MRSA) (GADE, QAZI, 2013). No entanto a resistência a esses agentes antibacterianos tornou-se comum e amplamente difundida (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015; VALI et al., 2015; DE LASTOURS et al., 2014).

Fluorquinolonas são capazes de se ligar aos complexos formados entre o DNA e a DNA-girase ou topoisomerase IV. A inativação destas enzimas bacterianas levam a uma rápida inibição da replicação do DNA **(**ALDRED, KERNS, OSHEROFF, 2014). A resistência bacteriana às fluoroquinolonas ocorre devido a uma mutação em um ou mais genes que codificam estas enzimas alvo ou por expressão de bombas de efluxo multidroga capazes de remover ativamente fluoroquinolonas a partir de células bacterianas **(**REDGRAVE et al., 2014; MC GANN P et al., 2013; OPPERMAN et al., 2010). A proteína de efluxo NorA é super-expressa pela estirpe SA1199-B testada no

presente estudo (KAATZ ,SEO, 1995; KAATZ, SEO, 1993). O conhecimento sobre a resistência mediada por bombas de efluxo tem motivado a busca por compostos inibidores de bomba de efluxo (IBE), que conseguem recuperar a eficácia dos antibióticos atuais (MATIAS et al., 2016). Neste sentido, os produtos sintéticos ou naturais de origem vegetal, têm sido investigadas para a sua capacidade para agir como IBE (FONTAINE et al., 2015; NGUYEN et al., 2015; BHARATE, et al., 2015; WHALEN et al., 2015; CHOVANOVÁ et al., 2015).

Óleos essenciais de plantas são ricos em compostos bioativos, como terpenos e terpenóides, que mostraram resultados promissores como agentes terapêuticos potenciais **(**GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016; DE FAZIO et al., 2016; BARRETO et al., 2014). Monoterpenos, os principais constituintes dos óleos essenciais (PEIXOTO et al., 2015) têm sido relatados por sua capacidade antifúngica, anti-aflatoxina e antioxidante (KEDIA et al., 2014). O objetivo do presente estudo foi avaliar se monoterpenos dimetil-octanol, estragol e nerol são potenciais agentes antimicrobianos intrínsecos e / ou inibidores da bomba de efluxo NorA, transportadora multi-droga de *S. aureus*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cepas e drogas

A atividade antimicrobiana intrínseca dos monoterpenos foi testada contra cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, SA1199, SA1199-B e SA10), Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922) e leveduras (*Candida albicans* NEWP031). O efeito inibitório na atividade NorA foi realizada com cepas de *S. aureus* SA1199-B, que superexpressam o gene que codifica a proteína norA da bomba de efluxo Nora, capaz de bombear fluoroquinolonas hidrofílicos e outros fármacos, tais como corantes de intercalação de DNA. As cepas foram mantidas em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia, Índia) inclinado a 4 ºC, e antes do ensaio, as células foram cultivadas durante a noite a 37 ºC em Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India).

Monoterpenos oxigenados (2Z) -3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol (nerol), 3,7-dimetil-octan-1-ol e 1-metoxi-4- (prop-2-en-1-il) benzeno, norfloxacina e brometo de ethdium foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St. Louis. Antibióticos e brometo de etídio foram dissolvidos em água estéril.

2.2. Estimativa do Log P

Estimativa do *Log P* foi obtida usando o MarvinSketch 6.2.2 (Chemaxon), pelo método de Phys. *Log P* foi calculado para a molécula não carregada, devido à gama típica de pKa de hidroxilo aromático é 8,0-10,0.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca

As soluções estoque de Nerol, 3,7-Dimetil-1-octanol e estragol foram preparadas por dissolução de 10000 ug de cada monoterpeno em 1 mL de dimeti-sulfóxido, iniciando assim com uma concentração inicial de 10000 ug/mL. Esta solução-mãe foi, em seguida, diluída em água destilada esterilizada para obter a solução de teste (1,024 ug/mL). Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de monoterpenos foram determinadas por ensaio de micro-diluição em caldo de BHI a 10 % com suspensões bacterianas de 105 UFC/mL e as soluções de monoterpeno com concentração variando entre 8-512 ug/mL. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 ºC durante 24 h, em seguida, 20 mL de resazurina (0,01% p/v em água destilada estéril) foi adicionada a cada poço para detectar o crescimento bacteriano por mudança de cor de azul para rosa. MICs foram definidos como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento de bactérias.

2.4. Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA

Para a avaliação dos monoterpenos como moduladores de resistência a fluoroquinolona, os MICs da norfloxacina para cepa SA1199-B foram determinados na presença ou na ausência de cada composto a concentrações sub-inibitória (1/8 MIC, 1/4 e ½ MIC). As concentrações dos antibióticos ou de brometo de etídio (EtBr) variou 0,125-128 ug/mL. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 ºC durante 24 h e as leituras foram realizadas com resazurina como anteriormente descrito.

2.5. Análise estatística

Todas os testes foram realizados em triplicado e os resultados foram normalizados por cálculo de valores médios geométricos. Desvio de erro e desvio padrão da média geométrica foram revelados. As diferenças entre o tratamento com antibióticos, isoladamente ou associados com monoterpenos foram examinadas utilizando uma análise de variância (ANOVA). As diferenças mencionadas acima foram analisados por pós-teste de Bonferroni e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

As estruturas químicas e os valores de log P dos monoterpenos oxigenados testados estão apresentados na Tabela 1. Os MICs foram encontrados para cada composto contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e de *C. albicans* estão apresentados na Tabela 2. Os monoterpenos testados não tiveram atividade contra todas as cepas de *S. aureus* (HOLETZ et al., 2002). Por outro lado, o nerol mostrou atividade inibidora fraca (512 ug/mL) contra cepas de *E. coli* e de *C. albicans*.

Tabela 1- Estruturas químicas e estimative do para os monoterpenos oxigenados testados.

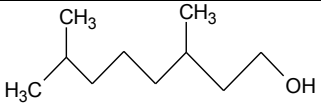
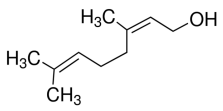
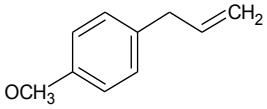
Monoterpenos (IUPAC)	Estrutura química	Lop P
3,7-Dimethyl-octanol (dihidrocitronelol)		3,12
(2*Z*)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol (nerol)		3,02
1-allyl-4-methoxybenzene (estragol)		2,89

Tabela 2 – Concentrações inibitória mínima (MIC) mostradas para o Nerol, 3,7-Dimetil-1-octanol and Estragol contra cepas de *S. aureus, E. coli e C. albicans* (médias geométricas de três testes simultâneos).

	MIC (μg/mL)		
CEPAS	Nerol	Dimetil-octanol	Estragol
S. aureus ATCC 25923	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA1199	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA1199-B	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA10	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
E. coli 25923	512	2048	2048*
C. albicans NEWP31	512	2048	2048

A adição de monoterpenos oxigenados nos meios de crescimento, em concentrações sub-inibitórias causou uma diminuição no MIC do antibiótico contra SA1199-B (Figuras 1 a 3). O nerol e 3,7-dimetil-octan-1-ol aumentou a atividade antibiotica da norfloxacina contra SA1199-B de uma maneira dependente da concentração. Em adição, um efeito modulador também foi verificado quando os antibióticos foram substituídas por brometo de etídio, um substrato conhecido de proteína Nora (Figura 4).

Figura 1 - MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do nerol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).

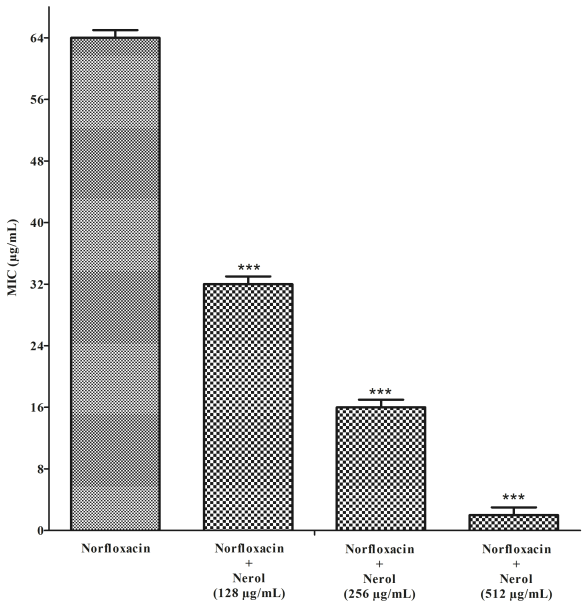


Figura 2 - MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do 3,7-Dimetil-1-octanol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).

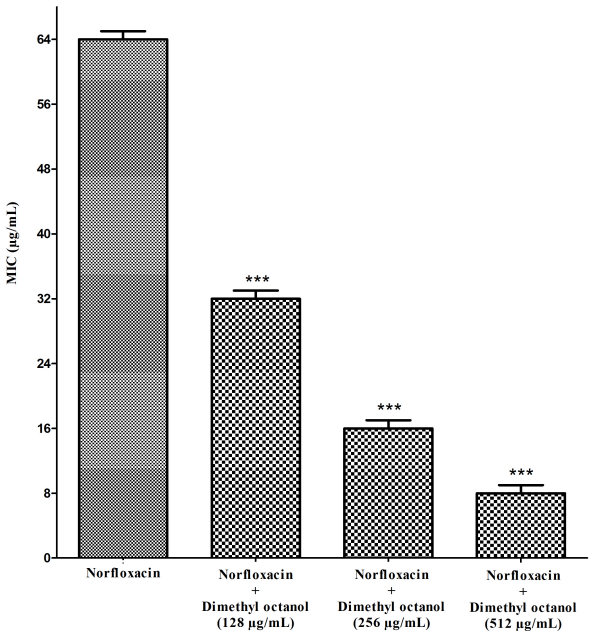


Figura 3 - MIC do antibiótico norfloxacina (NOR) na ausência e na presença do estragol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).

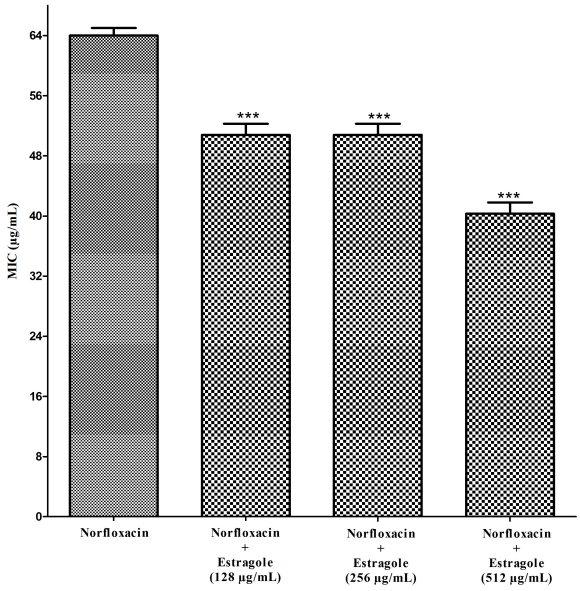
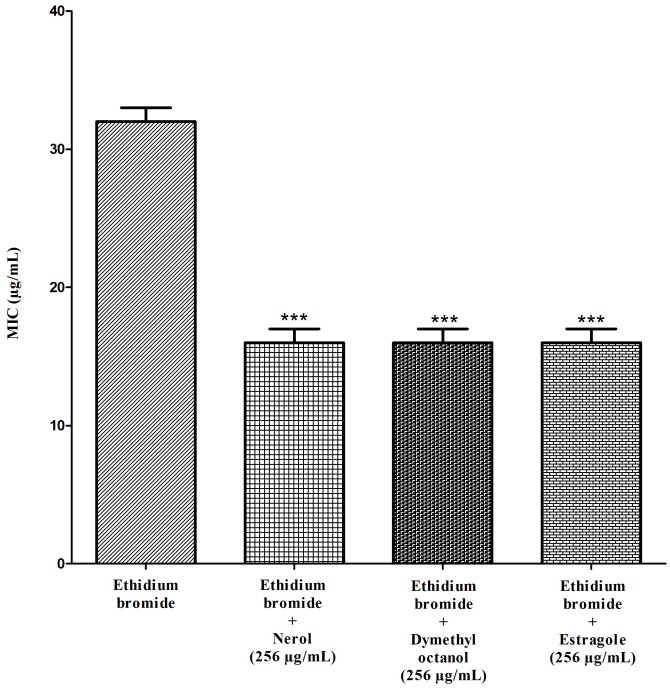


Figura 4 - MIC do brometo de etídio na ausência e na presença do nerol, dimetil-octanol e estragol contra SA1199-B. Cada resultado é uma média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente siginificantes (p <0.001).



4. Discussão

Os óleos essenciais têm sido propostos como uma fonte natural de compostos com atividade contra bactérias resistentes a múltiplas drogas, bem como, uma fonte natural de compostos capazes de inibir mecanismos de resistência bacteriana (BARRETO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Neste trabalho investigou-se a atividade antibacteriana intrínseca de três monoterpenos oxigenados e seu potencial como IBE da bomba de efluxo NorA, que está relacionada com a resistência às fluoroquinolonas hidrofóbicas em *S. aureus* SA1199-B.

Em relação à atividade antimicrobiana intrínseca, apenas o nerol foi ativo contra as cepas *E. coli* ATCC 25923 e *Candida albicans* NEWP031. Resultados semelhantes foram relatados por estudos anteriores que demonstraram a eficácia de nerol como composto antifúngico contra cepas de *Aspergillus* (MIHAI, 2015). Também foi verificado que os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* Linn., *Thymus algeriensis* e *Citrus aurantium* L., que contêm nerol em sua composição foram ativos contra bactérias (AHMAD, VILJOEN, 2015; AL ABBASY et al.,2015; ALI IBEH et al., 2015;AMMAR et al., 2012; DORMAN, DEANS, 2000).

Além disso, o seu isômero trans, o geraniol, exibiu uma forte atividade contra *C. albicans*, *E. coli* e bactérias patogênicas de plantas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Corynebacterium fascians*, e *Pseudomonas solanacearum),* relatando-se que o nerol é mais eficaz como um agente antibacteriano do que como um agente antifúngico (SUPPAKUL et al., 2003; KNOBLOCH et al., 1989)

Embora monoterpenos oxigenados não apresentaram atividade intrínseca contra *S. aureus*, quando eles foram colocados no meio de crescimento, em concentrações sub-inibitórias eles foram capazes de reduzir a CIM do antibiótico de um modo dependente da concentração, contra a cepa SA1199-B (Figuras 1 a 3). Os monoterpenos oxigenados também foram capazes de melhorar a atividade do brometo de etídio contra SA1199-B (Figura 3), um substrato de proteína Nora. Estes resultados indicam que os compostos testados são IBE para bomba de efluxo norA. Além disso, os monoterpenos de cadeia aberta (de nerol e 3,7-dimetil-octan-1-ol) foram mais eficazes como inibidores da nora do que o 1-metoxi-4-(prop-2-en-1-il) benzeno que monoterpeno apresenta um anel de benzeno.

Levando-se em conta os critérios adoptados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), o nerol diminuiu a CIM da norfloxacina para SA1199-B, mudando seu fenótipo de resistentes para sensível. No caso de 3,7-dimetil-octan-1-ol, o fenótipo da cepa SA1199-B foi mudada de resistente para intermediário.

Estudos de lipofilicidade são relevantes para saber se uma molécula é capaz de interagir com as membranas das células (KASIM et al., 2004). O Log P de monoterpenos oxigenados foi calculado e os resultados mostraram que todos eles são muito hidrófobos, sendo portanto, capazes de se intercalarem na bicamada fosfolipídica. Interação de compostos hidrofóbicos com membrana plasmática pode aumentar sua permeabilidade levando a dissipação da força próton motiva (SOUZA et al., 2013; AHMAD, KHAN, 2013).

Uma vez que a atividade NorA é dependente da força motriz de prótons (GUILHELMELLI et al., 2013),acreditamos que a partição de moléculas Nerol ou 3,7-dimetil-octan-1-ol na membrana plasmática, a qual afeta o gradiente de prótons, pode estar relacionada com o efeito inibitório verificado para NorA (SCHINDLER , JACINTO , KAATZ, 2013). Apesar de, uma membrana danificada por nerol ou 3,7-dimetil-octan-1-ol poder tornar-se mais permeável a moléculas de norfloxacina, também contribui para aumentar a sua concentração intracelular. Além disso, a membrana plasmática danificada pode conduzir a alterações conformacionais e a inibição de proteínas de membrana, tais como norA.

5. Conclusão

Os monoterpenos oxigenados nerol e 3,7-dimetil-1-octanol foram capazes de potencializarr a atividade do antibiótico norfloxacina contra SA1199-B, o que indica que estes componentes de óleo essencial atuam como inibidores da bomba de efluxo de NorA. Assim, estes compostos poderiam ser componentes potenciais de formas farmacêuticas para utilização em associação com a norfloxacina na terapia antibiótica de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a fluoroquinolonas.

Referências

AHMAD, A. KHAN, A. MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Science,** v.48, n.1-2, p.80-86, 2013.

AHMAD, A. VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon essential oil* (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.22, n.6, p.657–665, 2015.

AL ABBASY, D. W. PATHARE, N. AL-SABAHI, J. N. KHAN, S. A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**,v.5, n.8, p.645-649, 2015.

ALDRED, K. J. KERNS, R. J. OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance**.** **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, n.10, p. 1565-1574, 2014.

ALI, I.B.H. CHAOUACHI, M. BAHRI, R. CHAIEB, I. BOUSSAÏD, M. HARZALLAH-SKHIRI, F. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. **Industrial Crops and Products**, v.77, p.631–639, 2015.

ALMEIDA, T.S. ROCHA, J.T. RODRIGUES, F.F.G. CAMPOS, A.R. COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential. **Industrial Crops and Products. v.**44, p. 630–633, 2013.

AMMAR, A. H. BOUAJILA, J. LEBRIHI, A. MATHIEU, F. ROMDHANE, M. ZAGROUBA, F. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli Oil). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, **v.**15, n.22 p.1034-1040, 2012.

BADAWY, M. E. I. RABEA E.I. TAKTAK, N. E. M. EL-NOUBY, M. A. M. The antibacterial activity of chitosan products blended with monoterpenes and their biofilms against plant pathogenic bacteria. **Scientifica**,v.2016; 1-10, 2016.

BARRETO, H. M. SILVA, FILHO, E. C. LIMA, E. O. COUTINHO, H. D. M. MORAIS-BRAGA, M. F. B. TAVARES, C. C.A. TINTINO, S. R. REGO, J. V. ABREU, A. P. L. LUSTOSA, M. C. G. OLIVEIRA, R. W. G. CITÓ, A. M. G. L. LOPES, J. A. D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.290-294, 2014.

BARRETO, H. M. LIMA, I. S. COELHO, K. M. R. N. OSÓRIO, L. R. MOURÃO, R. A. SANTOS, B. H. C. COUTINHO H. D. M. ABREU A. P. L. MEDEIROS, M. G. F. e, CITÓ, A. G L. LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus.* **European Journal of Integrative Medicine**, V.6. P. 560–564. 2014.

BHARATE, J. B. SINGH, S. WANI A. SHARMA, S. JOSHI, P. KHAN, I. A. KUMAR A. VISHWAKARMA R.A. BHARATE S. B. Discovery of 4-acetyl-3-(4-fluorophenyl)-1-(p-tolyl)-5-methylpyrrole as a dual inhibitor of human P-glycoprotein and *Staphylococcus aureus* Nor A efflux pump **Organic & Biomolecular Chemistry***, v.*13, n.19, p.5424–5431, 2015.

BRUSSELAERS, N. VOGELAERS, D. BLOT, S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Annals Intensive Care**, v.23, n.1, p 1-47, 2011.

CHOVANOVÁ, R. MEZOVSKÁ, J. VAVERKOVÁ, Š. MIKULÁŠOVÁ, M. The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant. **Letters in Applied Microbiology**, v.61. n.1, p.58–62, 2015.

CHUA, K. Y. L. HOWDEN, B. P. JIANG, J-H. STINEAR, T. PELEG, A. Y**.** Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.554–562. 2014.

DE FAZIO, L. SPISNI, E.. CAVAZZA, E. STRILLACCI, A. CANDELA, M. CENTANNI, M. RICCI, C. RIZZELLO, F. CAMPIERI, M. VALERII, M. C. Dietary Geraniol by Oral or Enema Administration Strongly Reduces Dysbiosis and Systemic Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Frontiers in pharmacology** , v.7, p.38, 2016.

DE LASTOURS, V. CHAU, F. ROY, C. LARROQUE, B. FANTIN, B. Emergence of quinolone resistance in the microbiota of hospitalized patients treated or not with a fluoroquinolone**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n.12, p. 3393-4000, 2014.

DORMAN, H. J. D. DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308–316, 2000.

FONTAINE, F. HÉQUET, A. VOISIN-CHIRET, A. S. BOUILLON, A. LESNARD, A. CRESTEIL, T. JOLIVALT, C. RAULT, S. Boronic species as promising inhibitors of the Staphylococcus aureus NorA efflux pump: Study of 6-substituted pyridine-3-boronic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.95, p.185–198, 2015.

FRIEDMAN, M. HENIKA, P. R. MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*.**Journal of Food Protection**, v. 65, n.10, p.1545–1560. 2002.

GADE, N. QAZI, M. Fluoroquinolone therapy in Staphylococcus aureus infections: Where do we stand?. **Journal of Laboratory Physicians, v.**5, n.2, p. 109-112, 2013.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. GALLINA, S. OWCZAREK, S. DIONISI, A. M. BENEDETTI, I. DECASTELLI, L. Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella* enterica Serovar Typhi in Italy. **Plos one**, v.10, n.6, 2015.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. E. GONZÁLEZ-TRUJANOB M. E. OROZCO-SUÁREZC S.A. ALVARADO-VÁSQUEZD N. LÓPEZ-MUÑOZA F. J. Nerol alleviates pathologic markers in

the oxazolone-induced colitis model**. European Journal of Pharmacology**, v.776: p.81–89, 2016

GUILHELMELLI, F. VILELA, N. ALBUQUERQUE, P. DERENGOWSKI, L.S. SILVA-PEREIRA, I. KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology** , n.4, p.353, 2013.

HOLETZ, F. B. PESSINI, G. L. SANCHES, N. R. CORTEZ, D. A. NAKAMURA, C. V. FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027–1031, 2002.
KAATZ, G. W. SEO, S. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.37, n.5, p.1086–1094, 1993.

KAATZ, G. W. SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.12,p.
2650–2655, 1995.

KASIM, N. A. WHITEHOUSE, M. RAMACHANDRAN, C. BERMEJO, M. LENNERNÄS, H. HUSSAIN, A.S. JUNGINGER, H. E. STAVCHANSKY, S. A. MIDHA, K. K. SHAH, V. P. AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics,** v.1, n.1, p.85–96. 2004.

KEDIA, A. PRAKASH, B. MISHRA, P. K. DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, n.3, p.168-169, 2014

KNOBLOCH, K. PAULI, A. IBERL, B. WEIGAND, H. WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components.**Journal of Essential Oil Research,** v.1, n.3, p.118-119, 1989.

LAXMINARAYAN, R. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. **Science**,v.345, p.1299–1301, 2014

MATIAS, E. F. ALVES, E. F. SILVA, M. K . CARVALHO, V.R . MEDEIROS, C.R. SANTOS, F. A. BITU, V. C. SOUZA, C.E. FIGUEREDO, F.G. BOLIGON, A. A. ATHAYDE, M. L. COSTA, J. G . COUTINHO, H. D. Potentiation of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from Cordia verbenacea DC **Microbial Pathogenesis**, v.95, p.111-116, 2016.

MC GANN, P. MILILLO, M. KWAK, Y.I. QUINTERO, R. WATERMAN, P. E. LESHO, E. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes qacA/B and mupA in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.***Diagnostic Microbiologyand Infectious Disease** v.77,n.3 p.270-272, 2013.

MIHAI, A.L. POPA, M. E. *In vitro* Activity of Natural Antimicrobial Compounds against *Aspergillus* Strains. **Agriculture and Agricultural Science Procedia** , v.6. p.585-592, 2015.

NGUYEN, S. T. KWASNY, S. M. DING, X. CARDINALE, S. C. MCCARTHY, C.T. KIM, H-S. Structure- activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** , v. 23, n.9, p.2024-2034, 2015.

OPPERMAN, TJ, WILLIAMS JD, HOUSEWEART C, PANCHAL RG, BAVARI S, PEET NP, MOIR DT, BOWLIN TL.Efflux-mediated bis-indole resistance in Staphylococcus aureus reveals differential substrate specificities for MepA and MepR. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v.18, n. 6, p.2123-2130,2010.

PEIXOTO, M.G. BACCI, L. BLANK, A. F. ARAÚJO A.P.A. ALVES, P. B. SILVA. J.H S. SANTOS,A. A. OLIVEIRA. A. P. COSTA. A. S. ARRIGONI-BLANK, M.F.Toxicity and repellency of essential oils of Lippia alba chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products** v.71, p.31-36, 2015.

REDGRAVE, L. S. SUTTON, S. B. WEBBER, M. A. PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v;22, n. 8 p. 438–445, 2014.

SCHINDLER, B. D. JACINTO, P. KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, 2013; v.8,n.4, p.491–507, 2013.

SOUZA, E. L. OLIVEIRA, C. E. V. STAMFORD, T. L. M. CONCEIÇÃO, M. L. NETO, N. J. G. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of Staphylococcus aureus strains isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.29–35, 2013.

SUPPAKUL, P. MILTZ, J. SONNEVELD. K, BIGGER, S. W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging**. Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.51, n.11, p.3197- 3207, 2003.

UHLEMANN, A. C. OTTO, M. LOWY, F. D. DELEO, F. R. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**,v.21,p.563-574, 2014

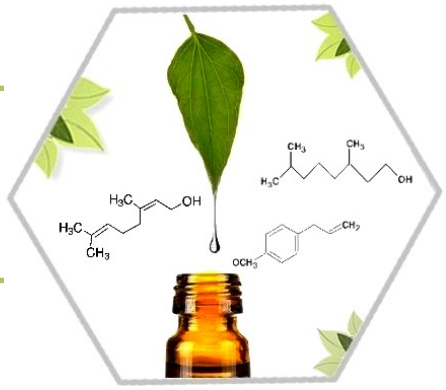
VALI, L. DASHTI, A. JADAON, M. M. EL-SHAZLY S. The emergence of plasmid mediated quinolone resistance qnrA2 in extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in the Middle East**. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

VAN ZYL, R. L. SEATLHOLO S. T. VAN VUUREN, S. F. VILJOEN, A. M. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Researchv**, v.18, p.129-133.

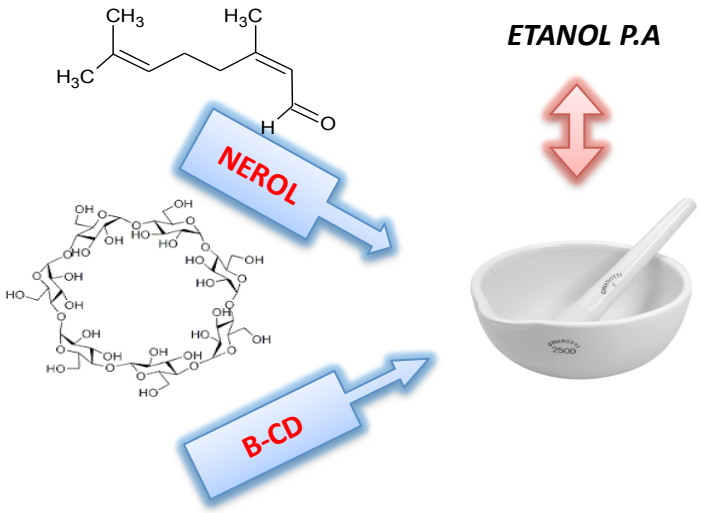
WHALEN, K. E. POULSON-ELLESTAD, K. L. DEERING, R. W. ROWLEY, D. C. MINCER, T. J. Enhancement of Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Bacteria by the Efflux

Pump Inhibitor 3,4-Dibromopyrrole-2,5-dione Isolated from a *Pseudoalteromonas* sp. Enhancement of Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Bacteria by the Efflux Pump Inhibitor 3,4-Dibromopyrrole-2,5-dione Isolated from a *Pseudoalteromonas* sp. **Journal of natural products**, v.78, n.13, p.402-412. 2015.

Capítulo VI



CAPÍTULO VI - Estudos de delineamento farmacêutico de um complexo de inclusão a partir de nerol e β-ciclodextrina



Artigo Submetido - Current Pharmaceutical Biotechnology – Qualis B1 Biotecnologia

CAPÍTULO VI - Estudos de delineamento farmacêutico de um complexo de inclusão a partir de nerol e β-ciclodextrina

RESUMO

Nerol é um tipo de monoterpeno acíclico com importantes atividades biológicas. No entanto, a baixa solubilidade em meio aquoso é um fator limitante para sua utilização. As ciclodextrinas têm sido amplamente utilizadas, a fim de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de moléculas não polares, por meio da formação de complexos de inclusão. Assim, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de complexo de inclusão (CI) de nerol em combinação com a β-ciclodextrina (β-CD), seguido pela caracterização por análise térmica e absorção espectrofotométrica no infravermelho (FTIR). Os resultados sugerem uma complexação de nerol com β-CD com desvios e mudanças de intensidade em várias bandas. A curva termogravimétrica do CI encontrado indicam uma saída de moléculas de solvatação de água a partir da cavidade do complexo formado por substituição a moléculas de droga, provavelmente incluída. Assim, conclui-se a possibilidade de obtenção de complexos de inclusão de monoterpeno nerol com β-CD, o que irá aumentar a sua solubilidade e facilitar o processo de entrega.

Palavras-chave: Nerol; Monoterpeno; β-ciclodextrina; Complexo de inclusão; Solubilidade.

ABSTRACT

Nerol is an acyclic type monoterpene with important biological activities. However, the low solubility in aqueous media is a limiting factor for its user. Cyclodextrins have been widely used in order to improve the solubility, stability and bioavailability of nonpolar molecules through the formation of inclusion complexes. Thus, the present study consists in the development of nerol inclusion complex in combination with the β-cyclodextrin (β-CD) followed by characterizing by thermal analysis and spectrophotometric absorption in the infrared (FTIR). The results suggest a complexation of nerol with β-CD having detours and changed the intensity of various bands. The

thermogravimetric curve of CI found to indicate an output of solvating water molecules from the complex cavity formed for replacement of drug molecules probably included. Thus, it is concluded a possibility to obtain inclusion complexes of nerol monoterpene with β-CD, which will increase its solubility and facilitate delivery process.

Keywords: nerol; monoterpene; β-cyclodextrin; inclusion complex; solubility.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas como medicina alternativa (RODRIGUES, 2013). Entre os produtos derivados de plantas medicinais, estão os monoterpenos, que são constituintes de óleos essenciais (OEs) sob a classe de terpenos ganharam atenção com atividades biológicas promissoras (CARVALHO, 2013). Geralmente, eles apresentam propriedades repelentes ou atraentes, de natureza volátil e com baixo peso molecular (KNAAK, 2010; ANGELIS, 2012). Eles são moléculas com 10 átomos de carbono e constituem a parte mais representativa (90%) da classe. O principal interesse comercial destes compostos é devido a aplicações de perfumaria e aromatizantes em alimentos, além de um certo número de efeitos farmacológicos. Estas substâncias são geralmente voláteis e podem ser detectadas por insetos (MARCIEL, 2011).

O nerol (cis-2,6-dimetil-2,6-octadien-8-ol), um álcool primário acíclico, é um monoterpeno utilizado como um composto de fragrância em perfumaria e encontrado em várias espécies de plantas. É usado como um agente anti-inflamatório, anti-séptico, anti-espasmódico e antidepressivo (SAITO, 2004). É também utilizado no tratamento da úlcera gástrica (ANGELIS, 2012). No entanto, por ser um óxido de etileno, tem fraca solubilidade em meio aquoso, o que limita as suas aplicações em sistemas *in vivo*. A complexação com uma substância adequada pode aumentar a solubilidade dos materiais com baixa solubilidade, o que é útil para obter uma biodisponibilidade desejada em vários sistemas de testes (MELO et al., 2007).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos com moléculas de D-glucose, que lhes permitem formar complexos de inclusão com outras substâncias (SOBRINHO, 2009). É de se notar que as CDs (alfa, beta e gama) são compostos naturais contendo seis a oito unidades de glucose. Na área farmacêutica, a β-CD tem principalmente sido explorada para aumentar a

solubilidade, biodisponibilidade, e para reduzir os efeitos secundários de uma variedade de drogas (SILVA, 2014). A vetorização de uma droga é uma operação utilizada para modular e, se possível, totalmente dirigir a distribuição de uma substância associando a um sistema adequado, denominado de vetor (FEUZER, 2012). Vários estudos têm sido usados para caracterizar os complexos de inclusão entre as drogas e CDs e as técnicas experimentais mais utilizadas são: análise térmica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrofotometria de ultravioleta-visível e infravermelho (ARRAIS, 2012). Face ao exposto, o objetivo deste estudo é obter uma complexação entre o nerol e β-ciclodextrina, e realizar sua caracterização físico-química.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

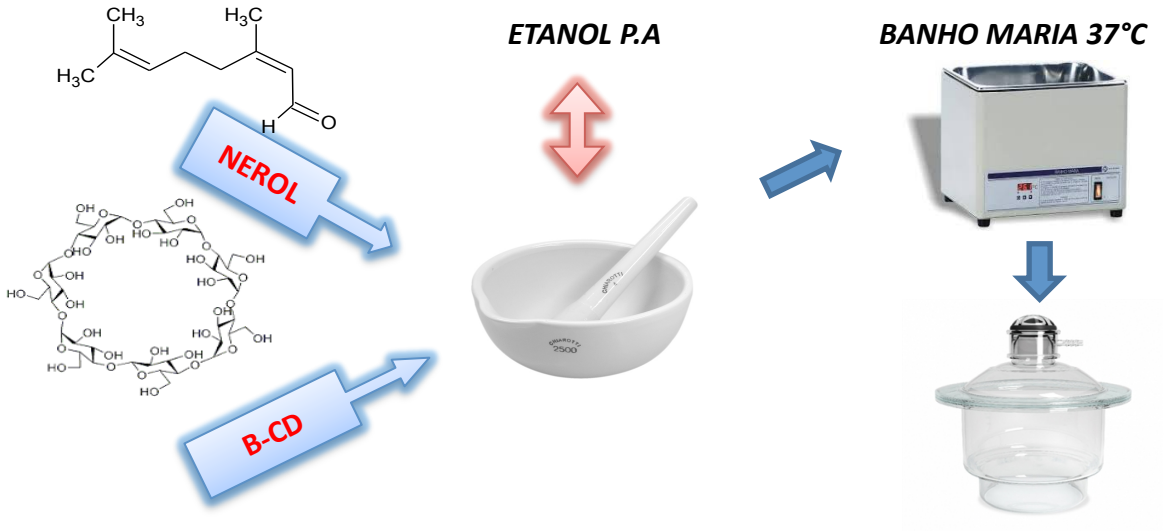
Nerol, β-ciclodextrina e etanol utilizados na obtenção do complexo de inclusão foram adquiridos de Sigma-Aldrich (USA).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação do complexo de inclusão

O complexo de inclusão de nerol foi preparado com ciclodextrina natural, β-CD, através da aplicação do método de malaxagem em um molar. Resumidamente, 1: 1 de nerol e β-CD foi misturada em um gral de porcelana com o auxílio de um pistilo e adição de uma pequena quantidade de etanol, suficiente para se obter uma pasta. Em seguida, o gral foi mantido num banho de água protegido da luz a uma temperatura de 37 °C até a mistura estar completamente seca. O material resultante foi triturado, dessecado, e colocado num frasco de vidro selado e armazenado num dessecador, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática do método de malaxagem para obtenção do complexo de inclusão



2.2.2. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos pelo método de refletância total atenuada (ATR). As amostras de nerol, β-CD, MF e complexo de inclusão foram obtidos em Espectrômetro ThermoNicolet IS5 equipado com acessório ID5 de Refletância Total Atenuada e software de controle e aquisição OMNIC 9.0 (Figura 4).O infravermelho médio compreende a região de 650 a 4000 cm^{-1}, é a região mais usada, tanto para análise qualitativa como quantitativa (ZENI, 2005).

Figura 2 - Espectrômetro (FTIR) ThermoNicolet IS5



2.2.3. Termogravimetria (TG)

A caracterização termoanalítica através de TG foi realizada por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA 51, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 $mL.min^{-1}$, sendo a massa da amostra de cerca de 6 mg de nerol acondicionada em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600 ˚C na razão de aquecimento de 10 $ºC.min^{-1}$. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco. Foi realizado a análise do monoterpeno nerol, β-CD, mistura física (MF) e complexo de inclusão obtido por malaxagem.

Figura 3 – Equipamento de Termobalança Shimadzu®



2.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise térmica através de DSC-60 (Shimadzu), foi realizada em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 $mLmin^{-1}$), empregando uma massa de aproximadamente 5,0 mg, acondicionada em porta-amostra de alumínio, hermeticamente fechado. Foi realizada a análise do monoterpeno nerol, a β-CD, MF e o complexo de inclusão obtido por malaxagem, na faixa de aquecimento de 30 – 600 ºC, sob um razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

Figura 4 – Equipamento de DSC-60 Shimadzu®



2.3. Estatísticas

Os dados, análises estatísticas e gráficos foram obtidos utilizando os softwares OriginPro, Ta-60ws e Graphpad Prism. Para organização de tabelas utilizou-se o Microsoft Excel®.

3. Resultados e discussão

Realizou-se o processo de complexação do monoterpeno nerol com a β-CD para que fosse avaliado um melhor rendimento e que apresentasse melhores características frente aos métodos de caracterização espectroscópicos utilizados, para estudos farmacológicos posteriores. As caracterizações ocorreram por espectroscopia no IV, e análises térmicas DSC e TG.

3.1. Identificação por Espectroscopia de infra-vermelho

A análise dos espectros pode ser feita comparando-se as bandas da molécula hóspede (nerol), da ciclodextrina e da mistura física com a do complexo (Figura 5). Na Figura 6, as principais bandas foram ampliadas para melhor visualização.

Figura 5 - Espectro FTIR de β-CD e nerol e sua mistura física (MF nerol:β-CD) e complexo de inclusão (CI nerol:β-CD)

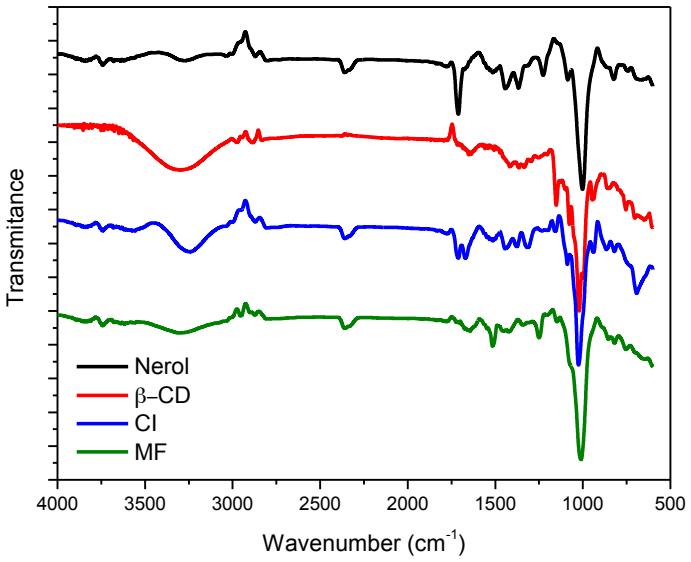
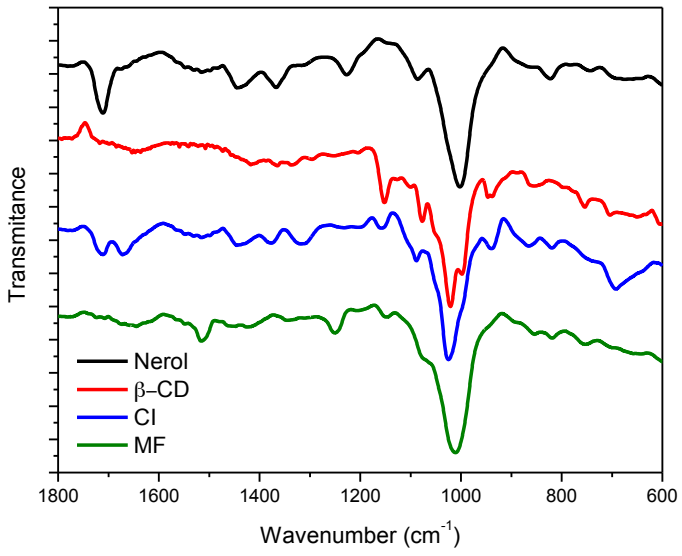


Figura 6 - Espectro ampliado da região de "finger print" do FTIR de β-CD e nerol, sua mistura física (MF nerol:β-CD) e complexo de inclusão (CI nerol:β-CD)



Geralmente, o espectro da mistura física ou CI corresponde à sobreposição dos espectros da molécula hóspede e da CD, porém com as bandas da molécula hóspede menos evidente, devido a sua menor concentração. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer (NASCIMENTO, 2013).

O espectro de infravermelho da β-CD mostrou bandas de absorção em 3381 cm^{-1} (estiramento O – H), 2922 cm^{-1} (estiramento C – H), 1153 cm^{-1} (estiramento C – O) e 1024 cm^{-1} (estiramento C – O – C). O espectro de IV do nerol mostrou como principais bandas a absorção forte em 1675 cm^{-1} (estiramento C = O) de cetona e 1127 cm^{-1}(estiramento C = C) de alceno.

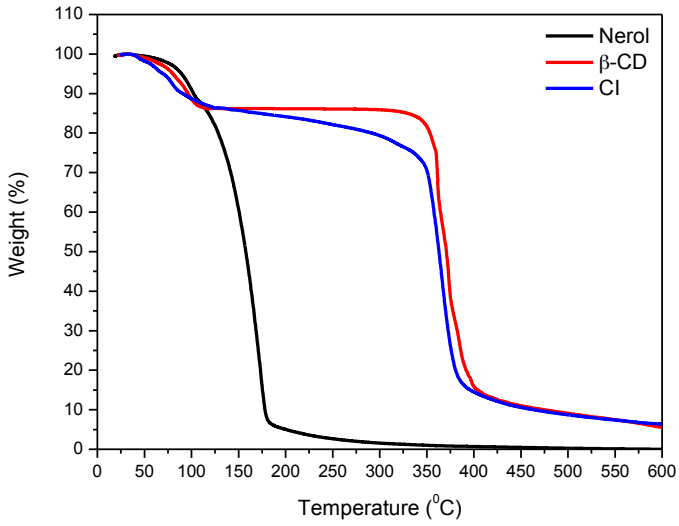
Apesar das interações no complexo de inclusão entre a β-CD e a molécula hóspede (nerol) não serem muito fortes, uma vez que são ligações eletrostáticas não covalentes, observa-se desvios e mudanças de intensidade de várias bandas, quando comparamos o complexo e o nerol.Na formação do complexo observa-se o desaparecimento da banda de absorção da carbonila (estiramento C = O) e das ligações (estiramento C = C) presentes na molécula do nerol comprovando que houve a formação do complexo. Na mistura física ouve um inicio de interação entre a β-CD e nerol devido haver o desaparecimento da carbonila, no entanto continuou com as ligações (estiramento C = C) que reagiram após o complexo de inclusão entre os mesmos.

3.2. Análise de Termogravimetria

Geralmente, as análises térmicas são as primeiras observadas no estudo de complexação por serem relativamente simples. As técnicas mais utilizadas são a DSC e a TG (NOVAK et al., 2006).

Na análise termogravimétrica, a massa de uma amostra está sob atmosfera de gás inerte ou oxidante, sendo monitorada continuamente em função da temperatura em uma rampa de aquecimento. As curvas obtidas são duas, uma delas relacionada ao percentual de massa (Massa%) (Figura 7) e a outra derivada, com relação à temperatura, do percentual de massa (Derivada da Massa %/°C), conforme mostra a Figura 8. Esta última permite a determinação exata da temperatura em que ocorre determinada perda de massa da amostra (ARRAIS, 2012).

Figura 7- Curva de TG das espécies livres βCD, nerol e complexo nerol:βCD



A análise das curvas TG/DTG da β-CD, representadas na Figura 7 permite identificar que na faixa de temperatura de 67-120 °C (Tpico ~ 95ºC) ocorreu um evento de perda de massa de 29,25%, referente à liberação de moléculas de água a partir da cavidade da β-CD. Em seguida, é verificado um patamar de estabilidade térmica, entre 124-320 °C. Enquanto que na faixa de temperatura de 334-415 °C (Tpico ~ 368 ºC) ocorreu uma perda de massa de 5,96%, relacionada a rápida fusão/decomposição da β-CD.

A partir das curvas TG/DTG do nerol, foram verificados dois eventos térmicos. O primeiro ocorreu na temperatura de 100°C relacionado a uma pequena perda de água com perda de massa de 7,64%. O segundo foi verificado na faixa de temperatura entre 109-192°C envolvendo perda de massa de 27% relacionada ao ponto de ebulição de decomposição da substância.

A curva TG/DTG do complexo mostrou-se bastante semelhante com a curva da β-CD. Na Tabela 1 pode-se observar um aumento da perda de massa entre 334-415 °C de 5,9% para 62,49% indicando saída de moléculas de água de solvatação da cavidade do complexo formado para substituição de moléculas do fármaco, provavelmente incluso. Já em comparação com a banda de absorção do nerol, observou-se que entre a faixa de 109-192°C (Tpico ~ 124 ºC) ele volatizou completamente, indicando que ocorreu a formação do complexo.

Figura 8 - Curvas da Derivada de TG das espécies livres βCD, nerol, e complexo nerol:βcd

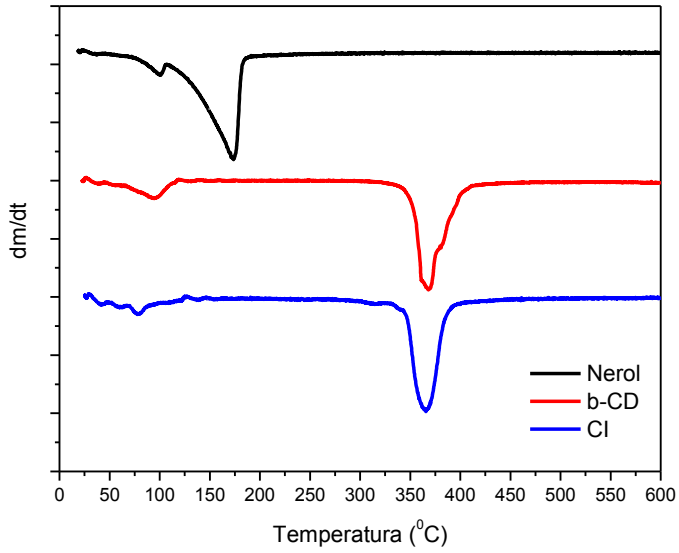


Tabela 1 – Percentual de perdas de massa obtidas por TG das amostras do monoterpeno nerol, β-CD e CI nerol:β-CD

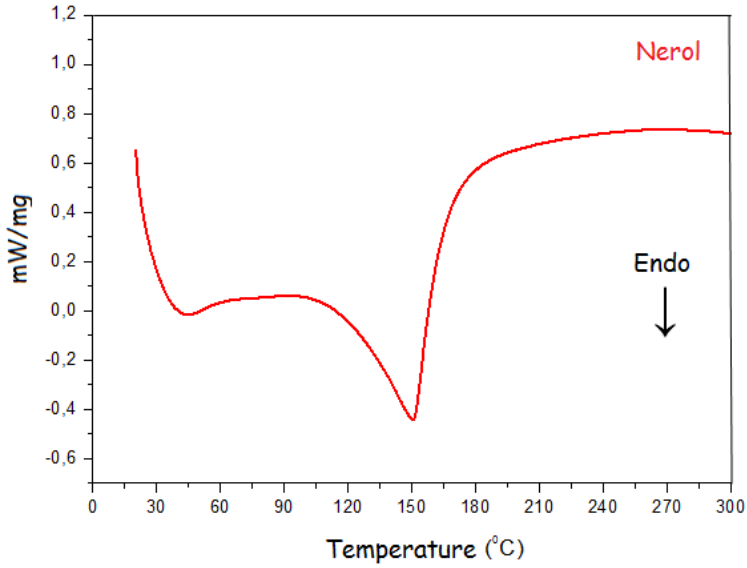
Amostras	**% Perda de Massa**	
	*Step I (%)**	*Step II (%)***
Nerol	7.64	27.00
β-CD	29.25	5.96
CI	43.58	62.49

* Porcentagem de água liberada ate 120°C
** Perda de massa relacionada ao início de decomposição da molécula

3.3. Análise de Calorimetria exploratória diferencial

DSC é uma das técnicas mais utilizadas para confirmar a formação do complexo de inclusão no estado sólido, devido a sua sensibilidade em detectar possíveis alterações nos eventos térmicos característicos da molécula hóspede quando esta se encontra no interior da cavidade da ciclodextrina, bem como a estabilidade do sistema e sua cristalinidade (AGUIAR, 2013).

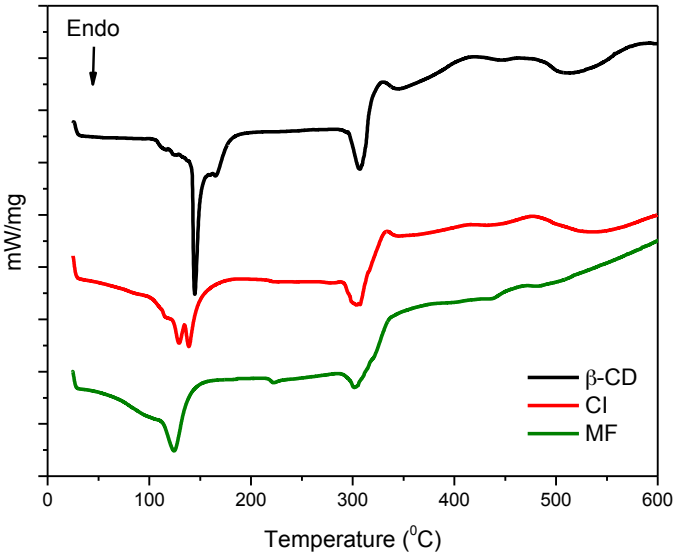
Figura 9 - Termograma de DSC do monoterpeno nerol puro



O comportamento térmico de todos os materiais foi investigado, usando DSC em atmosfera inerte. A curva do nerol mostrado na Figura 9 apresentou dois eventos endotérmicos o primeiro na faixa de temperatura de 42°C relacionado a perda de água e o segundo em 150°C referente a ebulição e degradação da substância.

A curva DSC da β-CD (Figura 10) apresentou três eventos endotérmicos seguido de um evento exotérmico e posterior etapa de decomposição. Os eventos endotérmicos ocorreram nas faixas de temperatura de 140, 165 e 307°C respectivamente. O primeiro provocado pela perda de água presente no interior de sua cavidade hidrofóbica seguido de um evento provocado por um processo físico atribuído à mudança de fase cristalina. Em seguida observou-se a fusão seguida de degradação da β-CD.

Figura 10 - Termograma de DSC do β-CD, MF, e CI nerol:βCD



A curva DSC da MF apresentou três eventos endotérmicos seguidos de decomposição. Os eventos ocorreram nas seguintes faixas de temperatura: 108-161°C, 217-230°C, 285-348°C. O primeiro evento representa um somatório do nerol puro e da β-CD. Já o segundo pico corroborou com a transição de fase cristalina da β-CD e por fim, a fusão da β-CD seguida de decomposição.

A curva de DSC do complexo apresentou uma sobreposição dos eventos térmicos da β-CD. Isso demonstra que a presença da molécula hospede (nerol) não interfere na estabilidade térmica da β-CD. Esse resultado pode ser confirmado na análise da curva de TG/DTG do complexo e da β- CD, observando as perdas de massa em temperaturas próxima.

Nas curvas destes dois últimos métodos (MF e CI) representados na Figura 10 foram observadas diferenças importantes principalmente referente a redução da intensidade do pico relativo a perda de água e desaparecimento do evento endotérmico referente a transição de fase cristalina da β-CD pura no CI.

Observa-se também, nas curvas de DSC da MF e do complexo algumas mudanças nos perfis das curvas de β-CD na faixa de temperatura de 307°C mostrando um ligeiro deslocamento em relação a curva do CI. Isso pode ser explicado pela interação do fármaco com a β-CD, sugerindo a inclusão da molécula de nerol em substituição e liberação de água da cavidade da β-CD.

4 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo, foi possível obter complexos de inclusão do monoterpeno nerol com a β-ciclodextrina através do método de malaxagem, que mostrou-se eficiente e aplicável a moléculas com baixa solubilidade em meio aquoso.

Os resultados das espectroscopias DSC TG e FTIR do nerol, βCD, mistura física e do complexo de inclusão obtidos, permitiram visualizar interações entre o fármaco e a β-ciclodextrina, sugerindo a complexação. A partir destes resultados, conclui-se que é possível preparar complexos a partir da mistura entre o nerol e a β-ciclodextrina, vislumbrando a utilização destes em sistemas de liberação, podendo haver melhora efetiva na solubilidade do nerol.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, U.N., LIMA, S.G., ROCHA, M.S., FREITAS, R.M., OLIVEIRA, T.M., SILVA, R.M., MOURA, L.C.B., ALMEIDA, T.G. Preparation and characterization of the inclusion complex essential oil of *Croton zehntneri* with β-cyclodextrin. **Química Nova**. v. 37, n.1, p. 50-55, 2014.

ALVES, M.S.M. Caracterização farmacognóstica, físico-químico e estudos preliminares de pré-formulação da Arrabidaea chica (Humb&Bonpl) B. Verlt. 2008 114f. **Dissertação** (Mestrado em ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

ANGELIS, C. D. Avaliação da proteção gástrica e duodenal do monoterpeno nerol em roedores. 2012. 73 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/91622/angelis_cd_me_botib.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04 Ago. 2014.

ARAÚJO, M,V,G. Química supramolecular: complexos de inclusão de fármacos antitoxoplasmose em derivado de ciclodextrina. São Cristóvão, 2007. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Química. Universidade Federal de Sergipe. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp140196.pdf>. Acesso em: 01 nov 2015.

ARRAIS, M. A. S. Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona:βcd e dapsona:sbeβcd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica. 2012. 93 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/9a_dissertacao_monica_amaral.PDF>. Acesso em: 15 set. 2014.

CARVALHO, C. S. Efeito gastroprotetor de monoterpenos presentes em plantas medicinais do cerrado e da caatinga em modelos de lesões gástricas em roedores. Teresina, p.1-3, 2013.

EVANGELISTA, B. A. L. Caracterização, analise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametazona. 2010. 110 f. **Dissertação** (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Andr%C3%A9%20Luis/Downloads/Dissertacao_BrunoALEvangelista%20(3).pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B**.** Nanotecnologia aplicada a fármacos. 2011. 98 f. **Trabalho de Conclusão do Curso** (Graduação em Farmácia) - Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, 2011. Disponível em: <http://www.catolica-es.edu.br/fotos/files/06.pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.

FALLEIROS, J. P.B; BRANDL, A.L; FONSECA, A.R.A. Aplicações da Nanotecnologia no Diagnóstico e Tratamento de Câncer. n 1. v 8. São Paulo, 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-AplicacoesDaNanotecnologiaNoDiagnosticoETratamento-4039448%20(1).pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.

FERREIRA, M. D. L. Terpenos: potenciais agentes quimioterapêuticos obtidos de fontes naturais usados contra o câncer de pulmão. 2014. 38 f. **Projeto de pesquisa** (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2014. Disponível em: <http://rei.biblioteca.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/608/1/MDLF22072014.pdf>. Acesso em: 02 set. 2014.

FEUZER. Paulo Emilio. Encapsulamento simultâneo de nanopartículas magnéticas (npms) com ftalocianina de zinco (znpc) via polimerização em miniemulsão. 2012. 120f. **Dissertação** (Grasuação em Engenharia Quimica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M.; Potencial dos Óleos Essenciais de Plantas no Controle de Insetos e Microrganismos. São Leopoldo, v.5, n. 2, p. 120-123, 2010. Disponível em: < http://www.unisinos.br/blogs/ppg-biologia/files/2011/05/art08_knaak_et_al.pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

KUBOTA, Daniela. Estudo fisico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada. 2010. 86f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

LIMA, J. R. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Farmácia**. Recife, p.1-7, Agosto, 2012.

LOREGIAN. A. Comparação entre dois métodos de extração e caracterização de óleos essenciais de plantas do horto de plantas medicinais do grupo pet - agronomia UTFPR - Pato Branco. 2013. 45f. **Trabalho de Conclusão do Curso** (Graduação em Quimica) – Universidade de Tcnologia do Paraná, Pato Branco, 2013.

LYRA, M.A.M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. Teresina, p. 1-8, Setembro, 2010.

MACIEL, M.V. et al. Atividade inseticida dos óleos essenciais de *lippiasidoides*e *coriandrumsativum*sobre *lutzomyialongipalpis.* Ceará, n 19, p. 77-87, 2011.

MEIRELLES, L. M. A. Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida. 2012. 80 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Lyghia_Meirelles.pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

MELO, N. F. et al. Preparação e Caracterização Inicial de Complexo de Inclusão entre Nitrofurazona e 2-Hidroxipropil—Ciclodextrina. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**.** São Paulo,v. 28, n.1, p.35-44, 2007. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/343/328>. Acesso em 20 Ago. 2014.

MIRANDA, V. C. Influência de condições de secagem, sombreamento, horário de colheita e procedência das plantas sobre o teor de óleo essencial de cymbopogoncitratus (d.c) stapf. 2012. 41 f. **Dissertação** (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal de Tocantins, Tocantins, 2012. Disponível em: <http://www.site.uft.edu.br/producaovegetal/dissertacoes/Valdilene%20Coutinho%20Miranda.pdf>. Acesso em: 21 Ago. 2014.

MOURAO, L. C. S. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. 2012. 137f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

NASCIMENTO, J. L. Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platoniainsignis*Mart e β-ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro.* 2013. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

NOVAK, C.; EHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, L.; ORGOVANYI, J. Aplication of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexs. **J. Therm. Anal. Calorim**. v.84, n.3, p.693-701, 2006

PEREIRA, T. M. M. Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platoniainsignis*Mart e β-ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro.* 2013. 104f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

PETERSEN, R. Z**. Biotransformação de tepernóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos.** 2006. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/11201/000609581.pdf?sequence=1>. Acesso em: 28 Ago. 2014.

PUISIEUX, F.; ROBLOT, L. **Vetorização e vetores de fármacos**. Rio Grande do Sul, v. 4, n. 1/2, p. 29-50, 2014. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/96434492/VETORIZACAO-E-VETORES-DE-FARMACOS>. Acesso em: 10 set. 2014.

RODRIGUES, M. M. Inventário de Plantas Medicinais do Programa Farmácia Viva da Cidade de Picos. 2013. 42 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Piauí. Picos, 2013. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/picos/arquivos/files/monografia(2).pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Dissertacao_de_Mestrado_Eliamara_Barroso_Sabino.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014.

SAITO, M., L; **As Plantas Praguicidas:** alternativa para o controle de pragas da agricultura. Jaguariúna, p. 01-05, 2004. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. **Análise térmica aplicada à cosmetologia**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, jul./set., 2007. Disponível em: <file:///C:/Users/Andr%C3%A9%20Luis/Downloads/44215-52712-1-PB%20(1).pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

SILVA, J. L. G. H. Síntese e caracterização do complexo ternário B-ciclodextrina: colecalciferol: íons metálicos. 2014. 77f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, J. S. S. Complexos de inclusão de fármacos com Ciclodextrinas e Cucurbiturilos. Aplicações Farmacoterapêuticas. 2011. 76 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro, 2011.

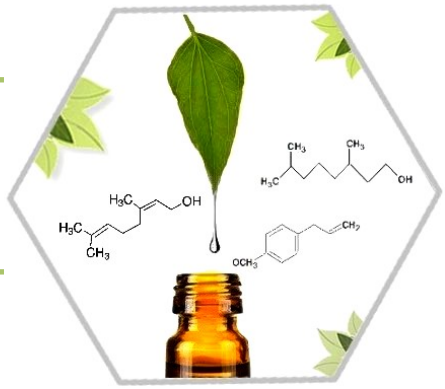
SOBRINHO, J. L. S. Atividade inseticida dos óleos essenciais de *lippiasidoides*e *coriandrumsativum*sobre *lutzomyialongipalpis.* 2009.174f. **Tese** (Doutorado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, M. R. P.; PERETIATKO, C. D. S. Avaliação química de óleo essencial e alopáticade extrato hidroalcoólico de *artemisiavulgaris*l. 2014. 40 f. **Trabalho de Conclusão do Curso** (Graduação em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná., Pato Branco, 2014. Disponível em: <https://www.google.com.br/#q=http%3A%2F%2Frepositorio.roca.utfpr.edu.br%2Fjspui%2Fbitstream%2F1%2F2197%2F1%2FPB_COQUI_2013_2_05.pdf>. Acesso em: 28 Ago. 2014.

TAKAHASHI, A. I. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. 2009. 99 f. **Dissertação** (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em:<file:///C:/Users/André%20Luis/Downloads/Dissertacao_AndreaIkeda%20(3).pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.

ZENI, Diego. Determinação de cloridrato de propanolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS). 2005. 64f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

Considerações finais



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As prospecções científica e tecnológica sobre o uso dos monoterpenos em formulações farmacêuticas e suas aplicações terapêuticas em doenças negligenciadas mostraram que estes compostos têm potenciais terapêuticos contra malária, dengue, esquistossomose, tuberculose, leprose, leishmaniose e doença de Chagas. Especialmente, o nerol, que demonstrou potencial anti-tuberculose. Com isso, recomendam-se mais pesquisas envolvendo monoterpenos no contexto do tratamento de doenças negligenciadas para melhor aproveitamento das propriedades terapêuticas apontadas para esta classe e seus derivados.

Os testes antioxidantes realizados *in vitro* indicaram que os monoterpenos apresentam potencial capacidade antioxidante em baixas concentrações, com melhores resultados para o nerol e estragol. Os bioensaios de toxicidade *in vitro* e *ex vivo*, demonstraram necessidade de maior investigação para o nerol, que demonstrou toxicidade para *A. salina*. Em contrapartida, o protocolo de capacidade hemolítica revelou perfil de segurança para estes compostos. Nos estudos com *S. cerevisiae,* os monoterpenos não induziram danos oxidativos e foram capazes de inibie os danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2.

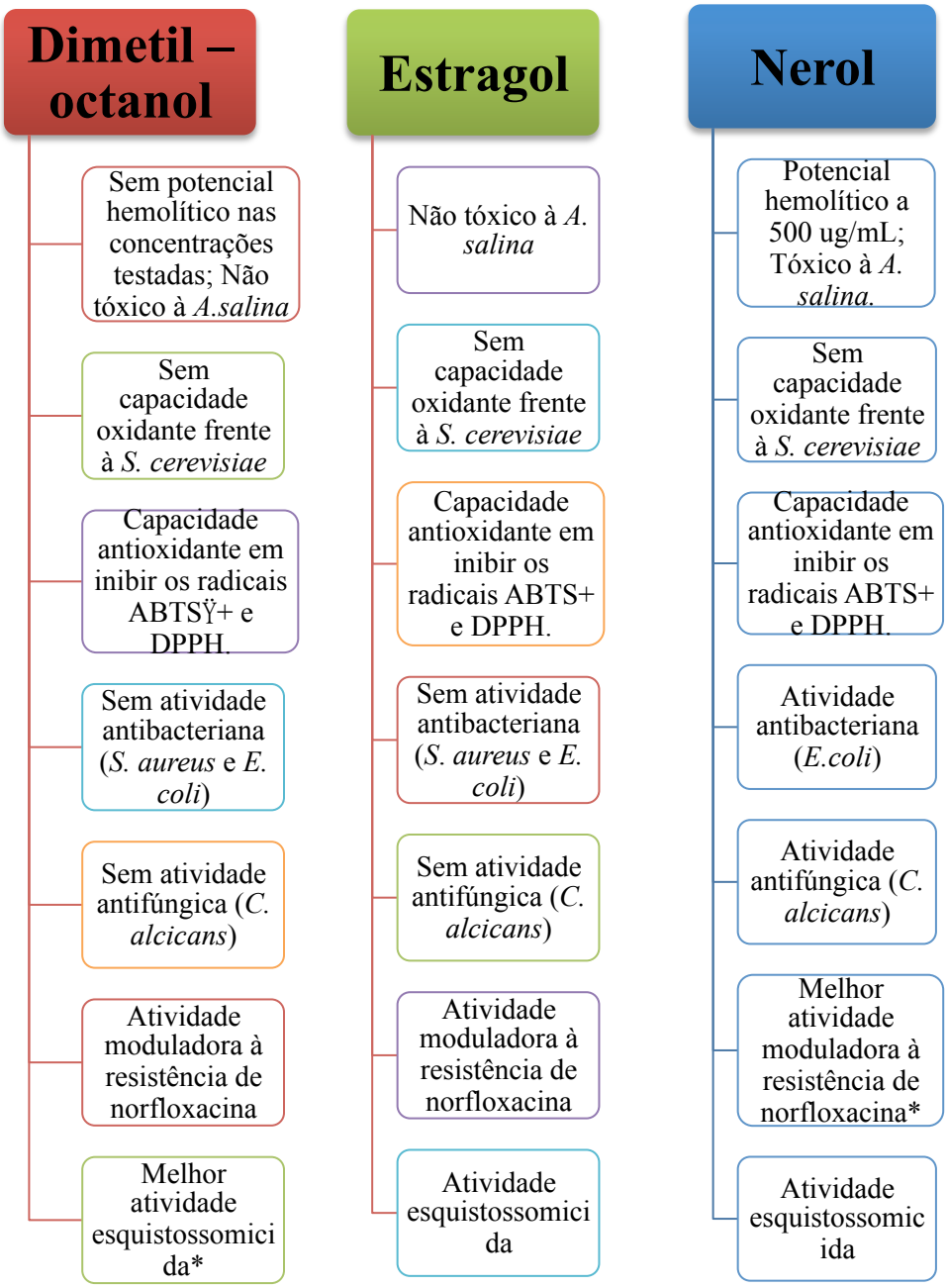
A avaliação antimicrobiana demonstrou discreta atividade intríseca para o nerol contra *E. coli* e *C. albicans*, enquanto o estragol e o dimetil octanol não demonstraram atividade antimicrobiana para as cepas testadas. Por outro lado, os monoterpenos testados, especialmente o nerol, foram capazes de inibir a bomba de efluxo de *S. aureus* NorA, indicando uma potencial utilização como adjuvantes de norfloxacina no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas.

A triagem antihelmíntica, desvelou atividade esquistossomicida para uma série de monoterpenos, em especial, para o dimetil octanol que demonstrou maior atividade contra o verme adulto de *Schistosoma mansoni.* Este bioativo foi capaz de induzir fortes danos no tegumento do parasita, o que indica uso promissor como agente parasitário.

Por fim, com intento de melhorar a solubilidade do nerol em meio aquoso, foi obtido complexo de inclusão de nerol em combinação com a β-ciclodextrina, o qual foi caracterizado por ensaios físico-químicos que sugeriram a complexação do nerol. Este complexo de inclusão irá facilitar o processo de incorporação no nerol em formas farmacêuticas futuras.

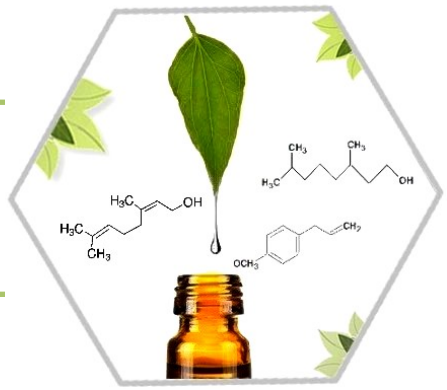
Neste panorama, a bioprospecção dos monoterpenos nerol, dimetil octanol e estragol atenderá à demanda crescente por substâncias inovadoras, alinhada à proposta de utilização sustentável da biodiversidade brasileira com resultados promissores que podem subsidiar o desenvolvimento de novos fármacos derivados de produtos naturais bioativos, com a possibilidade de menores efeitos adversos que as substâncias convencionais já disponíveis no mercado farmacêutico.

Figura 1 – Resumo do estudo de bioprospecção do dimetil-octanol, estragol e nerol.



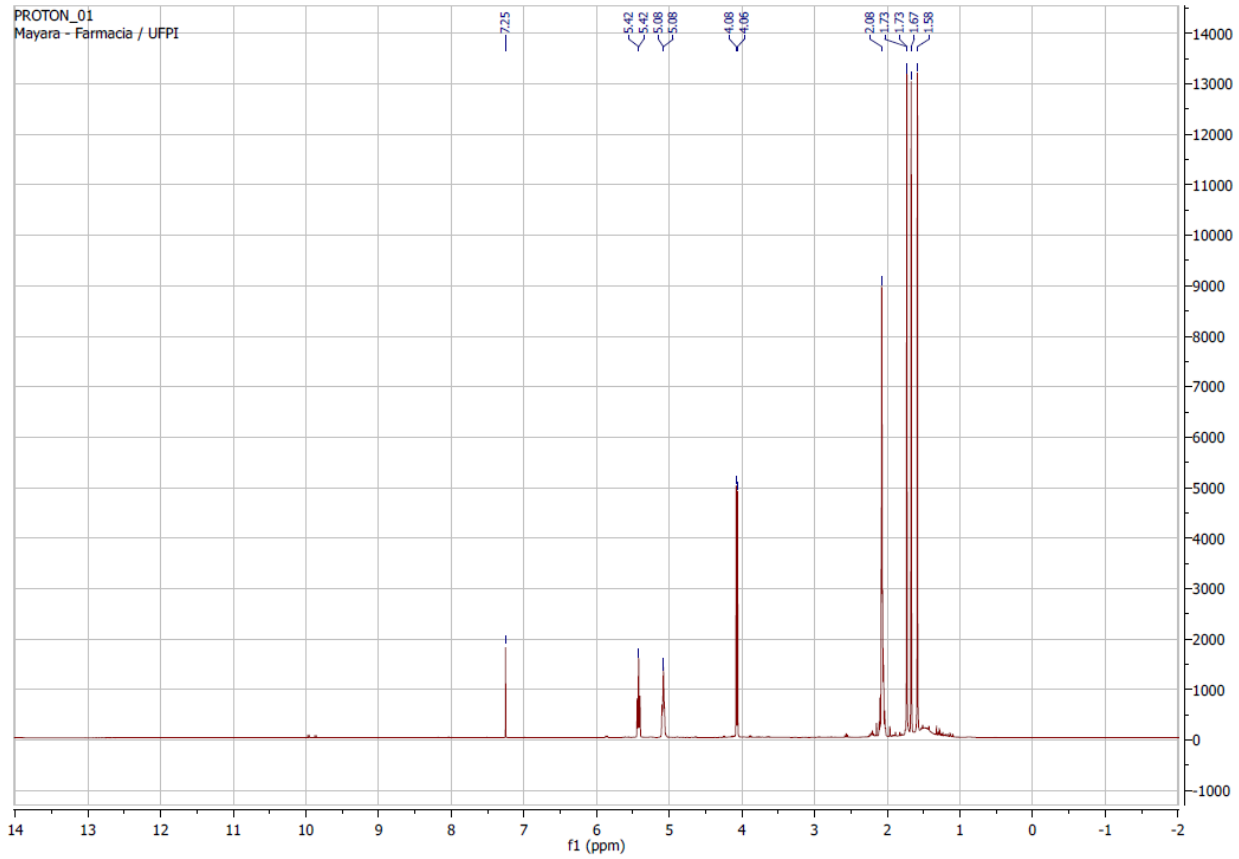
* Dentre os terpenos testados.

Apêndices

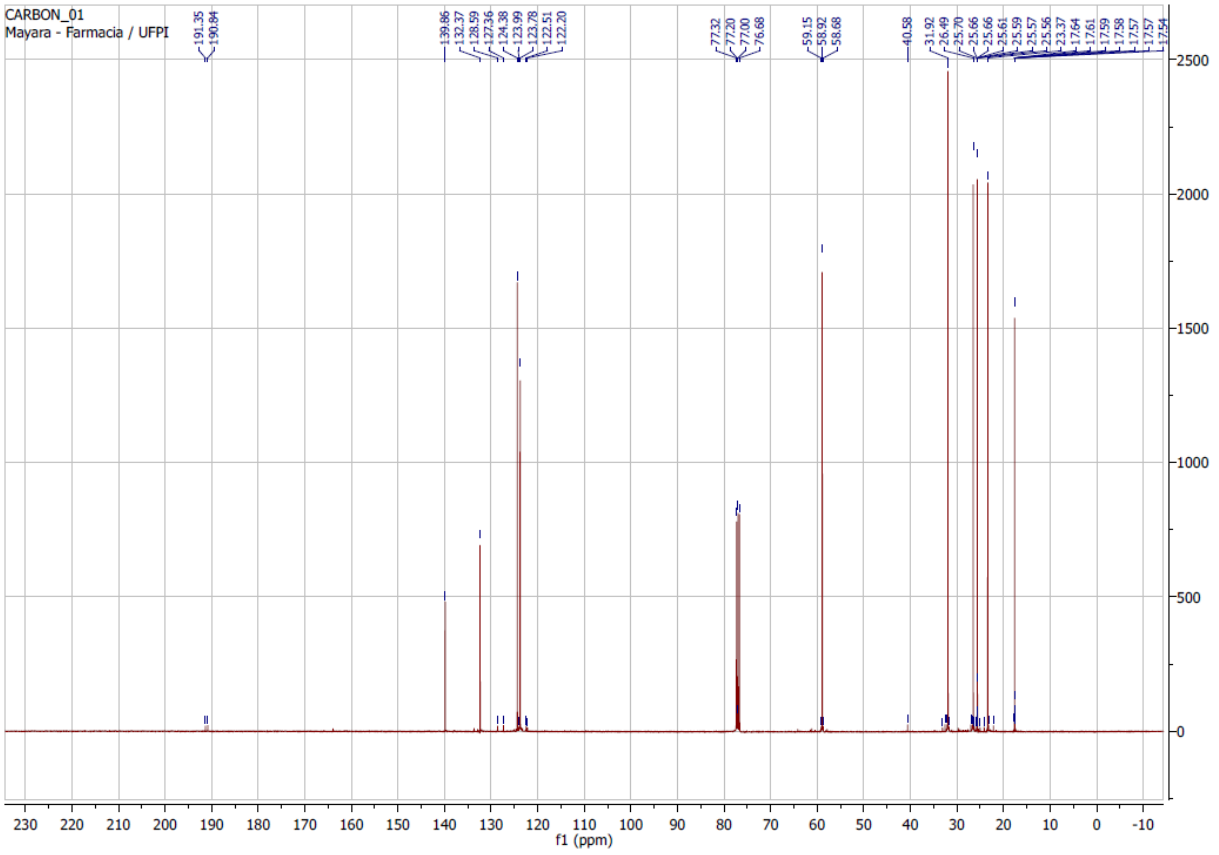


APÊNDICES

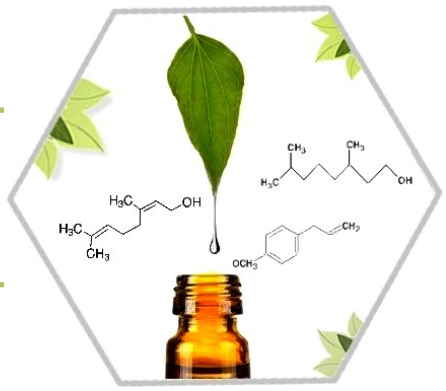
APÊNDICE A: ESPECTROS DE RMN ^{1}H DO NEROL



APÊNDICE B: ESPECTROS DE RMN ^{13}C DO NEROL



Produção Científica



PRODUÇÃO CIENTÍFICA

✓ ARTIGOS PUBLICADOS

1. SILVA, MARCOS P.N.; MAFUD, ANA C.; MONTEIRO, DANIELA C.; OLIVEIRA, MARIA F.; RESENDE, JOÃO G.; **COÊLHO, M. L.** ; DE SOUSA, DAMIÃO P.; MENDONÇA, RONALDO Z.; PINTO, PEDRO L.S.; FREITAS, RIVELILSON M.; MASCARENHAS, YVONNE P.; DE MORAES, JOSUÉ. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. Chemico-Biological Interactions (Print), v. 244, p. 129-139, 2015.

2. **COÊLHO, M.L.**; ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; FREITAS, R.M. Formulações farmacêuticas contendo monoterpenos: uma prospecção tecnológica. Revista GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias, v.3, p. 058-065, 2013.

3. **COÊLHO,** M.L., ISLAM, MD., MOURA, E.N., SANTOS, J.V.O.S., CAVALCANTE, A.A.M. Applications of monoterpenic essential oils in neglected diseases: nerol in a prospection. International Archives of Medicine.

4. **COÊLHO, M.L.**, Ferreira, J.H.L., SIQUEIRA JÚNIOR, J.P., KAATZ, G.W., BARRETO, H.M., CAVALCANTE, A.A.C.M. Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. Microbial Pathogenesis.

✓ ARTIGOS SUBMETIDOS

1. **COÊLHO, M.L.;** SANTOS, J.L.; OLIVEIRA, G.L.S.; ALENCAR, M.V.O.B.; SANTOS; J.V.O.; REIS, A.C.; ISLAM, M.T.; MATA, A.M.O.F.; PAZ, M.F.C.; CAVALVANTE, A.A.C.M. Cytotoxic and antioxidant capacity evaluation of nerol, estragol and dimethyl-octanol. Journal of Pharmacy and Pharmacology.

2. **COÊLHO, M.L.**, SILVA, H.O.M., ISLAM, M.T., VIANA, V.G.F., CAVALCANTE, A.A.C.M. Preparation, characterization and featuring of an inclusion complex of nerol with β-cyclodextrin. Current Pharmaceutical Biotechnology.

✓ **RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS**

1. MENDES, M.C.S.; **COÊLHO, M.L.**; FREITAS, R.M. Delineamento e controle de qualidade de uma nova formulação fitocosmética. In: IV Simpósio de Plantas Medicinais do vale do São Francisco, 2013, Juazeiro – Bahia. IV Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco. Juazeiro-Bahia: UNIVASF, 2013, v. CON567.

2. SILVA, H.O.M.; SANTOS, J.C.; **COÊLHO, M.L.**; FREITAS, R.M. Delineamento e Caracterização do Complexo de Inclusão de nerol e β-ciclodextrina. In: III Workshop de Projetos e Dissertações do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014, Teresina. Os aspectos interdisciplinares da P&D de medicamentos. Teresina: , 2014. v.1. p. 26 – 29.

3. SANTOS, J.C.; SILVA, H.O.M.; **COÊLHO, M.L.**; FREITAS, R.M. Delineamento e caracterização físico-química de micropartículas de nerol. In: III Workshop de Projetos e Dissertações do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014, Teresina. Os aspectos interdisciplinares da P&D de medicamentos. Teresina, 2014. v.1. p.43 – 45.

4. **COÊLHO, M.L.**; COSTA, L.M.; MORAES, J.; FREITAS, R.M. Anthelmintic potential of a natural compound against *Schistosoma mansoni.* In: Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza.

5. **COÊLHO, M.L.**; SANTOS, P.S.; MORAES, J.; FREITAS, R.M. Evaluation of anthelmintic properties of a bioactive compound against *Schistosoma mansoni*. In: II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste, 2014, Parnaíba. II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste, 2014.

6. ALMENDRA, R.B.; **COÊLHO, M.L.**; LIMA, V.S.; LIMA, E.B.S.; VENTURA, C.A. The use of medicinal plants in cancer treatment: a literature review. In: II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste, 2014, Parnaíba. II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste. Parnaíba-PI, 2014.

7. **COÊLHO, M.L.**; FREIRE, J.A.P.; BRITO, C.A.R.S.; FERREIRA, J.H.L.; BARRETO, H.M.; FREITAS, R. M. Antimicrobial activity and modulating of norfloxacin resistance by monoterpenes in *Staphylococcus aureus*. In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos/ I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, 2015, Teresina. Anais do II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas/ II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos/ I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, 2015.

8. MOURA, E.N.; SANTOS, P.H.S.; REZENDE-JUNIOR, L.M.; **COÊLHO, M.L.** Utilização de Monoterpenos no Tratamento de Doenças Negligenciadas. In: I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015, Teresina. Anais do I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015.

9. **COÊLHO, M.L.**; SOUSA, K.S.; FREITAS, R. M. Aplicações do Nerol e Estragol no Tratamento da Esquistossomose: Um estudo prospectivo. In: I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015, Teresina. Anais do I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015.

10. **COÊLHO, M.L.**; SANTOS, J. C.; FREITAS, R. M. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TOXIDADE DO NEROL (*IN VITRO*). In: I Congresso Nacional de

Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015, Teresina. Anais do I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí - CONFARPI, III Jornada Acadêmica de Farmácia - JOFAR, I Workshop Integração: Ciências Farmacêuticas e Saúde, 2015.

11. **COÊLHO, M.L.**; ALMENDRA, R. B. ; FERRAZ, M. S. ; MAGALHAES, N. S. S. ; FREITAS, R. M. . DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOCAPSULES CONTAINING NEROL FOR TREATMENT OF SCHISTOSOMIASIS. In: 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, 2016, Coimbra. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, 2016.

12. **COÊLHO, M.L.**; FERREIRA, J. H. L. ; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. ; BARRETO, H. M. ; FREITAS, R. M.; CAVALCANTE, A. A. C. M. . INHIBITION OF THE NORA MULTIDRUG TRANSPORTER OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY OXYGENATED MONOTERPENES. In: CIPAM 2016 - 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, 2016, Coimbra. CIPAM 2016 - 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, 2016.

13. COÊLHO, M.L.; RIBEIRO, M. C. ; SILVA, H. O. M. ; CAVALCANTE, A. A. C. M. . Delineamento farmacêutico de um complexo de inclusão a partir de nerol e B-ciclodextrina como alternativa para tratamento da esquistossomose. In: II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, 2016, Parnaíba. Anais do II II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, 2016.

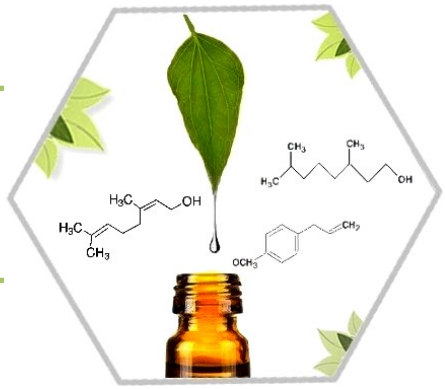
14. **COÊLHO, M.L.**; ALMENDRA, R.B.; OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, G.A.L.; FREITAS, R.M. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* de um monoterpeno. In: I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, 2015, Teresina. Anais do I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, 2015.

15. RIBEIRO, M. C. ; SANTOS, P. H. S. ; MOURA, E. N. ; **COÊLHO, M.L.** . Aplicações de monoterpenos para o tratamento de doenças negligenciadas: Um estudo prospectivo do nerol. In: II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, 2016, Parnaíba. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, 2016.

PREMIAÇÃO:

Menção Honrosa na modalidade oral do trabalho "Anthelmintic activity of a monoterpene against *Schistosoma mansoni"*, II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas (2015).

Anexos



ANEXOS

ANEXO A: Artigo publicado na revista GEINTEC – Gestão, Inovação e Tecnologias – Qualis B4 Biotecnologia



FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO MONOTERPENOS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

PHARMACEUTICAL FORMULATIONS CONTAINING MONOTERPENES: AN EXPLORATION TECHNOLOGY

Mayara Ladeira Coêlho[1]; Antônia Amanda Cardoso de Almeida[2]; Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho[3]; Rivelilson Mendes de Freitas[4]

[1] Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
mayaralcoelho@hotmail.com
[2] Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
antoniaamanda.almeida@gmail.com
[3] Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
rusbenebruno@hotmail.com
[4] Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil
rivmendes@hotmail.com

Resumo
Atualmente, a busca de novos produtos farmacêuticos à base de plantas revela uma alternativa ao desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. Nesse sentido, os monoterpenos são hidrocarbonetos derivados de plantas medicinais que já possuem diversos estudos sobre suas propriedades farmacológicas. O objetivo desse trabalho foi realizar uma prospecção tecnológica de formulações monoterpênicas, analisando a participação do país e o estado da arte nos depósitos de pedidos de patentes em bases nacionais e internacionais até o momento. Para isso, a prospecção foi realizada no Banco Europeu de Patentes, no banco da Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Banco Americano de Marcas e Patentes e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil. As classificações internacionais mais abundantes nessa prospecção foram A01N, A61K e C09D. O maior número de patentes foi depositado nos últimos 10 anos. A China é o país com maior número de patentes já depositadas.

Palavras-chave: formulação; monoterpeno; prospecção.

Abstract
Currently, the search for new herbal pharmaceutical products reveals an alternative to developing the national pharmaceutical industry. In this sense, monoterpenes are hydrocarbons derived from medicinal plants which already have several studies about its pharmacological properties. This work aimed perform a technologic prospection of monoterpenic formulations, analyzing the country's participation and the state of the art in the filings of patents in international bases yet. This way, prospection was performed on European Patents Office, on World Intellectual Property Organization, on United States Patent and Trademark Office and on Institute of Industrial Property of Brazil database. The most abundant international classifications on this prospection were A01N, A61K e C09D. The largest number of patents was filed in the last 10 years. China is the country with highest number of patents already filed.

Key-words: formulation; monoterpene; prospection.

1. Introdução

O presente trabalho relata o estágio de desenvolvimento tecnológico e científico da utilização de monoterpenos em formulações farmacêuticas. Os terpenos são hidrocarbonetos classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas formadoras em: hemiterpenos (C5, 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C10, 2 unidades isoprênicas), sesquiterpenos (C15, 3 unidades isoprênicas), diterpenos (C20, 4 unidades isoprênicas) e politerpenos (C5)n (AHARONI et al., 2005).

Monoterpenos são os principais componentes das resinas (cola ou goma das árvores), podendo compor os óleos essenciais. Essas substâncias são produzidas e emitidas pelas folhas de árvores e possuem propriedades de grande interesse médico, dentre elas antimicóticas,

cardiovasculares, antihelmínticas, antibióticas e anti-inflamatórias (BELANGER, 1998; FERNANDES et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

Apesar do uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações, constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação (SANTOS et al., 2008). Entretanto, a total aceitação de drogas derivadas de plantas e a fitoterapia na medicina científica só poderão ocorrer se estes produtos cumprirem os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade que os produtos sintéticos (RATES, 2001), já que os produtos derivados de plantas devem ter eficácia avaliada e confirmada, assim, como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para sua saúde.

No contexto social moderno, algumas limitações atuais do uso de medicamentos, como altos custos de alguns produtos disponíveis no mercado, favorecem o retorno ao estudo de plantas com propriedades medicinais para o controle de diversas doenças (HAMMOND et al., 1997). As necessidades do mercado farmacêutico aliadas ao reconhecimento de que pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novas drogas levaram a um aumento do número de publicações neste campo, em virtude do reconhecimento da importância desta área de estudo por parte das instituições privadas ou governamentais (RATES, 2001).

2. Metodologia

No presente trabalho, a prospecção foi baseada na pesquisa de patentes nas bases de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), no *United States Patente and Trademark Office* (USPTO) e na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), utilizando as palavras-chaves os termos *formulation* ou formulação, *monoterpene* ou monoterpeno e *formulation and monoterpene* ou formulação and monoterpeno.

A pesquisa de patentes foi realizada em abril de 2013. Foram analisados todos os pedidos de patentes existentes entre 1984 (ano do primeiro depósito) até o presente momento.

3. Resultados e Discussão

A prospecção tecnológica foi utilizada como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos, os quais são capazes de influenciar de forma

significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2012, p. 505; SERAFINI et al., 2012, p. 427).

Primeiramente, foi avaliado o número de pedidos de patentes depositados por base de dados de acordo com os termos utilizados (Tabela 1). Foram encontrados muitos documentos envolvendo os termos monoterpeno ou *monoterpene*, principalmente nas bases EPO (570) e WIPO (382). O mesmo foi observado com o termo formulação ou *formulation*, com 54813 documentos na WIPO e 77226 documentos na EPO. Entretanto, quando confrontados os termos *monoterpene* and *formulation* e monoterpeno e formulação, pode ser observado que o número de pedidos de patentes depositados é bastante reduzido (Tabela 1), o EPO possui 11 pedidos, enquanto que a WIPO possui 5. Além disso, nenhum pedido de patente está depositado no INPI.

Tabela 1 - Número de patentes depositadas por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados.

Palavra-chave	INPI	EPO	USPTO	WIPO
Monoterpene ou monoterpeno	10	570	6	382
Formulation ou formulação	6436	77226	1432	54813
Monoterpene and formulation ou monoterpeno e formulação	0	11	1	5

Considerando que as bases do EPO e WIPO possuíam um número maior de patentes depositadas envolvendo o termo *monoterpene and formulation*, a pesquisa foi conduzida no sentido de explorar melhor as informações que essas bases pudessem fornecer a respeito da distribuição de patentes por país, ano de depósito e por Classificação Internacional de Patente (CIP).

3.1. Patentes depositadas no EPO

De acordo com a Figura 2, a China e a Alemanha são os maiores detentores de patentes envolvendo formulações monoterpênicas. Não há registro de depósito de patente por nenhuma patente brasileira e apenas uma patente australiana, países detentores das maiores biodiversidades de plantas, do qual se esperava mais registros de produtos desenvolvidos a partir de plantas medicinais.

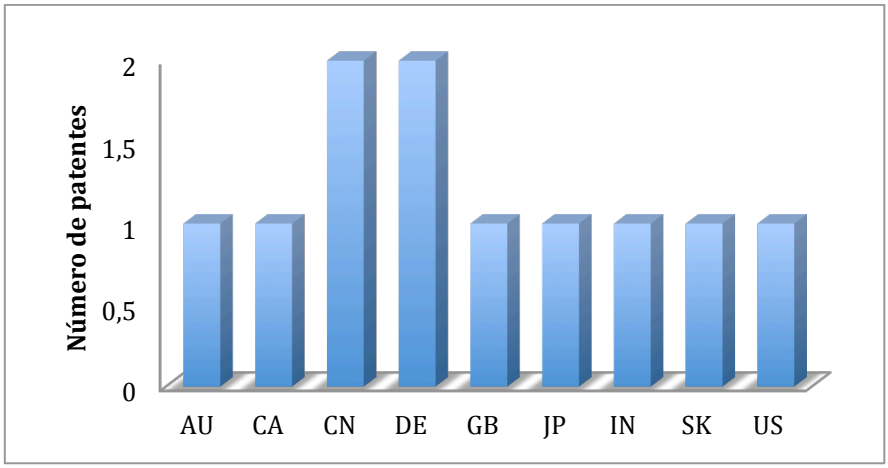


Figura 2 – Número de patentes depositadas na base europeia por país, sendo AU (Austrália), CA (Canadá), CN (China), DE (Alemanha), GB (Reino Unido), JP (Japão), IN (Índia), SK (Eslováquia) e US (Estados Unidos da América).

Os 11 pedidos de patentes encontrados com as palavras *monoterpene and formulation* foram analisados quanto ao ano de depósito (Figura 3). Um aumento no número de patentes a partir de 2000 foi verificado, e posteriormente uma queda foi registrada, retornando a mesma quantidade de registros inicial.

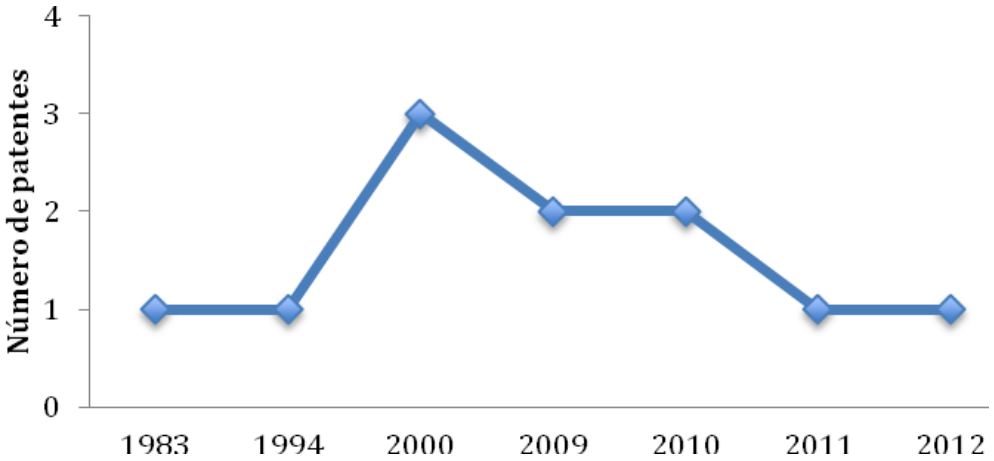


Figura 3 – Evolução anual do número de depósitos de patentes na base de dados europeia.

Dentre os 11 depósitos de pedidos de patentes encontrados, 6 estão alocados na subclasse A01N, que trata da conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos; Biocidas, por ex., desinfetantes, pesticidas, herbicidas; Repelentes ou atrativos de pestes; reguladores do crescimento de plantas. Contudo, um número de 4 patentes estão inseridas

na subclasse A61K, que engloba preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas, comprovando que os monoterpenos vêm sendo estudados com a perspectiva de gerar produtos com potencial terapêutico. Além disso, uma patente está inserida na classe C09D, que trata de composições de revestimento, removedores químicos de tintas para pintar ou imprimir; tintas para imprimir; fluídos corretores ou corantes para madeira.

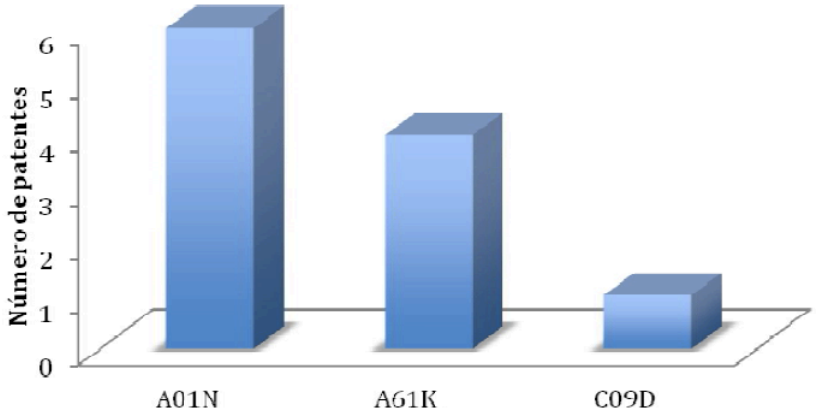


Figura 4 – Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontrados na base europeia.

3.2 Patentes depositadas na WIPO

Da mesma forma que no banco de dados europeu, nenhum país latino americano nem a Austrália apresentaram pedido de depósito de patente na WIPO, tendo em vista o potencial em biodiversidade que esses países têm em desenvolver formulações à base de plantas medicinais (Figura 5).

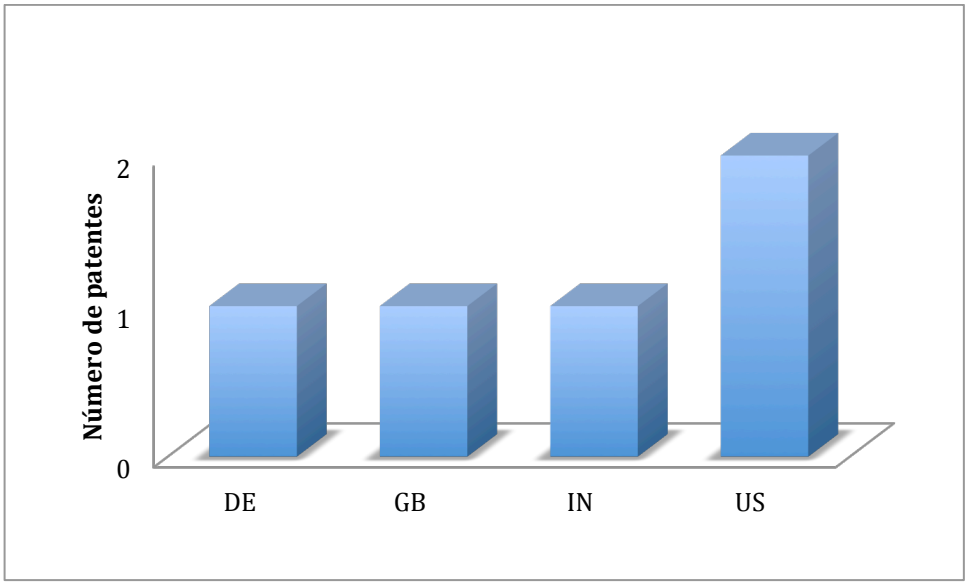


Figura 5 – Número de patentes depositadas no WIPO por país, sendo DE (Alemanha), GB (Reino Unido), IN (Índia) e US (Estados Unidos da América).

Analisando a evolução anual de patentes depositadas (Figura 6), foi possível verificar que os depósitos de pedidos de patentes nessa base surgiram no ano de 1984, sendo que houve um destaque em 2012, quando foram depositadas o maior número de patentes, o que não corrobora com a evolução anual do número de patentes na base de dados europeia demonstrada na Figura 3.

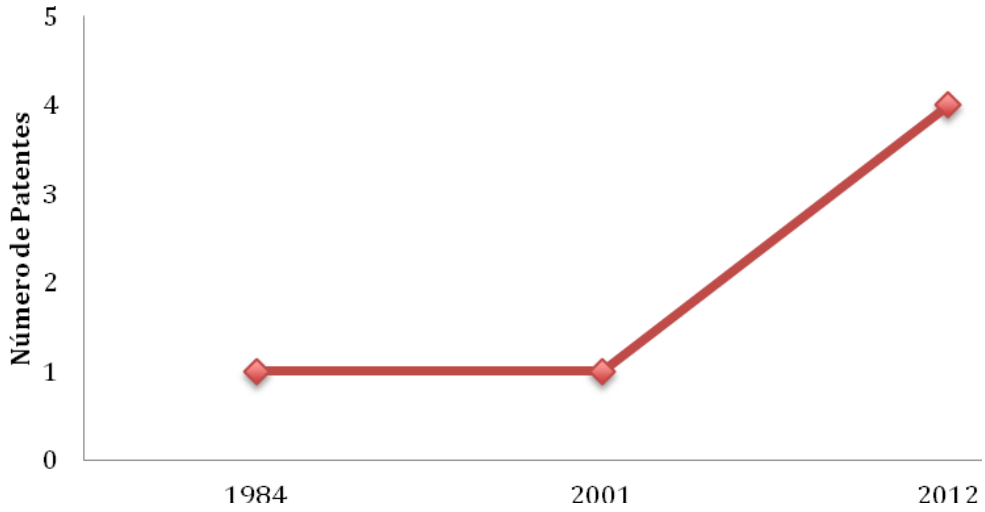


Figura 6 – Evolução anual do número de depósitos de patentes na WIPO.

Foi avaliada também a distribuição de patentes por CIP (Figura 7), tempo em que foi possível observar um perfil semelhante ao que foi verificado na base EPO. Apesar de não haver nenhuma patente na classificação A01N, as duas classes anteriormente descritas foram encontradas, A61K e C09D.

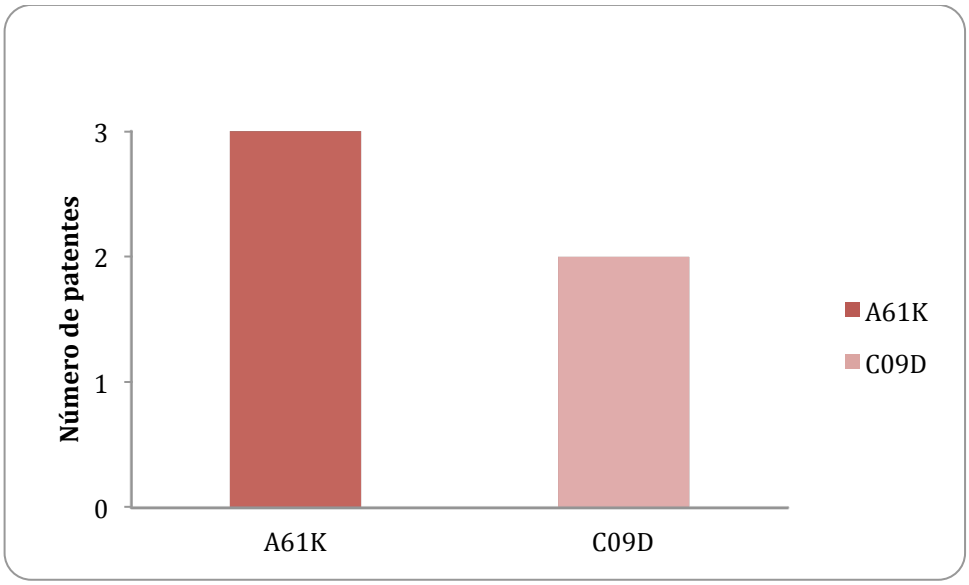


Figura 7 – Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontradas na WIPO.

4. Conclusões

Por meio da análise nas bases consultadas, foi possível observar que até o presente momento houve um número ainda insatisfatório de patentes envolvendo formulações à base de monoterpenos, apesar do verificado aumento no número de pedidos de patentes a partir do ano 2000. Além disso, foi constatado a ausência de patentes brasileiras envolvendo formulações monoterpênicas, o que demonstra a necessidade de investimento nacional em pesquisa, inovação e desenvolvimento na área de desenvolvimento de novos produtos com fins terapêuticos.

Referências

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. **Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants**. Trends in Plant Science. V.10 n.12, p. 594-602, 2005.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. 1st ed. Oregon Medical Press. Princeton, Minnesota, U.S.A, 2001.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs**. Toxicon, v. 39, p. 603-13, 2001.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. **Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine.** Veterinary Research Communications, v. 21, p. 213-28, 1997.

SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO. Quím Nova, v. 31(3), p. 601, 2005.

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; QUITANS-JUNIOR, L.J. **Cardiovascular effects of monoterpenes: a review**. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

ANEXO B: Artigo publicado na revista International Archives of Medicine – Qualis B2 - Biotecnologia

Applications of monoterpenic essential oils in neglected diseases: nerol in a prospection

Mayara Ladeira Coêlho[1,2,5], Md. Torequl Islam[1,2,3,5*], Éllen Nara Moura[4], Jose Victor de Oliveira Santos[5], Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante[1,2,5]

[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]Integral Diferencial College (FACID-DEVRY), Teresina, Piaui, Brazil.

[5]Laboratory of Genetical Toxicology, Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Brazil.

Abstract

Monoterpenes are the naturally occurred essential oils in various plant species having a wide range of biological activities. Attentions on the natural compounds, especially those are plant-derived is growing day by day. Nerol, a monoterpene having some important biological activities along with its other applications, may be a hopeful tool in this context. By considering the above circumstances, this study aimed to perform a scientific and technological prospective study on this charming monoterpene with an emphasis on the treatment of neglected diseases along with other monoterpenes. We conducted a comprehensive and systematic search for published articles, periodicals, magazines in the *CAPES, ScienceDirect* and *Pubmed,* while for patents we have gone through search in *National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI)*, *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)* and *United States Patent* and *Trademark Office (USPTO)*. Results suggesting monoterpenes have therapeutic potentials against malaria, dengue, schistosomiasis, tuberculosis, leprosies, leishmaniasis and chagas diseases. Nerol has anti-tuberculosis potential. In conclusion, more researches are recommenced with nerol in a context of treatment of neglected diseases.

Keywords: monoterpene; nerol; neglected diseases.

INTRODUCTION

Nowadays, natural products are in a great attention to the peoples for the treatment of various ailments (Marques *et al*., 2013). Having less adverse effects and promising therapeutic making them to consider as health promoting tools. Essential oils are one of them. Monoterpenes, a class of terpenes under the EOs are now evident to have a good number of biological activities (Craveiro and Machado, 1986; Cowan, 1999)

Nerol (*cis*-2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol), a monoterpene has potential biological activities in various *in vitro* and *in vivo* test systems (Marques *et al*., 2013). Studies regarding its action on the central nervous system (CNS) with antidepressant, anxiolytic, antinociceptive and anticonvulsant, along with the antioxidant, anti- inflammatory, antimicrobial and anthelmintic activities (Nogueira *et al*., 2013; Almeida *et al*., 2014; Costa *et al*., 2014; Silva *et al*., 2014). To be mentioned that nerol is found in various medicinal plants, those are reported to have significant antioxidant, antimicrobial and neuroprotective activities (Allahverdiyev *et al*., 2004; Escobar *et al*., 2010; Kennedy *et al*., 2013). Furthermore, nerol is used as a fragrance in cosmetics and toiletries (Lapczynski *et al*., 2008).

However, naturally occurring substances reveals therapeutic alternatives for the neglected diseases (ND), which are a group of illnesses representing mortality in a race-independent manner of people worldwide (WHO, 2016). People from the remote rural areas, urban slums or conflict zones are the most susceptible in this context. RDs are not only directly affect health, but also represent a vicious cycle of socio-economic events that reinforce the feedback on the other (Andrade, 2015). It is noteworthy that the existing therapies for the RDs are largely based on drugs having toxicity and prone to serious side effects, which leading to search new agents with more effectively and safety (WHO, 2016).

Therefore, this study aimed to carry out a systematic revision in a scientific and technological viewpoint on monoterpenes with the applications to NDs underlying a special attention to nerol.

MATERIALS AND METHODS

For articles we searched in the following databases of CAPES Periodicals (http://www.periodicos.capes.gov.br), *ScienceDirect* (http://www.sciencedirect.com) and *PubMed* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) while *National Institute of Industrial Property*

of Brazil (INPI), *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)* and *United States Patent and Trademark Office (USPTO)* databases were considered for patents. Evidences having same information were replaced by the newer.

Search (until November, 2015) has been made with the listed keywords as 'monoterpenes', 'nerol' and were them paired with 'neglected diseases', 'malaria', 'leprosy', 'leishmaniasis', 'dengue', 'chagas disease', 'tuberculosis' and 'schistosomiasis'. No language restrictions were imposed.

FINDINGS

Scientific and technological findings

In the search for articles, periodicals and magazines, monoterpenes constitute 57 periodicals, and 98 articles in CAPES, PM and SD in which SD occupied 61.29% while CAPES and PM by 36.77% and 1.94%, respectively. Among the 213 evidences, 66.19% articles belong to the database, SD leaving 27.23% periodicals, and 6.57% articles behind the CAPES and PM, respectively. However, patents searched in the databases, demonstrating that WIPO constitutes 47.06% then followed by 41.18% and 11.76% in EPO and INPI, respectively for monoterpenes. No patents were found in the USPTO. Otherwise, nerol constitutes 76 patents, among which 98.68% belongs to USPTO leavig behind 1.32% of WIPP database. No patents were funded in INPI and EPO databases (**Table 1**).

[Insert Table 1 here]

Table 2 suggests that evidences (periodicals, magazines and articles) on malaria (41.11%) are prominent for nerol then followed by tuberculosis (25.89%), dengue (8.12%) = leprosy (8.12%), schistosomiasis (6.59%) and leishmaniasis (5.08%) = chagas disease (5.08%), respectively. More evidence was found in SD, which was then followed an order of CAPES>PM. Patent search compromised with an order of malaria (30.00%)> leishmaniasis (22.50%)> tuberculosis (20.00%)> dengue (15.00%)> leprosy (7.50%)> schistosomiasis (5.00%)> chagas disease (0.00%). USPTO constitutes 98.75% patents, while WIPO by 1.25%. no patents were observed in INPI and EPO databases.

[Insert Table 2 here]

Figure 1 telling that IL is the owner of 31.06% patents on NDs, which was then followed an order of AW> US> CA> MA=NL=PA> AT=IN=LU> BS=FG=GA=IT=JP=ML=NO=UY, respectively.

[Insert Figure 1 here]

Patients were found from 1992 to 2014 suggest in 2004, 2009 and 2013 costitute 8 of each then followed by the order of 2010 (7)> 2007 (6)> 2003 (5) = 2006 (5)> 2000 (4) = 2001 (4) = 2012 (4)> 1997 (3) = 2002 (3) = 2014 (3)> 1992 (1) = 1994 (1) = 1995 (1) = 1999 (1) = 2011 (1), respectively.

Findings on neglected diseases (NDs)

Antimalarial activity

Terpenes are the potential sources of antimalarial activity (Parshikov *et al*., 2012). Choloroform extract of *Couroupita guianensis* fruit was found to act against a number of pathogenic microbes including mycobacteria. It also significantly inhibited the formation of biofilm of the pathogens (Al-Dhabi *et al*., 2012). EOs in the leaf extract of *Plinia cerrocampanensis* was found to produce significant antimalarial activity (Durant *et al*., 2014). Kpoviessi *et al*. (2014) founded EOs from the genus *Cymbopogon* having a potential anti-*Trypanosoma bruceibrucei* and anti-*Plasmodium falciparum* activity. EOs from *Lippia multiflora* is also evident to act against *Plasmodium falciparum* (Valentin *et al*., 1995). The ethanol extract of *Ocimum sanctum* is also evident to have antimalarial capacity (Archana and Namasivayam, 2000). An *in vivo* antimalarial activity was demonstrated with the allylic alcohol, geraniol by (Singh *et al*., 2003). Parshikov *et al*. (2012) also introduced few new terpenes with anti-malaria activity. A number of EOs derived from plants, including monoterpenes were introduced having mosquito repellent potential by Pohlit *et al*. (2011). Nanocapsules prepared with onopordopicrin, a sesquiterpene was suggested to have a significant antimalaria activity (Esmaeili *et al*., 2012).

Activity against dengue

Conti *et al*. (2010) reported that the *Aede salbopictus* larvae are susceptible to the EOs of *Achillea millefolium, Lavandula angustifolia, Helichrysum italicum, Foeniculum vulgare, Myrtus communis,* and *Rosmarinus officinalis*. EOs of the leaves of *Salvia dorisiana*, *S. longifolia*, and *S. sclarea* under the family, Lamiaceae exhibited potent anti-*A. albopictus* activity (Conti *et al*., 2012). Additionally, EOs from *Citrus sinensis*, *C. limon* and *C. paraíso* shells and its components were found to exhibit larvicidal potential against a number of mosquito (Giatropoulos *et al*., 2012). Pohlit *et al*. (2011) did a revision demonstrating EOs to have promising mosquito repellent capacity.

A research conducted by Pandey *et al*. (2013) of eugenyl acetate, linalyl acetate, terpinyl acetate, menthyl acetate, geranyl acetate along with the monoterpenes eugenol, linalool, terpineol, L-menthol and geraniol suggesting significant anti-*A. aegypti* activity with an LC_{50} value range between 50.2 to 415 ppm. A research done by Nyasembe *et al*. (2014) suggests that volatile phytochemicals may be good options for to repeal mosquito.

Anti-schistosomiasis activity

Mors *et al*. (1967) sugegsted all-trans (-)-14,15-epoxygeranyl-geraniol to have a potential anti-schistosomiasis activity. Thymol, β-citronellol, carvacrol and geraniol strongly inhibited snail-vector of *Schistosoma mansoni* (Radwan *et al*., 2008). EOs isolated from *Cymbopogon winterianus* exhibited significant anti-schistosomiasis activity between the LC_{50} value of 22.0 and 181.0 mg/L (Rodrigues *et al*., 2013).

Anti-tuberculosis potential

EOs from *C. guianensis* fruit was found to act *Mycobacterium tuberculosis* (Al-Dhabi *et al*. 2012). Kumar *et al*. (2013) observed that the *Plumeria bicolor* extract significantly inhibited the growth of *M. tuberculosis* and multi-drug resistant *M. tuberculosis*. Along with nerol, plumericin and isoplumericin were claimed as a potential candidate for antituberculosis activity. The antituberculosis activity of EOs was also observed by Kumar *et al*. (2013) with *Plumeria bicolor* extract. The *meso*-dihydroguaiaretic also exhibited a potential anti-*M. tuberculosis*

(Clemente-Soto *et al*., 2014). According to Chinsembu (2015) EOs may be one of the potential sources of antituberculosis activity.

Anti-leprosis activity

Ross (1949) suggested that thymol (a natural monoterpene phenol derivative of cymene) has an anti-leprosis activity. In 1955, Floch and Gelard also demonstrated similarly.

Anti-leishmaniasis and anti-chagas disease potentials

Monoterpenes with this type of activity is still to be investigated, despite of a number of medicinal plants have been introduced having anti-leishmaniasis potential (Rocha *et al*., 2005; Medeiros *et al*., 2011; Rohloff *et al*., 2013; Melo *et al*., 2013; Singh *et al*., 2014; Bahmani *et al*., 2015; Demarchi *et al*., 2015; Bosquiroli *et al*., 2015; Rodrigues *et al*., 2015). Saponins from *Calliandra pulcherrima* and *Quillaja saponaria* were found to exhibit significant anti-leishmaniasis activity against *Leishmania donovani* and *L. chagasi*. (Nico *et al*., 2007). Two monoterpenes, minutin A and B from purified from *Micromelum minutum* leaves acted against *Leishmania major* with IC_{50} values between 9.8 to 26.2 µM (Sakunpak *et al*., 2013). EOs from *Thymus capitellatus are evident to produce strong* anti-leishmaniasis *activity within the* IC_{50} *between* 35 to 62 µg/mL (Machado *et al*., 2014). Otherwise, Morais *et al*. (2014) found a few thymol and eugenol derivatives having potent anti-leishmaniasis activity.

CONCLUSION

Consistent with the obtained results, we observed a significant number of scientific papers and patent deposits involving monoterpenes and nerol. Although, there are links with neglected diseases, but found evidences in databases are firmly deficient with specific activities, despite of a number of essential oils are evident to have activity against neglected diseases. More research is requested in this field of study.

REFERENCES

Al-Dhabi NA, Balachandran C, Raj MK, Duraipandiyan V, Muthukumar C, Ignacimuthu S, Ali Khan I, Rajput VS. 2012. Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract. *BMC Complement Alternat Med* **12**: 242.

Allahverdiyev A, et al. 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomed* **11**: 657-666.

Almeida AAC, et al. 2014. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. *Pharmacol Biochem Behav* **118**: 69-78.

Andrade BL, Alves, Rocha DG. 2015. Neglected diseases, and bioethics: dialogue of an old problem with a new area of knowledge. *Rev Bioét Brasília* **23**: 105-113.

Archana R, Namasivayam A. 2000. Effect of *Ocimum sanctum* on noise induced changes in neutrophil functions. *J Ethnopharmacol* **73**: 81-85.

Bahmani M, Saki K, Ezatpour B, Shahsavari S, Eftekhari Z, Jelodari M, Rafieian-Kopaei M, Sepahvand R. 2015. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Biomed* **5**: 695-701.

Bosquiroli LSS, Demarque DP, Rizk YS, Cunha MC, Marques MCS, Matos MFC, Kadri MCT, Carollo CA, Arruda CCP. 2015. *In vitro* anti-*Leishmania infantum* activity of essential oil from *Piper angustifolium*. Braz J Pharmacogn **25**: 124-128.

Chinsembu KC. 2016. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. *Acta Trop* **153**: 46-56.

Clemente-Soto, AF, Balderas-Rentería I, Rivera G, Segura-Cabrera A, Garza-González E, Camacho-Corona MR. 2014. Potential Mechanism of Action of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules* **19**: 20170-20182.
Conti B, Benelli G, Leonardi M, Afifi FU, Cervelli C, Profeti R, Pistelli L, Canale A. 2012. Repellent effect of *Salvia dorisiana, S. longifolia*, and *S. sclarea* (Lamiaceae) essential oils against the mosquito *Aedes albopictus Skuse* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* **111**: 291-299.

Conti B, Canale A, Bertoli A, Gozzini F, Pistelli L. 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* **107**: 1455-1461.

Costa JP, et al. 2014. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. *Brain Res* **547**: 34-42.

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**: 564-582.

Craveiro AA, Machado MIL. 1986. Sci Today **23**: 54.

Demarchi IG, Thomazella MV, Terron MS, Lopes L, Gazim ZC, Cortez DAG, Donatti L, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC. 2015. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. *Exp Parasitol* **157**: 128-137.

Durant AA, Rodríguez C, Herrera L, Almanza A, Santana AI, Spadafora C, Gupta MP. 2014. Anti-malarial activity and HS-SPME-GC-MS chemical profiling of *Plinia cerrocampanensis* leaf essential oil. *Malar J* **13**: 18.

Escobar P, et al. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. Memories of the Oswaldo Cruz Institute **105**: 184-190.

Esmaeili A, Saremnia B. 2012. Preparation of extract-loaded nanocapsules from *Onopordon leptolepis* DC. *Indust Crops Prod* **37**: 259-263.
Floch H, Gelard A. 1949. Mechanism of action of sulfones in leprosy. IX. Mechanism of action of thymol derivatives of sulfone (silver or non-silver salts) administered orally. Publ Inst Pasteur Guyane Fr Inini 1955; 16: 1-11. *Int J Lepr* **17**: 237-245.

Giatropoulos A, Papachristos DP, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou MG, Emmanouel N, Michaelakis A. 2012. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitol Res* **111**: 2253-2263.

Kennedy D, et al. 2003. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officenalis* (lemon balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. *Neuropsychopharmacol* **28**: 1871-1188.

Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, Accrombessi G, Frédérich M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J. 2014. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol* **151**: 652-659.

Kumar P, Singh A, Sharma U, Singh D, Dobhal MP, Singh S. 2013. Anti-mycobacterial activity of plumericin and isoplumericin against MDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Pulm Pharmacol Ther* **26**: 332-335.

Lapczynski A, et al. 2008. Fragrance material review on nerol. *Food Chem Toxicol* **8**: 241-244.

Machado M, Dinis AM, Santos-Rosa M, Alves V, Salgueiro L, Cavaleiro C, Sousa MC. 2014. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. *Veterinary Parasitol* **200**: 39-49.

Marques THC, et al. 2013. Evaluation of the neuropharmacological properties of nerol in mice. *World J Neurosci* **3**: 32-38.

Medeiros MGF, Silva AC, Citó AMGL, Borges AR, Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. 2011. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* **60**: 237-241.

Melo JO, Bitencourt TA, Fachin AL, Cruz EMO, Jesus HCR, Alves PB, Arrigoni-Blank MF, Franca SC, Beleboni RO, Fernandes RPM, Blank AF, Scher R. 2013. Antidermatophytic and

antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Trop* **128**: 110-115.

Morais SM, Vila-Nova NS, Bevilaqua CML, Rondon FC, Lobo CH, Moura AAAN, Sales AD, Rodrigues APR, Figuereido JR, Campello CC, Wilson ME, Andrade Jr HF. 2014. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorg Med Chem* **22**: 6250-6255.

Mors WB, dos Santos Filho MF, Monteiro HJ, Gilbert B, Pellegrino J. 1967. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. *Sci* **157**: 950-951.

Nico D, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. 2007. Assessment of the monoterpene, glycidic and triterpene-moieties' contributions to the adjuvant function of the CP05 saponin of *Calliandra pulcherrima*. Benth during vaccination against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* **25**: 649-658.

Nogueira Neto JD, et al. 2013. Evaluation of antioxidant potential in vitro of nerolidol. *J Pharmaceut Sci Basic Appl* **34**: 125-130.

Nyasembe VO, Torto B. 2014. Volatile phytochemicals as mosquito semiochemicals. *Phytochem Lett* **8**: 196-201.
Pandey SK, Tandon S, Ahmad A, Singh AK, Tripathi AK. 2013. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Manag Sci* **69**: 1235-1238.

Parshikov IA, Netrusov AI, Sutherland JB. 2012. Microbial transformation of antimalarial terpenoids. *Biotechnol Adv* **30**: 1516-1523.

Pohlit AM, Lopes NP, Gama RA, Tadei WP, Neto VF. 2011. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils - a review. *Planta Med* **77**: 598-617.

Radwan MA, El-Zemity SR, Mohamed SA, Sherby SM. 2008. Potential of some monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against *Schistosomiasis* snail vector, *Biomphalaria alexandrina*. *Ecotoxicol Environ Saf* **71**: 889-894.

Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomed* **12**: 514-535.

Rodrigues KA, Dias CN, do Amaral FM, Moraes DF, Mouchrek Filho VE, Andrade EH, Maia JG. 2013. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Pharm Biol* **51**: 1293-1297.

Rodrigues KAF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho FAA. 2015. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent *α*-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. *J Ethnopharmacol* **160**: 32-40.

Rohloff J, Hymete A, Tariku Y. 2013. Chapter 11 - Plant-Derived Natural Products for the Treatment of *Leishmaniasis*. *Studies Nat Prod Chem* **39**: 381-429.

Ross H. 1949. The thymol turbidity and cephalin-cholesterol tests, euglobulin, albumin-globulin ratio and serology in leprosy.

Singh C, Gupta N, Puri SK. 2003. Geraniol-derived 1,2,4-trioxanes with potent *in-vivo* antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 3447-3450.
Singh N, Mishra BD, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. 2014. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem* **22**: 18-45.

Valentin A, Pélissier Y, Benoit F, Marion C, Kone D, Mallie M, Bastide JM, Bessière JM. 1995. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochem* **40**: 1439-1442.

World Helth Organization. 2016. Neglected tropical diseases. Access in: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

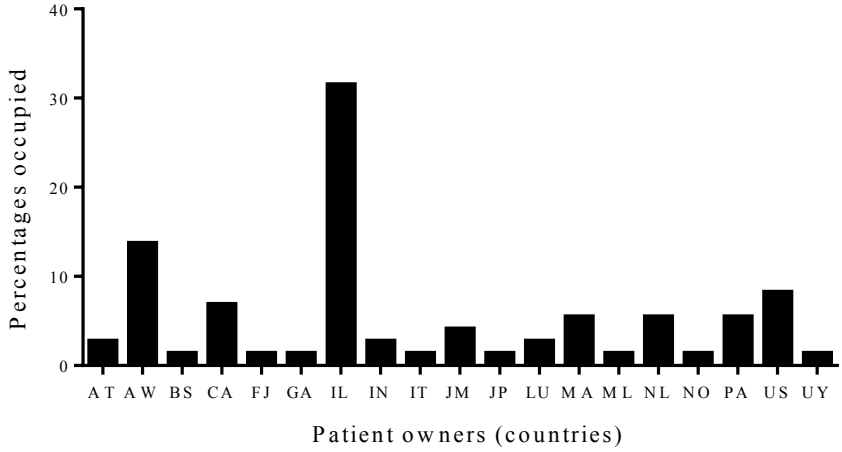


Figure 1. Patients on neglected diseases belonging to the owners with percentage occupied. [AW = Aruba; BS= Bahamas; CA = Canada; FJ= Fiji; GA= Gabon; GB= United Kingdom; IL = Israel; IN = India; IT= Italy; JM= Jamaica; JP= Japan; LU= Luxembourg; MA= Morocco; ML= Mali; NL = Netherlands; NO= Norway; PA= Panama; US= United States; UY = Uruguay]

Table 1. Databasic evidences of monoterpenes and nerol in neglected diseases (after sorting).

Substances	**Articles, periodicals and magazines**			**Patents**			
	CAPES	*PM*	*SD*	*INPI*	*EPO*	*USPTO*	*WIPO*
Monoterpenes	57	3	95	2	7	0	8
Nerol	58	14	141	0	0	75	1
PM: PubMed; SD: ScienceDirect; INPI: National Institute of Industrial Property of Brazil; EPO: European Patent Office; WIPO: World Intellectual Property Organization; USPTO: United States Patent and Trademark Office							

Table 2. Neglected diseases-wise databasic evidences of nerol.

NDs	**Articles, periodicals and magazines**			**Patents**			
	CAPES	*PM*	*SD*	*INPI*	*EPO*	*USPTO*	*WIPO*
Malaria	38	2	45	0	0	23	1
Dengue	7	2	7	0	0	12	0
Schistosomiasis	0	3	10	0	0	4	0
Tuberculosis	3	2	48	0	0	16	0
Leprosy	0	0	16	0	0	6	0
Leishmaniasis	0	1	9	0	0	18	0
Chagas disease	0	4	6	0	0	0	0
PM: PubMed; SD: ScienceDirect; INPI: National Institute of Industrial Property of Brazil; EPO: European Patent Office; WIPO: World Intellectual Property Organization; USPTO: United States Patent and Trademark Office							

ANEXO C: Artigo submetido à revista Journal of Pharmacy and Pharmacology – Qualis B1 - Biotecnologia.

Cytotoxic and antioxidant capacity evaluation of nerol, estragol and dimethyl-octanol

Mayara Ladeira Coêlho[1,2], Juliana Costa dos Santos[1,2], George Laylson da Silva Oliveira[1,2], Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar[1,2], José Victor de Oliveira Santos[2], Antonielly Campinho dos Reis[3], Md. Torequl Islam[1,2,4]*, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata[2], Márcia Fernanda Correia Jardim Paz[1,2], 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]*Integral Diferencial College (FACID-DEVRY), Teresina, Piaui, Brazil.*
[4]*Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, 22-Shahid Mirza Lane (E), Academic building-II, 1st floor, 739/A, Mehedibag Road, Mehedibag-4000, Chittagong, Bangladesh.*

***Correspondence:** Md. Torequl Islam; E-mail: rbiotufpi.br@gmail.com.

ABSTRACT

The therapeutic potentials of medicinal plants belong to their varieties of biochemicals. The monoterpenes, like the nerol, estragol and dimethyl-octanol, have antimicrobial, antifungal, anthelmintic and antioxidant activities. This study evaluated toxic, cytotoxic, oxidant/antioxidant effects by adopting a number of *in vitro* (DPPH and ABTS and ferric reducing potential), *ex vivo* (hemolysis) and *in vivo* (*Artemia salina* and *Saccharomyces cerevisiae*) test methods. Results suggested that the tested monoterpenes (31.25 – 500 μg/mL) did not exhibit cytotoxicity in *A. salina* and hemolysis tests. In the antioxidant test with a concentration range 0.9 to 14.4 mM, they showed radical ($ABTS^{\bullet+}$ and DPPH•) scavenging capacities in a dose-dependent manner. However, they did not oxidize the genetic material of *S. cerevisiae* (*SODWT*, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1/Sod2Δ, Cat1Δ, Cat1Δ/Sod1Δ) lines. In conclusion, the nerol, estragol and dimethyl-octanol monoterpenes may be natural sources of antioxidants with a safety profile in eukaryotic genome.

Keywords: Nerol; estragol; dimethyl octanol; cytotoxicity; antioxidant.

INTRODUCTION

Man has been seeking alternatives to improve their living conditions and found in plants, not only food, but especially a source of active ingredients for medicinal purposes (Probst, 2012). Nerol, estragol and dimethyl-octanol essential oils or volatile oils are the monoterpenes presents in aromatic plants and have sedative potentials, stimulatory effect on appetite and used in intestinal disorders. They are also known for their attractive, repellent and toxic effects to the insects and microorganisms. These three bio-actives present in essential oils, extract from various plant species, such as *Croton zehntneri*, *Cymbopogon citrates* Staupfs, *Cymbopogon nardus*, *Citrus bergamani*, *Zingiber officinalle* and *Lavandula* sp. (Knaak, 2010; Probst, 2012).

Monoterpenes are the constituents of essential oils from medicinal plants characterized by pleasant odor with the industrial application in flavorings, perfumes and cleaning products. In addition, they are known for their important biological activities such as antioxidant, antifungal, anti-inflammatory, antibacterial, analgesic, antispasmodic, anti-depressant, schistosomicidal activities and so on (Neto et al., 2012).

Nerol has antispasmodic and anthelmintic activities (Neto *et al*., 2012). Having a potential antioxidant capacity in various *in vitro* and *in vivo* test systems, nerol can be a good target for treating diseases related to the oxidative stress (Chtouyi et al., 2016). Oxidative stress is involved in the onset and/or development of many chronic diseases such as cancer, diabetes mellitus, atherosclerosis, depression, obesity, and neurodegenerative diseases like Parkinson's diseases (PD) and Alzheimer's disease (AD) (Salla *et al*., 2016). Certain defense mechanisms act in order to maintain the levels of reactive species (e.g. - oxygen/nitrogen; ROS/RNS) under normal conditions and to prevent oxidative damage, as the action of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione (GSH). There are antioxidant compounds that prevent or retard oxidation, like vitamin E, phenols, carotenes and vitamin C, through various means, such as inhibition and scavenging of free radicals and complexation with metals (Zhao *et al*., 2015). Thus, it has been sought substances capable of inhibiting free radicals/chemicals that have one or more unpaired electrons and who are capable to donate their electrons to other molecules, causing chain reactions and oxidative damage are the antioxidants (Cornelius *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2014).

Thus, the study aimed to evaluate the toxicity of nerol, estragol and dimethyl-octanol monoterpenes in *Artemia salina* and mouse erythrocytes along with antioxidant capacities in *in vitro* test systems naming as $ABTS^{\bullet+}$ and DPPH• radical scavenging and ferric reduction potential. Additionally, an *in vivo* test was conducted in one wild-type (SODWT), three single mutants (Sod1Δ, Sod2Δ and Cat1Δ) and two double mutants (Sod1/Sod2Δ and Cat1Δ/Sod1Δ) *Saccharomyces cerevisiae* strains.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals

Tween-80 (0.05%) dissolved in saline solution (0.9% NaCl) served as the vehicle. Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), hydrogen peroxide (H_2O_2), Triton X-100, and all the necessary reagents and chemicals used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Test systems

Artemia salina and mice (*Mus musculus*) erythrocytes were used for cytotoxicity test. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl), ABTS (2,2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) and ferric reduction assays were carried out as in vitro antioxidant capacity test. Six *Saccharomyces cerevisiae* strains (SODWT, Sod1Δ, Sod2Δ, Cat1Δ, Sod1/Sod2Δ and Cat1Δ/Sod1Δ) were collected for in vivo oxidant/antioxidant assay.

Preparation of test compounds

The tested monoterpenes and standards were dissolved in above mentioned vehicle to obtain different concentration ranges for each assay.

A. salina bioassay

This test was carried out with a slight modification of the method described by Amaral (2008). Briefly, shrimp cysts were incubated in a small aquarium containing brine solution (50 mg of cysts, to 300 mL of brine) for 48 h with direct lighting. Test samples (nerol, dimethyl octanol and estragol) were diluted in the brine solution to get a concentration range of 500 to 31.25 µg/mL with a final volume of 5 mL. Ten larvae were added to each tube, and after 24 h, manual observation was done to count the number of live naupli. In negative (NC) and positive (PC) control groups saline solution and potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) was added, respectively. The concentration range used in case of the PC group was 31.25 to 500 µg/mL.

Determination of hemolytic activity in mice erythrocytes

Hemolytic activity in mouse erythrocytes was performed according to Jamialahmadi (2014). Briefly, 300 µL of erythrocytes suspension (10% suspension in PBS, pH 7.4) was mixed with 500 µL of each monoterpene (31.25 - 500 µg/mL) and placed in a water bath at 37 °C for 2 h. After the reaction time, the reaction mixture was centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. A PC group was performed with Triton X-100 (31.25 - 500 µg/mL).

In vitro antioxidant assays

DPPH• radical scavenging capacity assay

DPPH assay was performed according to the method described by Abderrahim (2013). Briefly, a solution containing 300 µL of monoterpenes (0.9 - 14.4 µg/mL) was added to 2.7 mL of DPPH• solution (0.5 mM in ethanol). After 30 min, the absorbance was measured using a spectrophotometer at 517 nm. A similar concentration of TRO served as the positive control, while only 0.3 mL vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% NaCl solution) was added to the DPPH solution to the NC group. Work was done in triplicate.

$ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging capacity assay

The test was applied according to Carvalho (2012). Initially, the $ABTS^{\bullet+}$ is obtained from the reaction of 5 mL of a 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ solution with 88 µL of a 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) solution, then incubated at room temperature in the absence light for 16 h. In the

preparation of trolox (PC), 30 µL of the sample was pipetted and completed with the saline solution. An ABTS solution of 1.960 µL was added to each tube containing monoterpenes (0.9 - 14.4 µg/mL) and left to stand for six minutes in the dark. The PC group was performed with the same concentrations of trolox (as standard), while NC with 0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% NaCl solution (vehicle for monoterpenes). The absorbance was taken at 515 nm in a spectrophotometer. Work was done in triplicate.

Ferric reducing potential assay

The method was described earlier by Singhal (2013). Briefly, a mixture of 500 µL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), and 500 µL of 1% potassium ferricyanide was added to the tubes containing monoterpenes (0.9 to 14.4 µL/mL) was subsequently placed in a water bath at 50 °C for 20 min and added 500 µL of 10% trichloroacetic acid, 500 µL of distilled water, and 250 µL of 0.1% ferric chloride, which was then followed by taking absorbance at 700 nm in a spectrophotometer. The NC and PC groups were carried out with the vehicle and trolox, respectively. Work was done in triplicate.

In vivo antioxidant (*S. cerevisiae*) test

The central disc test was adapted from Oliveira *et al*. (2008). The *S. cerevisiae* strains used in the assay with their genotypes are shown in **Table 1**. The strain EG118 is defective in the cytoplasmic enzyme superoxide dismutase (CuZnSOD - *Sod1* gene product), while EG110 in mitochondrial SOD (MnSOD - *Sod2* gene product). Strain, EG133 is the double-defective mutant of *Sod1* and *Sod2* and EG223 is defective in the cytosolic catalase (*Cat1*). EG is a double isogenic strain of *Sod1* and *Cat1* genes, while EG103 corresponds to the wild type (SODWT) and is a proficient strain.

[Insert Table 1 here]

The strains were cultured in YEPD medium (Yeast extract 0.5%, bacto-peptone 2% and dextrose 2%) at 28 °C (Oliveira *et al*., 2012). Suspended cells were seeded in the center of a Petri dish in a continuous cycle. H_2O_2 (10 mM) was taken as a stressor in this study.

Statistical analysis

Values are mean ± standard deviation (SD). The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Newman-Keuls test using GraphPad Prism (version: 6.00; Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©), considering $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

A. salina bioassay

In brine shrimp lethality bioassay (BSLB), all monoterpenes exhibited low toxicity at 24 h (**Figure 1A**), while an increased mortality was observed at 48 hours (**Figure 1B**). BSLB is a cheap, rapid and sensitive test to assay a wide variety of toxicants including bioactive molecules. However, the toxicity depends on the concentration and time of exposure of the substances being tested (Zanon, 2010). In our study, we found a dose-response relationship for the all tested monoterpenes along with a time-dependent cytotoxicity.

[Insert Figure 1 here]

The classification of the cytotoxic activity of vegetable substances in *A. salina* with EC_{50} > 1000 µg/mL were considered as inactive (or non-toxic), while EC_{50} <100 µg/mL for highly active (very toxic) (Silva, 2015). BSLB permits an evaluation of acute toxicity and is considered an essential preliminary assay of the study of compounds with potential biological activity. In this test, the concentration of the test substances that causes death in 50% of live nauplii represent by the acronym EC_{50} (Oliveira *et al*., 2010). The mortality rate of larvae in our study of nerol other than estragol, dimethyl octanol exhibited prominent cytotoxicity with an EC_{50} of 76.61 µg/mL, suggesting the substance is toxic (Aguiar, 2014). However, dimethyl octanol showed better cytotoxic potential than the estragol.

Determination of hemolytic activity in mice erythrocytes

In hemolysis test, all the monoterpenes showed <25% hemolysis up to the concentration of 250 µg/mL. However, nerol at 500 µg/mL exhibited hemolysis by 39.12% (**Figure 2**). According to Carvalho (2012), toxicity tests should be considered as indispensable analyzes in biomonitoring of plant extracts. In general, the test for evaluation of hemolytic capacity in *in vitro* is used as a toxicological screening method, estimating the erythrocyte damage that may induce *in vivo*. This parameter has been used by the scientific community for the toxicological evaluation of various substances (Aranha, 2014).

[Insert Figure 2 here]

Cytotoxic analysis evaluates the potential of substances to cause damage to the plasma membrane of the cell, either by the formation of pores or total rupture of the membrane. Being an essential oil, nerol may act through this way. The hemolytic activity in erythrocytes of mice has a great similarity to the human erythrocytes (Silva, 2015). Thus, this method may have a great influence in the up-coming clinical study with nerol in the future (Sharma and Sharma, 2001).

In vitro antioxidant assays

The radical scavenging capacity of the tested monoterpenes is shown in **Figure 3** (DPPH•: **Figure 3A** and $ABTS^{\bullet+}$: **Figure 3B**). DPPH• is a stable radical with low deterioration and reactivity rate with most of the compounds. Therefore, only strong reducing substances are able to react with these radicals to stablize in a stoichiometric mode (Santos *et al*., 2007). Otherwise, $ABTS^{\bullet+}$ radical is produced by the oxidation of 2,2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) with the presence of $K_2S_2O_8$ solution (Tiveron, 2010), which is chemically very stable, soluble in both aqueous and organic solvents and not affected by the ionic strength of a number of solvent, thus the applicability of both hydrophilic and lipophilic extracts (Silva, 2015).

[Insert Figure 3 here]

The data presented in **Figure 3A** and **3B** show variation in inhibition of the DPPH and ABTS radicals in a concentration-dependent manner by the test samples. An increased dose is found to augment an increase in scavenging capacity of the radicals. Although, the activity of the monoperpenes was less than the standard drug, trolox, but estragol and nerol scavenged prominently the $ABTS^{\bullet+}$ and DPPH•, respectively. In a study, Oliveira (2012) showed estragol

did not show antioxidant activity in any analyzed concentrations from 7.83 to 500 μg/mL. In our study, we found estragol has good anti-radical capacity, especially observed in the DPPH radical scavenging assay.

The monoterpene, nerol having allylichydrogens (number: 13) (**Figure 4A**) may responsible for its antioxidant capacity. Formation of resonance structure is the main reason in this context. Possible hydrogen abstraction and formation R^+ is shown in **Figure 4B**.

[Insert Figure 4 here]

According to Carvalho (2012) substances having anti-radical and strong reducing capacity are capable to inhibit lipid peroxidation and protein oxidation. Ferric reducing potential technique is often used as an indicator of electron donation activity. In this method, the yellow color of the solution in a question changes shades of green to blue depending on the power of reduction of each substance (Macêdo, 2011). However, in our study, the monoterpenes a showed low reduction capacity of iron (Fe^{+3} to Fe^{+2}) in comparison to the standard drug, trolox (**Figure 5**).

[Insert Figure 5 here]

To be mentioned that, the reduction of iron ions (Fe^{3+}/Fe^{2+}) is influenced by the solubility of the reducing compounds, which in turn is influenced by the presence of other acyclic, monocyclic, and bicyclic monoterpenic components, derived from phenyl propane and sesquiterpene lactones (Silva, 2015). Thus, the reducing capacity of the tested monoterpenes may affected by this consequence.

In vivo antioxidant (*S. cerevisiae*) test

S. cerevisiae is a popular test system of a wider number of biological for the oxidative stress capacities. The metabolism of *S. cerevisiae* is similar to that of higher eukaryotes, featured by the activation of cytochrome P450 and detoxification, those are not present in prokaryotes (e,g,- bacteria) (Stegeman *et al*., 2015). In this study, nerol, estragol and dimethyl octanol at any concentration did not induce oxidative damage in any tested *S. cerevisiae* strains (**Table 2, 3** and **4**).

[Insert Table 2 here]

[Insert Table 3 here]

[Insert Table 4 here]

Yeasts, mainly the *S. cerevisiae* species are used in food and beverage industries as well as research laboratories (Del Rio, 2004). Being a eukaryotic system, *S. cerevisiae* has similarities with mammalian cells at the level of organelles and macromolecular components, and many of its proteins can be functionally interchangeable with homologous human proteins. Otherwise, the genetic manipulation of it is cheaper compared to other models. Moreover, the antioxidant response of *S. cerevisiae* is similar to mammalian cells and 30% of genes related to human diseases are functional homologues in yeast, which making the extensive utilization of this test system popularly (Torre-Ruiz *et al*., 2015; Yi and Huh, 2015).

Organisms, in general, are protected against damage caused by oxidative stress by endogenous enzymes such as SOD, CAT, GPx and glutathione reductase (GR), those are able to remove free radicals and other oxidizable species and/or repair oxidative damages. Those enzymes also remove superoxide and peroxides before reacting with catalystic metals to form further reactive compounds. However, this inhibition may promote an imbalance in the levels of ROS and free radicals, thus causes DNA damage, protein denaturation, lipid peroxidation and even cell death (Jiang *et al*., 2015).

Data indicate that nerol (**Figure 6**), estragol (**Figure 7**) and dimethyl-octanol (**Figure 8**) showed significant antioxidant activity in *S. cerevisiae*, as they inhibited oxidative damage caused by the stressor, H_2O_2 in all strains and concentrations tested. Percentage modulation of oxidative damage was seen above 60%.

[Insert Figure 6 here]

[Insert Figure 7 here]

[Insert Figure 8 here]

SOD converts superoxide anions (O_2-) in hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2), is the first line of defense against toxic effects of O_2-. Otherwise, CAT causes a decomposition of H_2O_2 to O_2 and water (H_2O) (Lopez-Huertas and Rio, 2014; Ni *et al*., 2015). It is also suggested that antioxidant enzymes act as second messengers, for example, in a study Bayer *et al*. (2015) observed a decreased level of in Mn-SOD in the early stages of cancer. However, only the SOD and CAT are insufficient to defend high levels of ROS, thus promoting imbalance and continuous cell damage, which may lead onset and/or progression of diseases, especially cancer and neurodegenerative diseases (Cengiz *et al*., 2015).

CONCLUSION

Medicinal plants, rich in monoterpenes are commonly used in folk medicine to treat various diseases. In this study, nerol, estragol and dimethyl-octanol monoterpenes showed low cytotoxicity in *A. salina* and mice erythrocytes. Although low antioxidant effect was observed in ferric reducing potential test, but significant inhibition of the oxidative damage caused by H_2O_2 in all the *S. cerevisiae* strains were seen at all concentrations of the tested monoterpenes. Moreover, nerol showed a prominent antiradical capacity in ABTS and DPPH assays. In conclusion, these monoterpenes, especially nerol may be considered as an important natural antioxidant.

REFERENCES

Abderrahim F, Arribas SM, Gonzalez MC, Condezo-Hoyos L. 2013. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. *Food Chem* **141**: 788-794.

Aguiar UN. 2014. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *crotonzehntneri*com β-ciclodextrina. *Química Nova* **37**: 50-55.

Amaral EN, Silva RMG. 2008. Revista Eletrônica da Pesquisa. Avaliação da Toxidade Aguda de Angico (AnadenantheraFalcata), Pau-santo (KilmeyeraCoreacea), Aroeira

(MyracrodruonUrundeuva) e Cipó-de-São-João (PyrostegiaVenusta), por meio do Bioensaio com Artemia Salina. p. 1-16.

Aranha ESP. 2014. Avaliação do Potencial Anticâncer *in vitro* de Óleos Essenciais de Plantas do Gênero *Eugeni.* 2014. 82 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Manuas.

Bayer JL, Spitz DR, Christensen D, McCormick ML, Farley D, DeGeest K, Damoush L, Aust S, Sood AK, Lutgendorf SK. 2015. Brain, Behavior, and Immunity Biobehavioral and neuroendocrine correlates of antioxidant enzyme activity in ovarian carcinoma. *Brain Behav Immunity* **50**: 58-62.

Carvalho DF. 2012. Estudo do Potencial Antioxidante *in vitro* e *in vivo* do Extrato Aquoso das Folhas de *Centratherumpunctatum*ssppunctatumCass. (Asteraceae). 2012. 81 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Piauí.

Cengiz S, *et al*. 2015. Variations in antioxidant enzyme levels of rats exposed to ethanol extracts of *Convolvulus* species. *Ind Crops Prod* **74**: 304-308.

Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, Graziano A, Milone P, Pennisi G, Radak Z, Calabrese EJ, Cuzzocrea S. 2013. Traumatic brain injury: oxidativestress and neuroprotect ion carolin. *Antioxid Redox Signal* **10**: 836-853.

Del Rio DT. 2004. Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Jamialahmadi K, Arasteh O, Riahi M, Mehri S, Riahi-Zanjani B, Karimi G. 2014. Protective effects of glucosamine hydrochloride against free radical-induced erythrocytes damage. *Environ Toxicol Pharmacol* **38**: 212-219.

Jiang J, Qin C, Shu X, Chen R, Song H, Li Q, Xu H. 2015. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of copper on induction of thiol-compounds and antioxidant enzymes by the fruiting body of Oudemansiella radicata. *Ecotoxicol Environ Safety* **111**: 60-65.

Knaak N, Fiuza LM. 2010. Potencial dos Óleos Essenciais de Plantas no Controle de Insetos e Microrganismo. *São Leopoldo* **5**: 120-123.

Lopez-Huertas E, Río LA. 2014. Characterization of antioxidant enzymes and peroxisomes of olive (*Olea europaea* L.) fruits. *J Plant Physiol* **171**: 1463-1471.

Macêdo JBM. 2011. Capacidade Antioxidante *in vitro* a Avaliação Toxicidade Aguda *in vivo* de extratos de Folhas de Licania rígida Benth.,Licania Tomentosa (Benth) Fritsch e Couepeia Imprensa Prance (Chrysobalanaceae). 101 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Neto JDN, Sousa DP, Freitas RM. 2012. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. Teresina, p. 125-130.

Ni L, Jie X, Wang P, Li S, Wang G, Li Y, Li Y, Acharya K. 2015. Effect of linoleic acid sustained-release microspheres on Microcystis aeruginosa antioxidant enzymes activity and microcystins production and release. *Chemosphere* **121**: 110-116.

Oliveira CBS. 2012. Avaliação das Atividades Anti-toxoplásmica, Antioxidante e Antiinflamatória dos Momentos Timol (*Lippiasidoides*) e Estragol (*Crotonzenhtneri*). 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Oliveira CBS. 2012. Avaliação das Atividades Anti-toxoplásmica, Antioxidante e Antiinflamatória dos Momentos Timol (*Lippiasidoides*) e Estragol (*Crotonzenhtneri*). 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Oliveira DAF, Barbosa RSS, Okuyama CE. 2010. I Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica- UNIBAN. Avaliação Toxicológica de Compostos Bioativos e Insumos Farmacêuticos. São Paulo, p. 1- 2.

Probst IS. 2012. Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de Potencial Sinérgico. 2012. 102 f Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, São Paulo.

Salla S, *et al*. 2016. Antioxidant activity of papaya seed extracts against H_2O_2 induced oxidative stress in HepG2 cells. *LWT - Food Sci Technol* **66**: 1497.e1-1497.

Santos *et al*. 2007. Influencia do processamento e da torrefacao sobre a atividade do cafe (*Coffea arabica*). *Quimica Nova* **30**: 604-610.

Sharma P, Sharma JD. 2001. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes – Byplant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* **74**: 239-243.

Silva JN. 2015. Atividade Antioxidante e Citotóxica de Extratos de Plantas do Semiárido Brasileiro com Potencial para Desenvolvimento de Fitoterápicos. 2015. 167 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Silva JN. 2015. Atividade Antioxidante e Citotóxica de Extratos de Plantas do Semiárido Brasileiro com Potencial para Desenvolvimento de Fitoterápicos. 2015. 167 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Singhal M, Paul A, Singh HP. 2013. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. *J Saudi Chem Soc* **47**: 93-97.

Stegeman JJ, Behrendt L, Woodin BR, Kubota A, Lemaire B, Pompon D, Goldstone JV, Urban P. 2015. Functional characterization of zebrafish cytochrome P450 1 family proteins expressed in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1850**: 2340-2352.

Tiveron AP. 2010. Atividade Antioxidante e Composição Fenólica de Legumes e Leveduras Consumidos no Brasil. 102 f. Dissertação (Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciencias e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Torre-Ruiz MADe, Pujol N, Sundaran V. 2015. Coping With Oxidative Stress: The Yeast Model. *Curr Drug Targets* **16**: 2-12.

Yi D, Huh W. 2015. Biochemical and Biophysical Research Communications UDP-glucose pyrophosphorylase Ugp1 is involved in oxidative stress response and long-term survival during stationary phase in Saccharomyces cerevisiae. *Biochem Biophys Res Comm* **467**: 657-663.

Zanon G. 2010. Análise Fitoquímica e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase das Espécies ZanthoxylumRhoifolium e ZanthoxylumHyemale. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Zhang J, Hou X, Ahmad H, Zhang H, Zhang L, Wang T. 2014. Assessment of free radicals scavenging act ivity of seven natural pigments and protect ive effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem* **145**: 57-65.

Zhao S, *et al*. 2015. NeuroToxicology Full length article Puerarin attenuates learning and memory impairments and inhibits oxidative stress in STZ-induced SAD mice. *Neurotoxicol* **51**: 166-171.

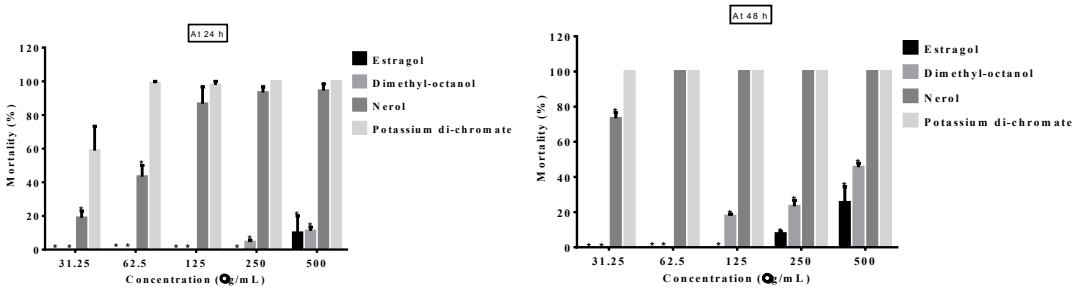


Figure 1. Percentage of mortality of *Artemia salina* with the monoterpens. [Values are mean ± SD. Data with triplicate. *p <0.05 compared to $K_2Cr_2O_7$ (ANOVA followed by post-hoc Neuman-Keuls test. **A** - 24 h and **B** - 48 of treatment with nerol, estragol, dimethyl octanol, and $K_2Cr_2O_7$ (31.25 to 500 µg/mL)]

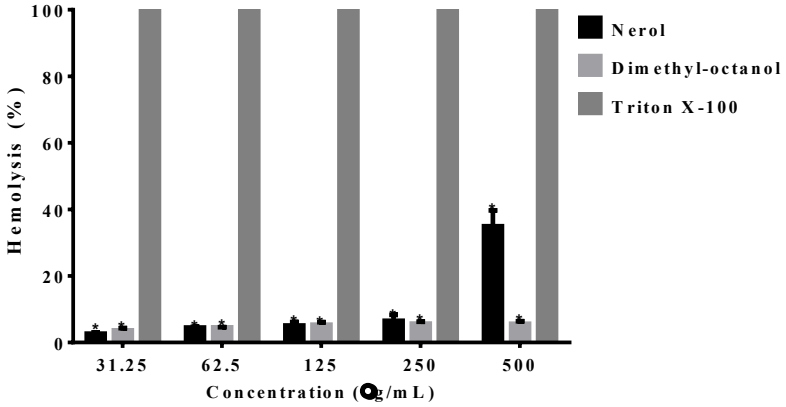


Figure 2. Hemolytic capacity of nerol, estragol, dimethyl octanol and Triton X-100 [Values are mean ± SD (n = 3; duplicated data). *p <0.05 vs Triton X-100 (ANOVA followed by *t*-Student post-hoc Neuman-Keuls test).

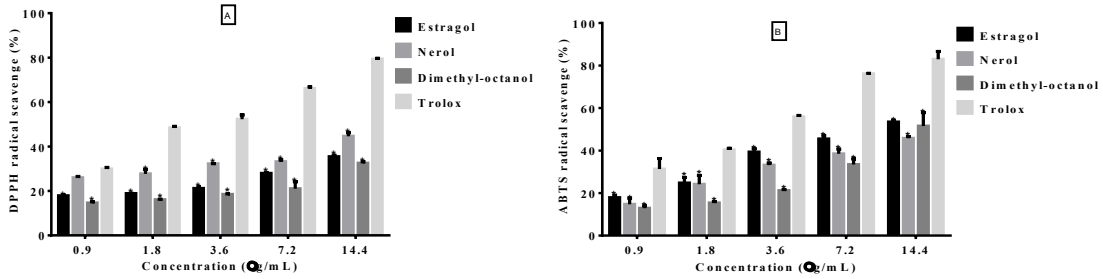
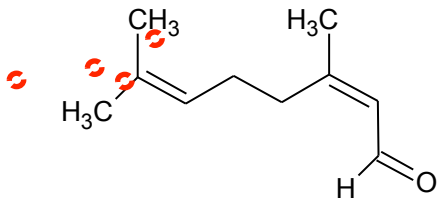
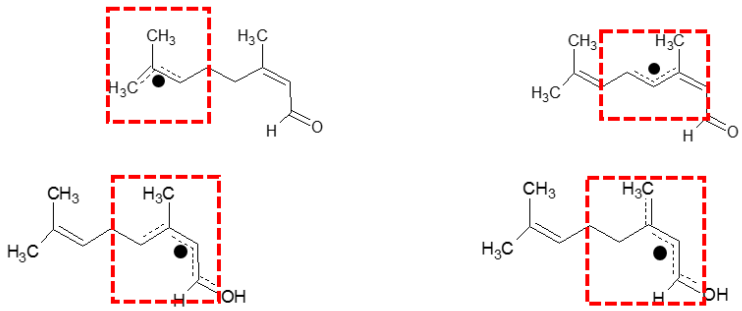


Figure 3. Effects of nerol, estragol, dimethyl octanol and trolox in the inhibition of DPPH (A) and ABTS (**B**) radicals. [Values are mean ± SD (n = 3, duplicated data). *p <0.05 vs Trolox (ANOVA followed by *t*-Student post-hoc Neuman-Keuls test).



(**A**)



(**B**)

Figure 4. **(A).** Indication of allylic hydrogens in Nerol. **(B).** Possible antioxidant mechanism of nerol action in neutralizing R^{+}.

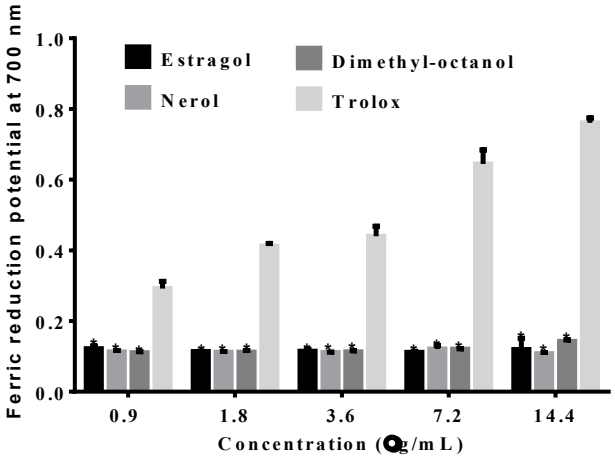
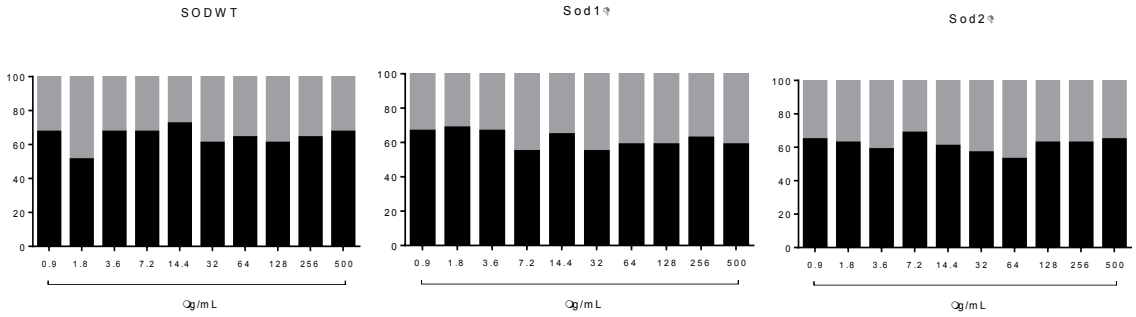


Figure 5. Ferric reduction potential of estragol, nerol, dimethyl-octanol and trolox. [Values are mean ± SD (n = 3, duplicated data). *p <0.05 vs Trolox (ANOVA followed by *t*-Student post-hoc Neuman-Keuls test).



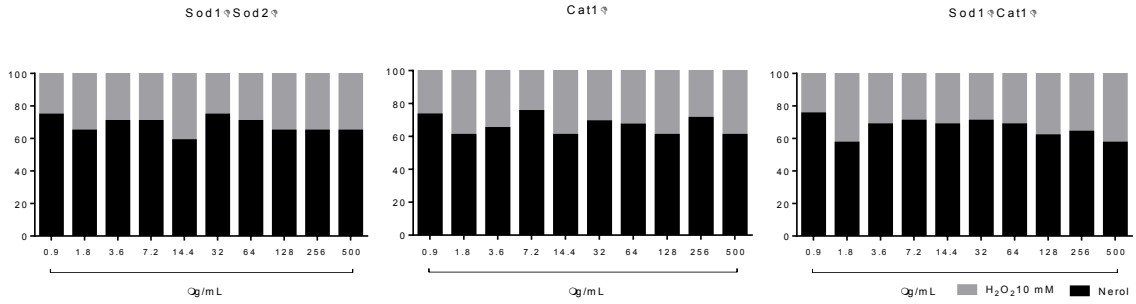


Figure 6. Modulatory effect of nerol in oxidative damage induced by hydrogen peroxide.

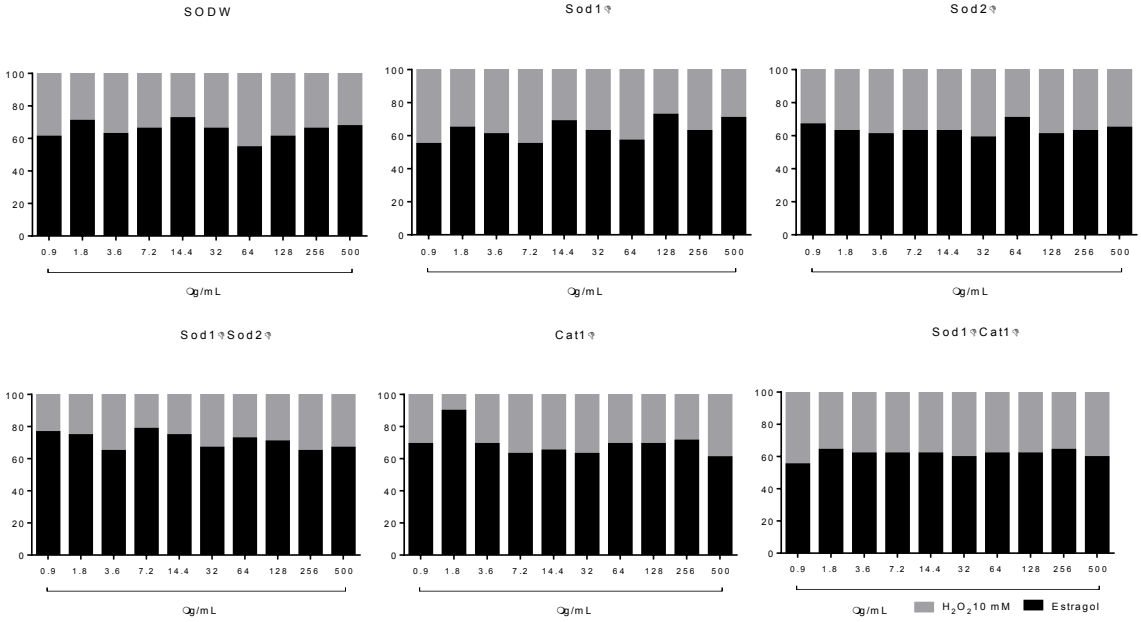
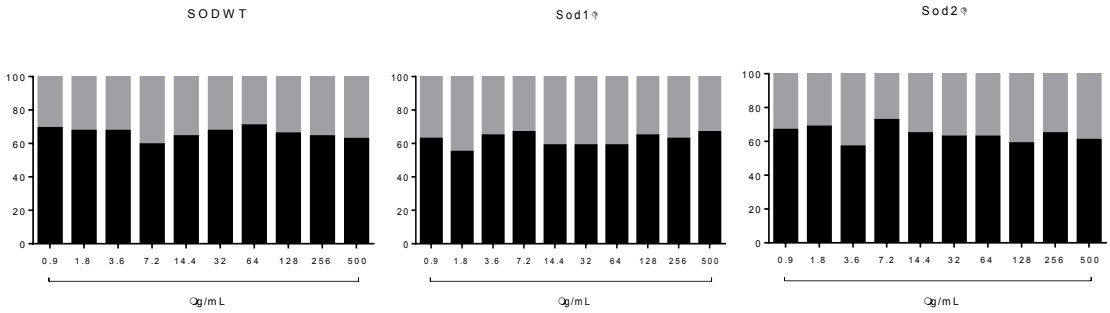


Figure 7. Modulatory effect of estragol in oxidative damage induced by hydrogen peroxide.



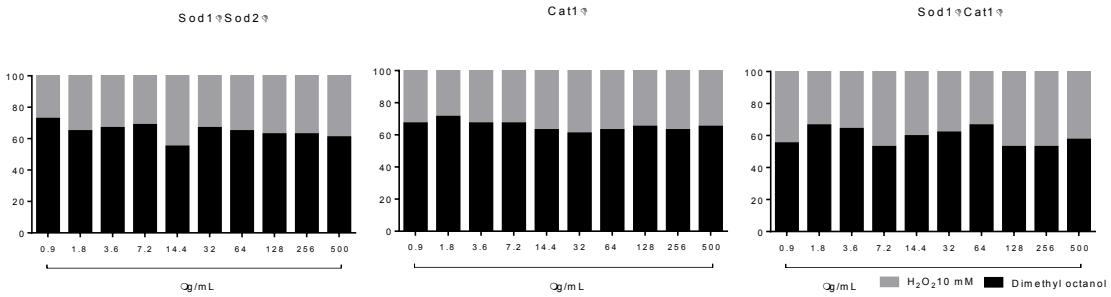


Figure 8. Modulatory effect of dimethyl-octanol in oxidative damage induced by hydrogen peroxide.

Table 1. *S. cerevisiae* strains used in this study.

Description	Genotype	Source
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	
EG110 (Sod2Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	

Table 2. Evaluation of oxidative damage by nerol in proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Treatments	**Strains**					
	SODWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1ΔSod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
Saline 0.9%	0.75 ± 0.47	1.75 ± 0.70	0.50 ± 0.28	2.75 ± 1.59	0.50 ± 0.37	1.25 ± 0.50
DMSO 0.05%	0.75 ± 0.47	0.75 ± 0.47	0.9 ± 0.28	0.8 ± 0.32	1.1 ± 0.54	0.5 ± 0.15
H_2O_2 10 mM	30.75 ± 5.0**	25.50 ± 4.2**	25.25 ± 6.18**	27.00 ± 5.09**	24.25 ± 4.03**	22.25 ± 4.57**
0.9 µg/mL	1.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	1.00 ± 0.28	2.00 ± 1.41	1.50 ± 0.70	2.50 ± 2.10
1.8 µg/mL	1.50 ± 0.70	2.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70
3.6 mg/mL	1.00 ± 0.28	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	4.00 ± 1.2	3.00 ± 1.41
7.2 µg/mL	2.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41
14.4 µg/mL	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	3.00 ± 0.54	3.00 ± 0.54	3.00 ± 1.41
32 µg/mL	2.00 ± 1.41	3.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	4.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70
64 µg/mL	2.00 ± 1.41	1.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41
128 µg/mL	1.00 ± 0.28	2.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70
256 mg/mL	2.00 ± 0.24	2.50 ± 0.70	2.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41

500 mg/mL	1.00 ± 0.28	2.00 ± 0.24	2.00 ± 0.24	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70

Values are mean ± SD. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc test. **p <0.0001 compared to saline solution.

Table 3. Evaluation of oxidative damage by estragol in proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Treatments	**Strains**					
	SODWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1ΔSod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
Saline 0.9%	0.75 ± 0.47	1.75 ± 0.70	0.50 ± 0.28	2.75 ± 1.59	0.50 ± 0.37	1.25 ± 0.50
DMSO 0.05%	0.75 ± 0.47	0.75 ± 0.47	0.9 ± 0.28	0.8 ± 0.32	1.1 ± 0.54	0.5 ± 0.15
H_2O_2 10 mM	30.75 ± 5.0**	25.50 ± 4.2**	25.25 ± 6.18**	27.00 ± 5.09**	24.25 ± 4.03**	22.25 ± 4.57**
0.9 μg/mL	2.00 ± 0.54	2.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	3.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	3.50 ± 0.70
1.8 μg/mL	1.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	4.50 ± 0.70	4.00 ± 2.82
3.6 mg/mL	1.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	2.00 ± 0.54	2.50 ± 0.70	4.00 ± 1.41	4.00 ± 1.41
7.2 μg/mL	2.00 ± 1.41	2.00 ± 1.41	2.00 ± 0.54	2.50 ± 0.70	1.50 ± 2.12	3.50 ± 0.70
14.4 μg/mL	2.50 ± 0.70	2.00 ± 0.54	3.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	4.50 ± 2.12	5.00 ± 0.0
32 μg/mL	2.00 ± 0.54	2.50 ± 0.70	2.00 ± 0.54	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	4.50 ± 0.70
64 μg/mL	2.00 ± 0.54	2.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	7.00 ± 1.41*	3.00 ± 1.41
128 μg/mL	1.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	4.50 ± 2.12
256 mg/mL	3.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 2.12	3.00 ± 1.41	3.00 ± 2.82
500 mg/mL	1.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	4.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70

Values are mean ± SD. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc test. *p <0.05 and **p <0.0001 compared to saline solution.

Table 2. Evaluation of oxidative damage by dimethyl-octanol in proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Treatments	**Strains**					
	SODWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1ΔSod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
Saline 0.9%	0.75 ± 0.47	1.75 ± 0.70	0.50 ± 0.28	2.75 ± 1.59	0.50 ± 0.37	1.25 ± 0.50
DMSO 0.05%	0.75 ± 0.47	0.75 ± 0.47	0.9 ± 0.28	0.8 ± 0.32	1.1 ± 0.54	0.5 ± 0.15
H_2O_2 10 mM	30.75 ± 5.0**	25.50 ± 4.2**	25.25 ± 6.18**	27.00 ± 5.09**	24.25 ± 4.03**	22.25 ± 4.57**
0.9 μg/mL	1.50 ± 0.70	0.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70
1.8 μg/mL	1.50 ± 0.70	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	1.00 ± 1.41	3.50 ± 0.70	3.00 ± 0.00
3.6 mg/mL	2.00 ± 0.00	1.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	2.00 ± 1.41	2.50 ± 0.70	4.00 ± 1.41
7.2 μg/mL	2.50 ± 0.70	1.00 ± 0.00	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	4.00 ± 0.00	3.00 ± 1.41
14.4 μg/mL	2.00 ± 1.41	1.00 ± 1.41	1.50 ± 0.70	2.00 ± 0.00	3.50 ± 0.70	2.00 ± 2.82
32 μg/mL	2.00 ± 0.00	2.50 ± 0.70	3.00 ± 0.00	2.50 ± 0.70	3.50 ± 2.12	3.50 ± 0.70
64 μg/mL	1.50 ± 0.70	3.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	3.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41

128 μg/mL	1.00 ± 1.41	1.50 ± 0.70	1.50 ± 0.70	3.50 ± 0.70	3.50 ± 2.12	4.00 ± 1.41
256 mg/mL	0.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	1.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	2.50 ± 2.12	3.00 ± 0.00
500 mg/mL	2.50 ± 0.70	3.00 ± 0.00	2.50 ± 0.70	2.50 ± 0.70	3.00 ± 1.41	3.50 ± 0.70

Values are mean ± SD. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc test. **p <0.0001 compared to saline solution.

ANEXO D: Artigo publicado na revista Chemico-Biological Interactions – Qualis A2 - Biotecnologia

Chemico-Biological Interactions 244 (2016) 129–139

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

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

Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite

Ana C. Mafud [b, 1], Marcos P.N. Silva [a, 1], Daniela C. Monteiro [a], Maria F. Oliveira [a], João G. Resende [a], Mayara L. Coelho [c], Damião P. de Sousa [d], Ronaldo Z. Mendonça [e], Pedro L.S. Pinto [f], Rivelilson M. Freitas [c], Yvonne P. Mascarenhas [b], Josué de Moraes [a, *]

[a] Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, Brazil
[b] Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil
[c] Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil
[d] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil
[e] Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil
[f] Núcleo de Enteroparasitas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 September 2015
Received in revised form
21 November 2015
Accepted 10 December 2015
Available online 15 December 2015

Keywords:
Terpene
Schistosoma
Schistosomiasis
3,7-Dimethyl-1-octanol
Dihydrocitronellol
Antischistosomal compound

ABSTRACT

The use of natural products has a long tradition in medicine, and they have proven to be an important source of lead compounds in the development of new drugs. Among the natural compounds, terpenoids present broad-spectrum activity against infective agents such as viruses, bacteria, fungi, protozoan and helminth parasites. In this study, we report a biological screening of 38 chemically characterized terpenes from different classes, which have a hydroxyl group connected by hydrophobic chain or an acceptor site, against the blood fluke *Schistosoma mansoni*, the parasite responsible for schistosomiasis mansoni. *In vitro* bioassays revealed that 3,7-dimethyl-1-octanol (dihydrocitronellol) (**10**) was the most active terpene (IC_{50} values of 13–52 μM) and, thus, we investigated its antischistosomal activity in greater detail. Confocal laser scanning microscopy revealed that compound **10** induced severe tegumental damage in adult schistosomes and a correlation between viability and tegumental changes was observed. Furthermore, we compared all the inactive compounds with dihydrocitronellol structurally by using shape and charge modeling, lipophilicity (miLogP) and other molecular properties (e.g. molecular polar surface area, molecular electrostatic potential) were also calculated. From the 38 terpenes studied, compound **10** is the one with the greatest flexibility, with a sufficient apolar region by which it may interact in a hydrophobic active site. In conclusion, the integration of biological and chemical analysis indicates the potential of the terpene dihydrocitronellol as an antiparasitic agent.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis is a widespread parasitic disease that affects mostly poor and marginal populations in Africa, Asia, and Latin America, and that has been neglected by the pharmaceutical industry and governments [1]. Based on the latest estimates, approximately 200 million people are currently infected worldwide, with about 800 million people at risk of infection [2]. This disease is also known as bilharzia, and it is caused by trematode flukes of the genus *Schistosoma*. Three main species of schistosomes infect humans: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, and *Schistosoma japonicum*. The transmission cycle requires the contamination of surface water by excreta, specific freshwater snails as intermediate hosts, and human contact with the water [1,3].

The control of schistosomiasis is based on improved sanitation and health education, snail control and, above all else, drug

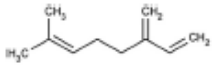
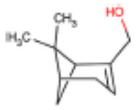
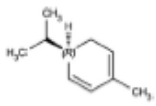
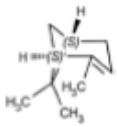
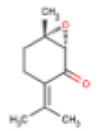
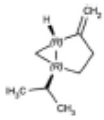
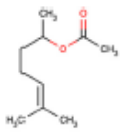
Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; IC_{50}, inhibitory concentration 50%; LD_{50} lethal dose 50%; MEP, molecular electrostatic potential; miLogP, method for LogP prediction developed at Molinspiration software; MW, molecular weight; PAIN, Pan Assay Interference compound; PSA, molecular polar surface area; PZQ, praziquantel; RPMI, Roswell Park Memorial Institute medium.

* Corresponding author. Centro de Pós-Graduação e Pesquisa (CEPPE), Universidade Guarulhos, Praça Teresa Cristina, 229, Centro, Guarulhos 07023-070, SP, Brazil.
E-mail addresses: josuem@usp.br, moraesnpdm@gmail.com (J. de Moraes).

[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.003
0009-2797/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Table 1 (*continued*)

	Molecular structure 2D	Structural and molecular parameters	
18	 2,6-Lutidine	miLogP	0.80
		Natoms	8
		MW	107.16
		Surf. area (0.00)	147.5 Å^2 (ds = 6.9 Å)
		Average value	−0.0027 ± 0.0305
		Polar area (PSA)	11.5 Å^2 (apolar = 282.8 Å^2)
		Average value	−3.1611 ± 0.2478
19	 β-Myrcene	miLogP	3.99
		natoms	10
		MW	136.24
		Surf. area (0.00)	104.2 Å^2 (ds = 5.8 Å)
		Average value	−0.0001 ± 0.0058
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 343.0 Å^2)
		Average value	−2.3520 ± 0.2563
20	 Myrtenol	miLogP	2.301
		Natoms	11.0
		MW	152.237
		MEP Surf. area (0.00)	205.2 Å^2 (ds = 8.1 Å)
		Average value	−0.0021 ± 0.0217
		Polar area (PSA)	71.6 Å^2 (apolar = 432.6 Å^2)
		Average value	−3.6407 ± 0.2843
21	 α-Phellandrene	miLogP	3.79
		natoms	10
		MW	136.24
		Surf. area (0.00)	197.0 Å^2 (ds = 7.9 Å)
		Average value	−0.0026 ± 0.0120
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 357.2 Å^2)
		Average value	−5.1542 ± 0.4306
22	 α- pinene	miLogP	3.54
		natoms	10
		MW	136.24
		Surf. area (0.00)	186.4 Å^2 (ds = 7.7 Å)
		Average value	−0.0027 ± 0.0090
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 345.1 Å^2)
		Average value	−5.2388 ± 0.3606
23	 Rotundifolone	miLogP	1.765
		Natoms	12.0
		MW	166.22
		MEP Surf. area (0.00)	216.4 Å^2 (ds = 8.3 Å)
		Average value	0.0004 ± 0.0376
		Polar area (PSA)	90.7 Å^2 (apolar = 429.7 Å^2)
		Average value	−3.4348 ± 0.2064
24	 Sabinene	miLogP	3.10
		Natoms	10
		MW	136.24
		Surf. area (0.00)	196.2 Å^2 (ds = 7.9 Å)
		Average value	−0.0016 ± 0.0088
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 344.5 Å^2)
		Average value	−5.1537 ± 0.4224
25	 Sulcatyl acetate	miLogP	3.202
		Natoms	12.0
		MW	170.252
		MEP Surf. area (0.00)	253.4 Å^2 (ds = 9.0 Å)
		Average value	−0.0037 ± 0.0204
		Polar area (PSA)	51.1 Å^2 (apolar = 528.4 Å^2)
		Average value	−3.8614 ± 0.3195

(*continued on next page*)

by subcutaneous injection with approximately 150 *S. mansoni* cercariae each, harvested from infected intermediate host snails *Biomphalaria glabrata* [13]. Animals were maintained with free access to rodent diet and water. For *in vitro* studies, schistosomes

3.1. Compounds

A set with 38 terpenes, which have a hydroxyl group connected

Table 1 (*continued*)

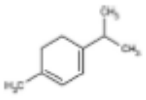
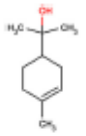
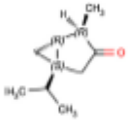
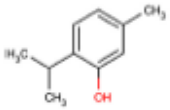
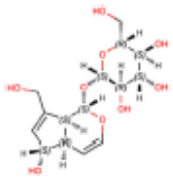
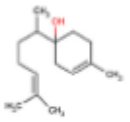
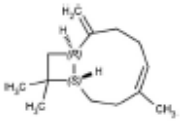
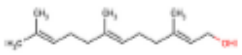
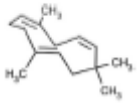
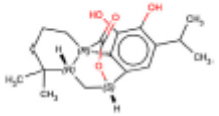
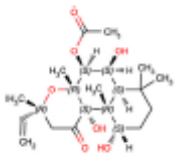
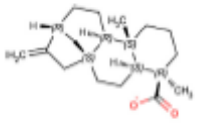
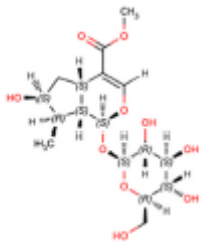
	Molecular structure 2D	Structural and molecular parameters	
26		miLogP	3.36
		natoms	10
		MW	136.24
		Surf. area (0.00)	201.1 Å^2 (ds = 8.0 Å)
		Average value	−0.0023 ± 0.0121
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 356.4 Å^2)
		Average value	−5.0965 ± 0.4597
	α-Terpinene		
27		miLogP	2.6
		natoms	11.0
		MW	154.253
		MEP Surf. area (0.00)	219.5 Å^2 (ds = 8.4 Å)
		Average value	−0.0019 ± 0.0201
		Polar area (PSA)	52.8 Å^2 (apolar = 479.8 Å^2)
		Average value	−3.8799 ± 0.2399
	α-Terpineol		
28		miLogP	2.16
		Natoms	11
		MW	152.24
		Surf. area (0.00)	208.7 Å^2 (ds = 8.1 Å)
		Average value	0.0063 ± 0.0391
		Polar area (PSA)	45.6 Å^2 (apolar = 307.5 Å^2)
		Average value	−4.9361 ± 0.4495
	(−)-α-Thujone		
29		miLogP	3.342
		Natoms	11.0
		MW	150.221
		MEP Surf. area (0.00)	214.7 Å^2 (ds = 8.3 Å)
		Average value	−0.0011 ± 0.0190
		Polar area (PSA)	67.6 Å^2 (apolar = 450.4 Å^2)
		Average value	−3.2943 ± 0.2183
	Thymol		
30		miLogP	−2.25
		Natoms	24
		MW	346.33
		Surf. area (0.00)	362.0 Å^2 (ds = 10.7 Å)
		Average value	0.0005 ± 0.0413
		Polar area (PSA)	292.3 Å^2 (apolar = 273.4 Å^2)
		Average value	−2.6477 ± 0.5969
	Aucubin		
31		miLogP	4.679
		Natoms	16.0
		MW	222.372
		MEP Surf. area (0.00)	301.6 Å^2 (ds = 9.8 Å)
		Average value	−0.0026 ± 0.0169
		Polar area (PSA)	51.5 Å^2 (apolar = 618.0 Å^2)
		Average value	−5.2572 ± 0.3561
	Beta-Bisabolol		
32		miLogP	5.17
		TPSA	0.00
		natoms	15
		MW	204.36
		Surf. area (0.00)	117.1 Å^2 (ds = 6.1 Å)
		Average value	0.0011 ± 0.0082
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 255.7 Å^2)
		Average value	−3.8851 ± 0.4037
	β-Caryophyllene		
33		miLogP	5.047
		Natoms	16.0
		MW	222.372
		MEP Surf. area (0.00)	326.8 Å^2 (ds = 10.2 Å)
		Average value	−0.0024 ± 0.0194
		Polar area (PSA)	74.9 Å^2 (apolar = 642.9 Å^2)
		Average value	−5.0676 ± 0.5886
	Farnesol		

Table 1 (continued)

	Molecular structure 2D	Structural and molecular parameters	
34		miLogP	5.30
		natoms	15
		MW	204.36
		Surf. area (0.00)	251.1 Å^2 (ds = 8.9 Å)
		Average value	−0.0026 ± 0.0101
		Polar area (PSA)	0.0 Å^2 (apolar = 408.1 Å^2)
		Average value	−7.1338 ± 0.5534
	α-Humulene		
35		miLogP	4.61
		Natoms	24
		MW	330.42
		Surf. area (0.00)	349.6 Å^2 (ds = 10.5 Å)
		Average value	0.0079 ± 0.1298
		Polar area (PSA)	65.9 Å^2 (apolar = 283.6 Å^2)
		Average value	−8.7695 ± 1.4221
	Carnosol		
36		miLogP	1.71
		Natoms	29
		MW	410.51
		Surf. area (0.00)	403.9 Å^2 (ds = 11.3 Å)
		Average value	−0.0285 ± 0.1209
		Polar area (PSA)	91.9 Å^2 (apolar = 312.0 Å^2)
		Average value	−9.1633 ± 1.1826
	Forskolin		
37		miLogP	1.95
		Natoms	22
		MW	301.45
		Surf. area (0.00)	319.9 Å^2 (ds = 10.1 Å)
		Average value	−0.2185 ± 0.1231
		Polar area (PSA)	60.2 Å^2 (apolar = 421.8 Å^2)
		Average value	−7.9712 ± 0.8589
	Kaurenoic acid		
38		miLogP	−1.25
		Natoms	27
		MW	390.38
		Surf. area (0.00)	409.8 Å^2 (ds = 11.4 Å)
		Average value	−0.0003 ± 0.0383
		Polar area (PSA)	270.2 Å^2 (apolar = 366.5 Å^2)
		Average value	−3.6278 ± 0.7711
	Loganin		

Molecular polar surface area (PSA) and miLogP were calculated using the Molinspiration software. Molecular Weight (MW). Dot size (ds).

by hydrophobic chain or an acceptor site (Table 1), was screened regarding to their safety (e.g. absence of acute toxicity in the mammalian cells) and ease of acquisition. In addition, none of them can be considered a Pan Assay Interference Compound (PAIN) as they have none promiscuous activity [22]. Furthermore, all the compounds in this set are well characterized and studied and have wide applications in alternative medicine, nutritional and pharmaceutical industry.

3.2. In vitro studies

The *in vitro* antischistosomal effects of all terpenes against adult *S. mansoni* were evaluated at concentration of 100 μM. The effect of the compounds was assessed with emphasis on changes in worm motor activity, viability, and alteration in the tegument. Of the 38 compounds tested, only compound **10** had schistosomicidal activity after the maximal screen time of 120 h at 100 μM. Compound **10**, also known as dihydrocitronellol, is a monoterpene alcohol present in oil of roses [23,24]. It is an aromatic ingredient used in many fragrance compounds and it may be found in cosmetic and non-cosmetic products. For example, to date, dihydrocitronellol is used in decorative cosmetics, toilet soaps, shampoos, and other toiletries, as well as in detergents and household cleaners [24]. It was included by the Council of Europe in the list of substances granted B status, and this compound was approved by the Food and Drug Administration as a flavor. Moreover, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives concluded that the substance does not present a safety concern. Based on the data reviewed, the acute oral LD_{50} of dihydrocitronellol was evaluated to be greater than 5000 mg/kg body weight, indicating that this compound is in

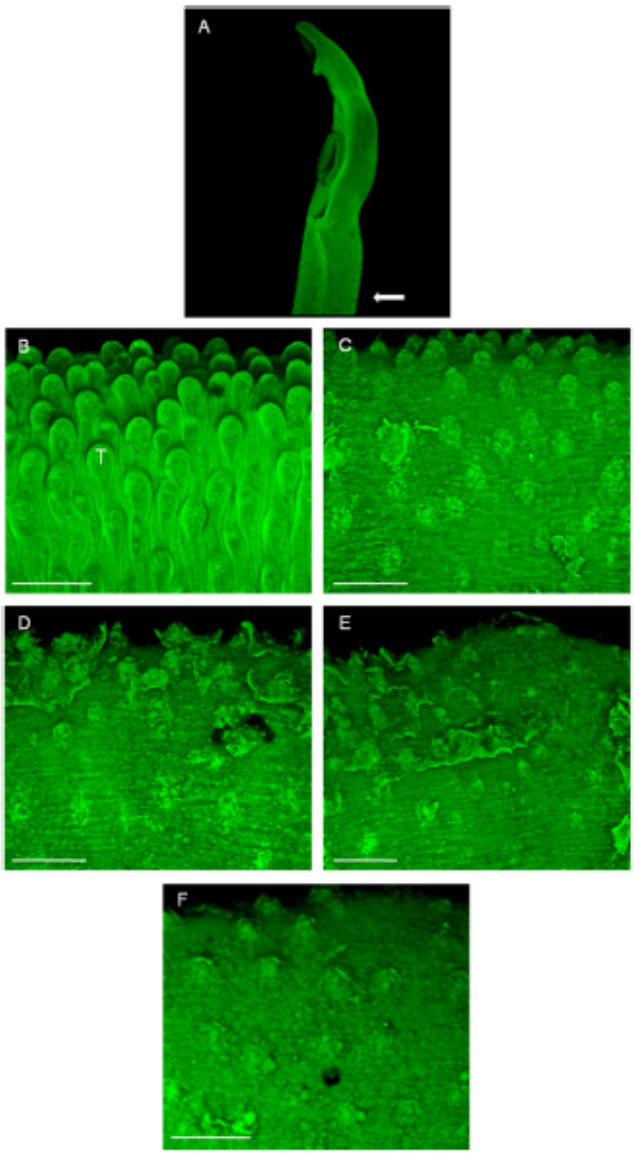


Fig. 2. Microscopy investigation of *Schistosoma mansoni* male worm after *in vitro* incubation with dihydrocitronellol. In these experiments, pairs of adult worms were incubated in 24-well culture plates containing RPMI 1640 medium and treated with different concentrations of dihydrocitronellol. A: General view of the anterior worm region showing the location where tegument was analyzed (arrow) B: Negative control (RPMI 1640 medium); dorsal tegumental surface showing tubercles (T). C: worm treated with 20 μM dihydrocitronellol. D: worm treated with 40 μM dihydrocitronellol. E: worm treated with 80 μM dihydrocitronellol. E: Positive control (PZQ 3 μM). The images of green autofluorescent parasites were obtained using confocal laser scanning microscopy. Scale bars = 50 μm.

this study, we evaluated the antischistosomal potential of 38 terpenes. Biological screening evaluation resulted in the identification of one terpene, 3,7-dimethyl-1-octanol (dihydrocitronellol). Similar to praziquantel, but at different concentrations, dihydrocitronellol was able to kill parasites, and confocal laser scanning microscopic analysis revealed tegumental damage to *S. mansoni* in a concentration-dependent manner. Considering that dihydrocitronellol is safe, with low toxicity and high tolerance in mammals,

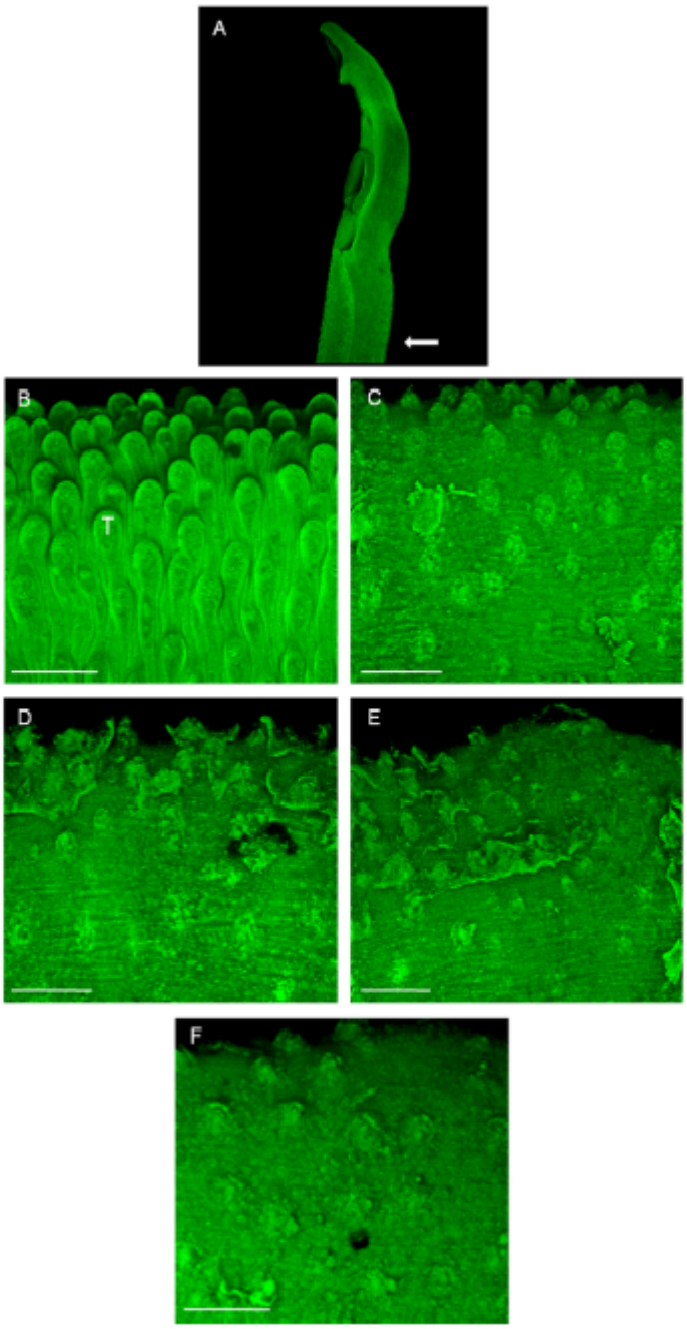


Fig. 2. Microscopy investigation of *Schistosoma mansoni* male worm after *in vitro* incubation with dihydrocitronellol. In these experiments, pairs of adult worms were incubated in 24-well culture plates containing RPMI 1640 medium and treated with different concentrations of dihydrocitronellol. A: General view of the anterior worm region showing the location where tegument was analyzed (arrow) B: Negative control (RPMI 1640 medium); dorsal tegumental surface showing tubercles (T). C: worm treated with 20 μM dihydrocitronellol. D: worm treated with 40 μM dihydrocitronellol. E: worm treated with 80 μM dihydrocitronellol. F: Positive control (PZQ 3 μM). The images of green autofluorescent parasites were obtained using confocal laser scanning microscopy. Scale bars = 50 μm.

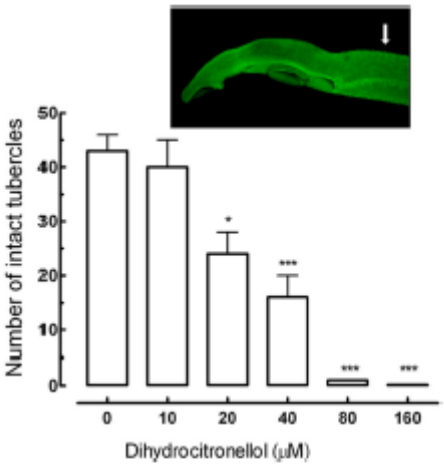


Fig. 3. Quantitative analysis of morphological alterations on the tegument of *S. mansoni* after exposure to dihydrocitronellol. The quantification of the number of tubercles was performed using three-dimensional images obtained from laser scanning confocal microscopy. Numbers of intact tubercles are indicated, and these numbers were measured in a 20,000 μm^2 of area in a dorsal region of the adult male worm (arrow), and calculated with the Zeiss LSM Image Browser software. A minimum of three tegument areas of each parasite were assessed. Values are means ± SD (bars) of 10 male adult worms. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 compared with untreated groups.

the results described here support the potential of dihydrocitronellol as a new lead compound. However, further studies, mainly *in vivo* assays, are necessary to fully determine the potential of dihydrocitronellol to treat schistosomiasis and to elucidate its mode of action.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Silvia G. Chiodelli, Anderson B. Gonçalves, and Yone C. Xavier for maintenance of the *S. mansoni* life cycle at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, SP, Brazil). We are indebted to Dr. Henrique K. Roffato and (Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil) for expert assistance with confocal microscopy (FAPESP, Grant 00/11624-5). ACM is grateful to FAPESP (Grant 2014/02282-6).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.003

References

[1] D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis, Lancet 383 (2014) 2253–2264, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
[2] P. Steinmann, J. Keiser, R. Bos, M. Tanner, J. Utzinger, Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk, Lancet Infect. Dis. 6 (2006) 411–425, http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7.
[3] B. Gryseels, Schistosomiasis, Infect. Dis. Clin. North Am. 26 (2012) 383–397, http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.004.
[4] P.G. Fallon, M.J. Doenhoff, Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific, Am. J. Trop. Med. Hyg. 51 (1994) 83–88.
[5] M. Ismail, A. Metwally, A. Farghaly, J. Bruce, L.F. Tao, J.L. Bennett, Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel, Am. J. Trop. Med. Hyg. 55 (1996) 214–218.
[6] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, J. Nat. Prod. 75 (2012) 311–335, http://dx.doi.org/10.1021/np200906s.
[7] O. Kayser, A.F. Kiderlen, S.L. Croft, Natural products as antiparasitic drugs, Parasitol. Res. 90 (2003) S55–S62, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-002-0768-3.
[8] T.J. Maimone, P.S. Baran, Modern synthesis efforts toward biologically active terpenes, Nat. Chem. Biol. 3 (2007) 396–407, http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.1.
[9] J. de Moraes, Natural products with antischistosomal activity, Future Med. Chem. 7 (2015) 801–820, http://dx.doi.org/10.4155/fmc.15.23.
[10] D. Schuster, G. Wolber, Identification of bioactive natural products by pharmacophore-based virtual screening, Curr. Pharm. Des. 16 (2010) 1666–1681, http://dx.doi.org/10.2174/138161210791164072.
[11] A.D. Aragon, R.A. Imani, V.R. Blackburn, P.M. Cupit, S.D. Melman, T. Goronga, T. Webb, E.S. Loker, C. Cunningham, Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel, Mol. Biochem. Parasitol. 164 (2009) 57–65, http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.007.
[12] D. Cioli, L. Pica-Mattoccia, A. Basso, A. Guidi, Schistosomiasis control: praziquantel forever? Mol. Biochem. Parasitol. 195 (2014) 23–29, http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.002.
[13] J. Moraes, Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens, in: A.J. Rodriguez-Morales (Ed.), Current Topics in Tropical Medicine, InTech, Rijeka, 2012, pp. 333–358, http://dx.doi.org/10.5772/27740.
[14] S.R. Smithers, R.J. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms, Parasitology 55 (1965) 695–700.
[15] J. de Moraes, R.N. de Oliveira, J.P. Costa, A.L. Junior, D.P. de Sousa, R.M. Freitas, S.M. Allegretti, P.L. Pinto, Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni, PLoS Negl. Trop. Dis. 8 (2014) e2617, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002617.
[16] A.A. Carvalho, A.C. Mafud, P.L. Pinto, Y.P. Mascarenhas, J. de Moraes, Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel, Int. J. Antimicrob. Agents 44 (2014) 372–374, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.018.
[17] J. de Moraes, B.S. Dario, R.A. Couto, P.L. Pinto, A.M. da Costa Ferreira, Antischistosomal activity of oxindolimine-metal complexes, Antimicrob. Agents Chemother. 59 (2015) 6648–6652, http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01371-15.
[18] M.P. Silva, G.L. Oliveira, R.B. de Carvalho, D.P. de Sousa, R.M. Freitas, P.L. Pinto, J. de Moraes, Antischistosomal activity of the terpene nerolidol, Molecules 19 (2014) 3793–3803, http://dx.doi.org/10.3390/molecules19033793.
[19] J. Moraes, M.P. Silva, F.P. Ohlweiler, T. Kawano, Schistosoma mansoni and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo, State, Brazil, Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 51 (2009) 77–82, http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652009000200004.
[20] J. de Moraes, J. Keiser, K. Ingram, C. Nascimento, L.F. Yamaguchi, C.R. Bittencourt, M.P. Bemquerer, J.R. Leite, M.J. Kato, E. Nakano, *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms, Curr. Med. Chem. 20 (2013) 301–309, http://dx.doi.org/10.2174/092986731132000010.
[21] J. de Moraes, C. Nascimento, L.M. Miura, J.R. Leite, E. Nakano, Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*, Chem. Biodivers. 8 (2011) 548–558, http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201000163.
[22] J. Baell, M.A. Walters, Chemistry: chemical con artists foil drug discovery, Nature 513 (2014) 481–483, http://dx.doi.org/10.1038/513481a.
[23] R.M.I. Hanif, P. Qineng, G. Zhan, Penetration enhancing effect of tetrahydrogeraniol on the percutaneous absorption of 5-fluorouracil from gels in excised rat skin, J. Control Release 55 (1998) 297–302, http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00062-5.
[24] A.L. Lapczynski, S.P. Bhatia, C.S. Letizia, A.M. Api, Fragrance material review on 3,7-dimethyl-1-octanol, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) S139–S141, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.023.
[25] P. Rifm expert, D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, P. Calow, H. Greim, J.M. Hanifin, A.E. Rogers, J.H. Saurat, I.G. Sipes, H. Tagami, A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) S1–S71, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.085.
[26] J.d. Moraes, A.A. Almeida, M.R. Brito, T.H. Marques, T.C. Lima, D.P. Sousa, E. Nakano, R.Z. Mendonça, R.M. Freitas, Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*, Planta Med. 79 (2013) 253–258, http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328173.
[27] J. de Moraes, A.A. Carvalho, E. Nakano, A.A. de Almeida, T.H. Marques, L.N. Andrade, R.M. de Freitas, D.P. de Sousa, Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*, Parasitol. Res. 112 (2013) 603–610, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3172-7.
[28] L.M. Veras, M.A. Guimarães, Y.D. Campelo, M.M. Vieira, C. Nascimento,

D.F. Lima, L. Vasconcelos, E. Nakano, S.S. Kuckelhaus, M.C. Batista, J.R. Leite, J. Moraes, Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*, Curr. Med. Chem. 19 (2012) 2051–2058, http://dx.doi.org/10.2174/092986712800167347.

[29] J. Moraes, C. Nascimento, P.O. Lopes, E. Nakano, L.F. Yamaguchi, M.J. Kato, T. Kawano, Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of piplartine, Exp. Parasitol. 127 (2011) 357–364, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.021.

[30] A.P. Silva, M.P. Silva, C.G. Oliveira, D.C. Monteiro, P.L. Pinto, R.Z. Mendonça, J.S. Costa Junior, R.M. Freitas, J. de Moraes, Garcinielliptone FC: antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells, Toxicol. Vitro 29 (2015) 681–687, http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.014.

[31] R. EL Ridi, M. Aboueldahab, H. Tallima, M. Salah, N. Mahana, S. Fawzi, S.H. Mohamed, O.M. Fahmy, *In vitro* and *in vivo* activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 3383–3389, http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00173-10.

[32] R.N. de Oliveira, V.L. Rehder, A.S. Oliveira, V. de L. Jeraldo, A.X. Linhares, S.M. Allegretti, Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*, Exp. Parasitol. 139 (2014) 63–72, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.010.

[33] J.D. Chan, M. Zarowiecki, J.S. Marchant, Ca^{2+} channels and praziquantel: a view from the free world, Parasitol. Int. 62 (2013) 619–628, http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.12.001.

[34] V. Salvador-Recatalà, R.M. Greenberg, Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers, Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal 1 (2012) 85–93, http://dx.doi.org/10.1002/wmts.19.

[35] C. Ramalhete, L.G. Magalhães, V. Rodrigues, S. Mulhovo, A.A. Da Silva Filho, M.J.U. Ferreira, *In vitro* schistosomicidal activity of balsaminol F and karavilagenin C, Planta Med. 78 (2012) 1912–1917, http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1327832.

ANEXO E: Artigo publicado na revista Microbial Pathogenesis – B1 - Biotecnologia

Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes

Mayara Ladeira Coêlho[a], Josie Haydée Lima Ferreira[b], José Pinto de Siqueira Júnior[c], Glenn W. Kaatz[d], Humberto Medeiros Barreto[b*], Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante[a]

[a]Laboratory of Toxicology Genetic Research, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil;

[b]Laboratory of Research in Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina (PI), Brazil;

[c]Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Paraiba, Brazil;

[d] The John D. Dingell Department of Veteran's Affairs Medical Center and Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, Wayne State University, Detroit, (MI), USA

*Correspondent author: Humberto Medeiros Barreto. Laboratory of Research in Microbiology, Department of Parasitology and Microbiology, Center of Health Sciences, Federal University of Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brazil. *Campus* Petronio Portella, University City, Ininga, Zip Code: 64049-550. Phone: +55 (86) 3215-5865. Email: hmbarreto@ufpi.edu.br

Abstract:

The aim of this study was to investigate the intrinsic antimicrobial activity of three monoterpenes nerol, dimethyl octanol and estragole, against bacteria and yeast strains, as well as, investigate if

these compounds are able to inhibit the NorA efflux pump related to fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the monoterpenes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* strains were determined by micro-dilution assay. MICs of the norfloxacin against a *S. aureus* strain overexpressing the NorA protein were determined in the absence or in the presence of the monoterpenes at subinhibitory concentrations, aiming to verify the ability of this compounds act as efflux pump inhibitors. The monoterpenes were inactive against *S. aureus* however the nerol was active against *E. coli* and *C. albicans*. Addition of the compounds in the growth medium at sub-inhibitory concentrations enhanced the activity of norfloxacin against *S. aureus* SA1199-B. This result shows that bioactives tested, especially the nerol, are able to inhibit *S. aureus* efflux pump NorA indicating a potential use as adjuvants of norfloxacin in the treatment of infections caused by multi-drug resistant *S. aureus* strains.

Keywords*:* Monoterpene; fluoroquinolone; NorA; efflux pump inhibitor, bacterial resistance.

1. Introduction

The prevalence of infectious diseases caused by multi-drug resistant microorganisms has increased dramatically worldwide [1,2] despite of the wide range of available antimicrobial agents. Infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* resistant to cephalosporin of third-generation and fluoroquinolones are commonly acquired in hospitals and communities of all countries of the world [3,4]. Fluoroquinolones have been proposed as a possible alternative to vancomycin therapy against methicillin resistance *S. aureus* (MRSA) infections [5], however resistance to these antibacterial agents has become common and widespread [6,7,8].

Fluorquinolones are able to binding to the complexes formed between DNA and DNA gyrase or topoisomerase IV, inactivating these bacterial enzymes, leading to a rapid inhibition of DNA replication [9] Bacterial resistance to fluoroquinolones occur due to mutation in one or more genes encoding these target enzymes or by expression of multidrug efflux pumps capable of actively removing fluoroquinolones from bacterial cell [10,11,12], as NorA efflux protein overexpressed by SA1199-B strain tested in the present study [13,14].

The knowledge about resistance mediated by efflux pumps has motivated the search for efflux pump inhibitor (EPI) compounds which could recover the efficacy of current antibiotics [15]. In this sense, synthetic or natural products from vegetable origin have been investigated for its ability to act how EPI [16, 17,18,19,20].

Essential oils from plants are rich in bioactive compounds, such as terpenes and terpenoids, which have showed promising results as potential therapeutic agents [21, 22, 23]. Monoterpenes, the main constituents of essential oils [24], have been reported for their antifungal, anti-aflatoxin and antioxidant activities [25]. The aim of the present study was to evaluate if monoterpenes nerol, estragole and dymethil-octanol, are potential intrinsic

antimicrobial agents and/or efflux pump inhibitors of the NorA multi-drug transporter of *S. aureus*.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and drugs

The intrinsic antimicrobial activity of the monoterpenes was tested against Gram-positive (*S. aureus* ATCC 25923, SA1199, SA1199-B and SA10), Gram-negative (*E. coli* ATCC 25922) or yeast (*Candida albicans* NEWP031) strains. The inhibitory effect on NorA activity was performed with *S. aureus* SA1199-B strain which over express the *norA* gene encoding the NorA efflux protein able to pump hydrophilic fluoroquinolones and other drugs such as DNA-intercalating dyes [13]. The strains were maintained on Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Himedia, India) slant at 4 ºC, and prior to assay the cells were grown overnight at 37 ºC in Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India).

Oxygenated monoterpenes (2Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol (nerol), 3,7-dimethyl-octan-1-ol and 1-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzene, norfloxacin and ethdium bromide were obtained from Sigma Chemical Corp., St. Louis. Antibiotics and ethidium bromide were dissolved in sterile water.

2.2. Log P estimation

Estimation of the *Log P* was performed using the MarvinSketch 6.2.2 (Chemaxon), by the Phys method. *Log P* has been calculated for the uncharged molecule due to the typical range of pKa for aromatic hydroxyl is 8.0-10.0.

2.3. Evaluation of the intrinsic antimicrobial activity

Stock solutions of Nerol, 3,7-Dimethyl-1-octanol and Estragole were prepared by dissolving 10000 µg of each monoterpene in 1 mL of dimethyl sulfoxide, thus starting with an initial concentration of 10000 µg/mL. This stock solution was then diluted in sterile distillated water to obtain the test solution (1024 µg/mL). Minimal inhibitory concentrations (MICs) of monoterpenes were determined by micro-dilution assay in BHI broth 10% with bacterial suspensions of 10^5 CFU/mL and monoterpene solutions ranging from 512 to 8 µg/mL. Microtiter plates were incubated at 37 ºC for 24 h, then 20 µL of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) was added to each well to detect bacterial growth by color change from blue to pink. MICs were defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed.

2.4. Evaluation of the NorA efflux pump inhibition

For evaluation of the monoterpenes as modulators of the fluoroquinolone resistance, MICs of the norfloxacin for SA1199-B strain were determined in the presence or in the absence of each compound at sub-inhibitory concentrations (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC). Concentrations of the antibiotics or ethidium bromide (EtBr) ranged from 128 to 0.125 µg/mL. Microtiter plates were incubated at 37 ºC for 24 h and readings were performed with resazurin as previously described.

2.5. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and results were normalized by calculation of geometric average values. Error deviation and standard deviation of the geometric average were revealed. Differences between treatment with antibiotics alone or associated with monoterpenes were examined using one-way analysis of variance (ANOVA). The differences

mentioned above were analyzed by Bonferroni posttest and $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Chemical structures and Log P values of the oxygenated monoterpenes tested are presented in the Table 1. MICs found to every compound against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* strains are presented in the Table 2. Monoterpenes tested did not present activity against all *S. aureus* strains [26]. On the other hand, the nerol showed a weak inhibitory activity (512 μg/mL) against *E. coli* e *C. albicans* strains.

Table 1
Chemical structure and Log P estimation for oxygenated monoterpenes tested.

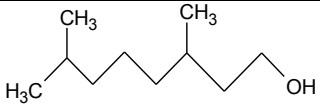
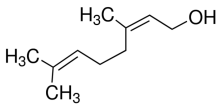
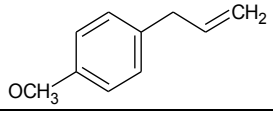
Monoterpene	Structure	Lop P
3,7-Dimethyl-octanol		3,12
(2*Z*)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol (nerol)		3,02
1-allyl-4-methoxybenzene (estragol)		2,89

Table 2
Minimal inhibitory concentrations (MIC) showed by Nerol, 3,7-Dimethyl-1-octanol and Estragole against *S. aureus* strains (geometrical means of three simultaneous tests).

	MIC (μg/mL)		
CEPAS	Nerol	Dimethyl octanol	Estragole
S. aureus ATCC 25923	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA1199	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA1199-B	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
S. aureus SA10	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
E. coli ATCC 25923	512	2048	2048
C. albicans NEWP031	512	2048	2048

Addition of oxygenated monoterpenes to the growth medium at sub-inhibitory concentrations caused a decrease in the MIC for norfloxacin against SA1199-B (Figures 1 to 3). The nerol and 3,7-dimethyl-octan-1-ol enhanced the antibiotic activity of norfloxacin against SA1199-B in a concentration-dependent manner. On the other hand, a modulatory effect was also verified when antibiotics were replaced by ethidium bromide, a well-known substrate of NorA protein (Figure 4).

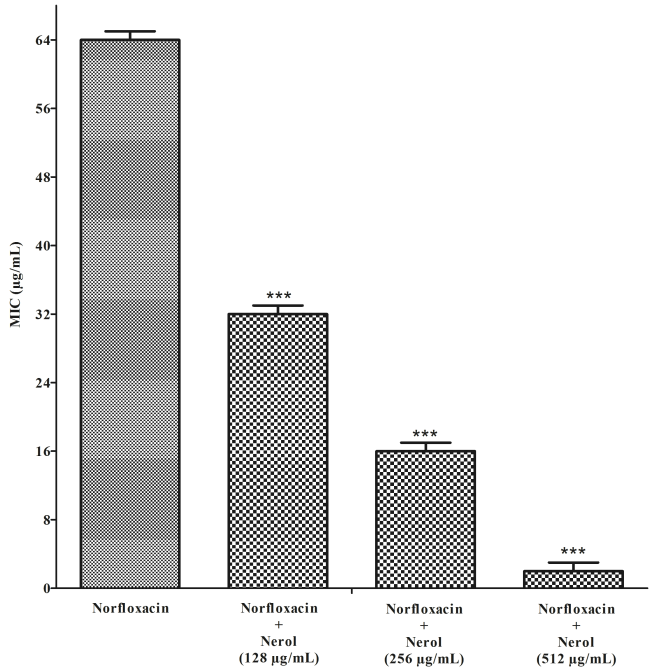


Figure 2 - MIC of antibiotics norfloxacin (NOR) in absence and presence of nerol against SA1199-B. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values (p <0.001).

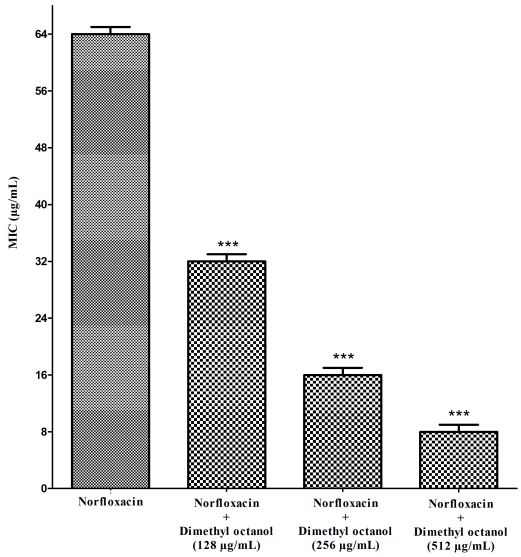


Figure 3 - MIC of antibiotics norfloxacin (NOR) in absence and presence of 3,7-Dimethyl-1-octanol against SA1199-B. (***) Statistically significant values (p <0.001).

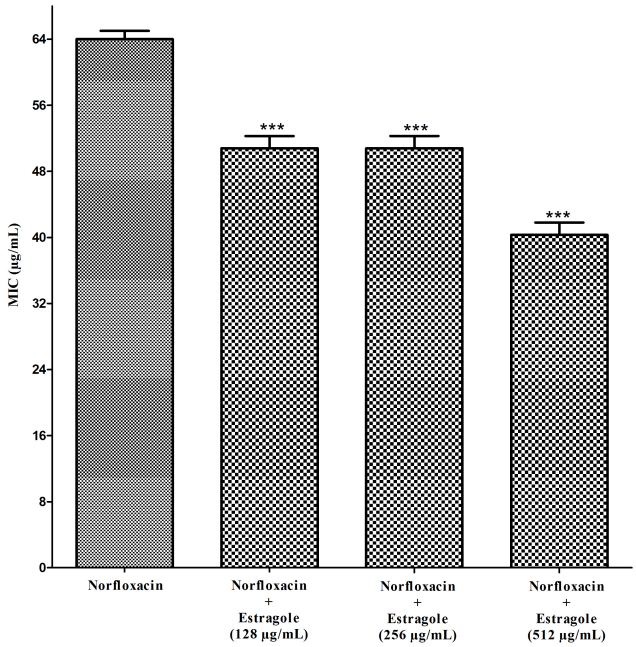


Figure 4 - MIC of antibiotics norfloxacin (NOR) in absence and presence of Estragole against SA1199-B. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values ($p < 0.001$).

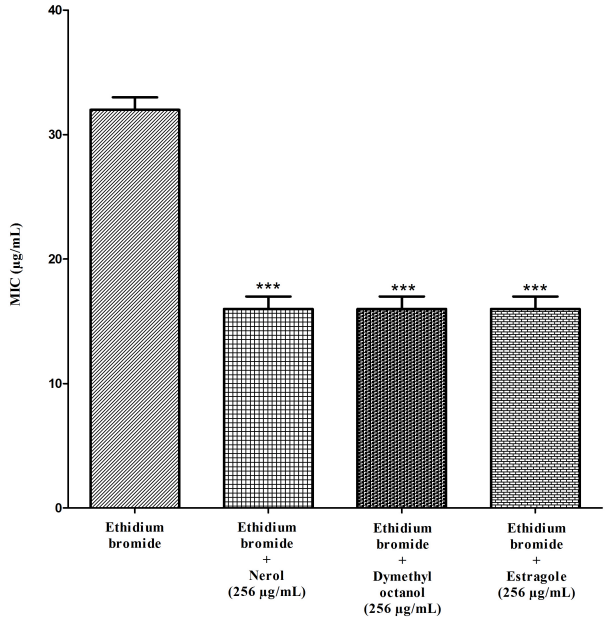


Figure 5 - MIC of Ethidium bromide in absence and presence of Nerol, Dimethyl-octanol and Estragole against SA1199-B. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values ($p < 0.001$).

4. Discussion

Essential oils have been proposed as a natural source of compounds with antibacterial activity against multi-drug resistant bacteria, as well as, a natural source of compounds able to inhibit bacterial resistance mechanisms [27,28,29]. In this work we investigate the intrinsic antibacterial activity of three oxygenated monoterpenes and their potential as EPI of the NorA efflux pump which is related with resistance to hydrophobic fluoroquinolones in *S. aureus* SA1199-B.

In respect to intrinsic antimicrobial activity, only nerol was active against *E. coli* ATCC 25923 and *Candida albicans* NEWP031. Similar results have been reported by previous studies which showed the effectiveness of nerol as antifungal compound against *Aspergillus* strains [30]. Also was verified that essential oils from *Ocimum basilicum* Linn., *Thymus algeriensis* and *Citrus aurantium* L., which contain nerol in its composition were actives against bacteria [31,32,33,34,35]. Besides, its trans isomer, geraniol, displayed strong activity against *C. albicans, E. coli* and plant pathogenic bacteria*, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Corynebacterium fascians, and Pseudomonas solanacearum* [36,37,38]. It was also reported that the nerol is more effective as an antibacterial than as an antifungal agent [39,40].

Although oxygenated monoterpenes have not presented intrinsic activity against *S. aureus*, when they were placed on the growth medium at sub-inhibitory concentrations they were able to reduce the MIC for norfloxacin in a concentration dependent manner against SA1199-B strain (Figures 1 to 3). The oxygenated monoterpenes also were able to improve the activity of the ethidium bromide against SA1199-B (Figure 3), a substrate of NorA protein. These results indicate that the compounds tested are EPIs for NorA efflux pump. Besides, the monoterpenes of open chain (nerol and 3,7-dimethyl-octan-1-ol) were more effective as NorA inhibitors than the monoterpene 1-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzene which presents a benzene ring.

Taking into account the criteria adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) nerol decreased the MIC of the norfloxacin for SA1199-B, changing its phenotype from resistant to sensible. In the case of 3,7-dimethyl-octan-1-ol, the SA1199-B phenotype was changed from resistant to intermediate.

Lipophilicity studies are relevant to know if a molecule is able to interact with cell membranes [41]. The *Log P* of oxygenated monoterpenes was calculated and results showed that all of them were found to be very hydrophobic, thus them are able to intercalate in the

phospholipid bilayer. Interaction of hydrophobic compounds with plasma membrane can increases its permeability leading to dissipation of the proton-motive force [42, 29].

Once NorA activity is dependent of the proton motive force [43], we believe that partition of nerol or 3,7-dimethyl-octan-1-ol molecules into the plasma membrane affecting the proton gradient, could be related with the inhibitory effect verified for NorA [44]. Despite, a damaged membrane by nerol or 3,7-dimethyl-octan-1-ol could become more permeate to norfloxacin molecules, also contributing to increase its intracellular concentration. Additionally, damaged plasma membrane could lead to conformational changes and inhibition of membrane proteins, such as NorA.

5. Conclusion

Oxygenated monoterpenes nerol and 3,7-dimethyl-1-octanol were able to potentiate the antibiotic activity of norfloxacin against SA1199-B, indicating that this essential oil components act as efflux pump inhibitors of NorA. Thus, these compounds are potential components of pharmaceutical forms for use in association with norfloxacin in the antibiotic therapy of infections caused by fluoroquinolone resistant Staphylococcus aureus.

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian research agencies FAPEPI and CNPq for the financial support and Universidade Federal do Piauí.

References

[1] Laxminarayan R. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. Science. 2014; 345: 1299–1301. doi: 10.1126/science.1254163.

[2] Brusselaers N, Vogelaers D, Blot S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. Ann. Intensive Care. 2011; 47: 1-7.doi: 10.1186/2110-5820-1-47.

[3] Chua KYL, Howden BP, Jiang J-H, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014; 21: 554–62. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.026.

[4] Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, DeLeo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014; 21: 563-574. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.030.

[5] Gade N, Qazi M. Fluoroquinolone therapy in Staphylococcus aureus infections: Where do we stand? J. Lab. Physicians. 2013; 5: 109. doi:10.4103/0974-2727.119862.

[6] García-Fernández A, Gallina S, Owczarek S, Dionisi AM, Benedetti I, Decastelli L. Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella* enterica Serovar Typhi in Italy. *PLoS One*. 2015; 10, e0132065. doi:10.1371/journal.pone.0132065.

[7] Vali L, Dashti A, Jadaon MM, El-Shazly S. The emergence of plasmid mediated quinolone resistance qnrA2 in extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in the Middle East. DARU J Pharm Sci. Eur. J. Pharm. Sci. 2015; 23: 34. doi: 10.1186/s40199-015-0116-7.

[8] De Lastours V, Chau F, Roy C, Larroque B, Fantin B. Emergence of quinolone resistance in the microbiota of hospitalized patients treated or not with a fluoroquinolone. J. Antimicrob. Chemother. 2014; 69: 3393–400. doi:10.1093/jac/dku283.

[9] Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry. 2014; 53: 1565–74. doi: 10.1021/bi5000564.

[10] Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. 2014; 438–45. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007.

[11] Mc Gann P, Milillo M, Kwak YI, Quintero R, Waterman PE, Lesho E. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes qacA/B and mupA in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diag. Microb. Infec. Dis. 2013; 77: 270-272. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.006.

[12] Opperman TJ, et al. Efflux-mediated bis-indole resistance in *Staphylococcus aureus* reveals differential substrate specificities for MepA and MepR. Bio. Med. Chem. 2010; 18: 2123-2130. doi: 10.1016/j.bmc.2010.02.005.

[13] Kaatz GW, Seo SM. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother.1995; 39: 2650–2655. doi:10.1128/AAC.39.12.2650.

[14] Kaatz G, Seo S. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. agents. 1993; 37: 1086–94. doi:10.1128/AAC.37.5.1086.

[15] Matias EFF, et al. Potentiation of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from *Cordia verbenacea* DC. Microb. Pathog. 2016; 95: 111-116. doi:10.1016/j.phytol.2008.01.002.

[16] Fontaine F, et al. Boronic species as promising inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump: Study of 6-substituted pyridine-3-boronic acid derivatives. Eur. J. Med. Chem. 2015; 95: 185–98. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.02.056

[17] Nguyen ST, Kwasny SM, Ding X, Cardinale SC, McCarthy CT, Kim H-S. Structure–activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 2015; 23: 2024–34. doi:10.1016/j.bmc.2015.03.016.

[18] Bharate JB, et al. Discovery of 4-acetyl-3-(4-fluorophenyl)-1-(p-tolyl)-5-methylpyrrole as a dual inhibitor of human P-glycoprotein and *Staphylococcus aureus* Nor A efflux pump. Org. Biomol. Chem. 2015; 13: 5424–5431. doi:10.1039/C5OB00246J.

[19] Whalen KE, Poulson-Ellestad KL, Deering RW, Rowley DC, Mincer TJ. Enhancement of Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Bacteria by the Efflux Pump Inhibitor 3,4-

Dibromopyrrole-2,5-dione Isolated from a *Pseudoalteromonas* sp. J. Nat. Prod.2015; 78: 402-412. doi: 10.1021/np500775e.

[20] Chovanová R, Mezovská J, Vaverková Š, Mikulášová M. The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant. Lett. Appl. Microbiol.2015; 61: 58–62. doi:10.1111/lam.12424.

[21] González-Ramírez AE, González-Trujanob ME, Orozco-Suárezc SA, Alvarado-Vásquezd N, López-Muñoza FJ. Nerol alleviates pathologic markers in the oxazolone-induced colitis model. Eur. J. Pharmac. 2016; 776: 81–89. doi:10.1016/j.ejphar.2016.02.036.

[22] De Fazio L, et al. Dietary Geraniol by Oral or Enema Administration Strongly Reduces Dysbiosis and Systemic Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. Front. Pharmac. 2016; 7: 38. doi: 10.3389/fphar.2016.00038.

[23] Barreto HM, et al. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus*. Eur. J. Integr. Med. 6, 560–564. 2014a. Available from: doi:10.1016/j.eujim.2014.03.011.

[24] Peixoto MG, et al. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. Ind. Crops and Prod.2015; 71, 31-36. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.084.

[25] Kedia A, Prakash B, Mishra PK, Dubey NK. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. Int. J. Food Microbiol. 2014;1:7, 168-169. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008.

[26] Holetz FB, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 1027–1031. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017

[27] Barreto HM, Silva Filho EC, Lima EO, Coutinho HDM, Morais-Braga MFB, Tavares CCA, Tintino SR, Rego JV, Abreu APL, Lustosa MCG, Oliveira RWG, Citó AMGL, Lopes JAD. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Ind. Crops and Prod. 2014b; 59: 290-294. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.026.

[28] Almeida TS, Rocha JT, Rodrigues FFG, Campos AR, Costa JGM. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. Ind. Crops and Prod. 2013; 44: 630–633. Available from: doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.010.

[29] Souza EL, Oliveira CEV, Stamford TLM, Conceição ML, Gomes Neto NJ. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Brazilian J. Microbiol. 2013; 44; 29–35. doi: 10.1590/S1517-83822013005000001.

[30] Mihai AL, Popa ME. *In vitro* Activity of Natural Antimicrobial Compounds against *Aspergillus* Strains. Agric. Agric. Sci. Procedia. 2015; 6: 585-592. doi:10.1016/j.aaspro.2015.08.092.

[31]Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon essential oil* (lemon grass) and its interaction with silver ions. Phytomedicine. 2015; 22: 657–665. doi:10.1016/j.phymed.2015.04.002.

[32] Al Abbasy D W, Pathare N, Al-Sabahi JN, Khan SA. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). Asian. Pac. J. Trop. Dis. 2015; 5: 645-649. doi: 10.1016/S2222-1808(15)60905-7

[33] Ali IBEH, Chaouachi M, Bahri R, Chaieb I, Boussaïd M., Harzallah-Skhiri F. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. Ind. Crops. Prod. 2015; 77: 631–639. doi: 2015.09.0460926-6690.

[34] Ammar A H, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M, Zagrouba F. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli Oil). Pak. J. Bio. Sci. 2012; 15: 1034-1040. doi: 10.3923/pjbs.2012.1034.1040.

[35] Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Applied Microb. 2000; 88: 308–316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x

[36] Van Zyl RL, Seatlholo ST, Van Vuuren, SF, Viljoen AM. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. J. Essent. Oil Res. 2006; 18: 129-133. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18019096 [accessed 13.04.16].

[37] Badawy MEI, Rabea EI, Taktak NEM, El-Nouby MAM. The antibacterial activity of chitosan products blended with monoterpenes and their biofilms against plant pathogenic bacteria. Scientifica. 2016; 1-10. doi:10.1155/2016/1796256.

[38] Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Protec.2002; 10: 1545–1560. doi: 1111/1750-3841.12021.

[39] Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essent. Oil Res. 1989; 1: 118-119. doi: 10.2174/0929867033457719.

[40] Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. J. Agric.Food Chem. 2003; 51: 3197. doi:10.1021/jf021038t.

[41] Kasim NA, et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Mol. Pharm. 2004; 1: 85–96. doi: 10.1021/mp034006h.

[42] Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. Eur. J. Pharm. Sci. 2013; 48: 80-86. doi:10.1016/j.ejps.2012.09.016.

[43] Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski LS, Silva-Pereira, I, Kyaw, CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. Front. Microbiol. 2013; 4: 353. doi: 10.3389/fmicb.2013.00353.

[44] Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. Future Microbiol. 2013; 8: 491–507. doi: 10.2217/fmb.13.16.

ANEXO F: Artigo Submetido à revista Current Pharmaceutical Biotechnology

03-May-2016

Dear Prof. Coêlho:

A manuscript titled Preparation, characterization and featuring of an inclusion complex of nerol with β-cyclodextrin (CPB-2016-0049) has been submitted by Prof. Mayara Coêlho to the Current Pharmaceutical Biotechnology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: https://mc04.manuscriptcentral.com/cpb
USER ID: mayaralcoelho@hotmail.com
PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

https://mc04.manuscriptcentral.com/cpb?URL_MASK=445e59b5d977482db9772e01dafa0bb1

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to https://mc04.manuscriptcentral.com/cpb to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,
Current Pharmaceutical Biotechnology Editorial Office

Preparation, characterization and featuring of an inclusion complex of nerol with β-cyclodextrin

Mayara Ladeira Coêlho[1], Herlane Oliveira Meireles da Silva[2], Md. Torequl Islam[1], Vicente Galber Freitas Viana[3], Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante[4]

[1] *Post Graduation student, Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil;*

[2]*Graduation student, Integral Diferential College, Teresina, Piauí, Brazil;*

[3] *Professor, Laboratory of Treatment of Materials, Federal Institute of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil;*

[4]*Professor, Laboratory of Toxicology Genetic Research*

ABSTRACT

Nerol is an acyclic type monoterpene with important biological activities. However, the low solubility in aqueous media is a limiting factor for its user. Cyclodextrins have been widely used in order to improve the solubility, stability and bioavailability of nonpolar molecules through the formation of inclusion complexes. Thus, the present study consists in the development of nerol inclusion complex in combination with the β-cyclodextrin (β-CD) followed by characterizing by thermal analysis and spectrophotometric absorption in the infrared (FTIR). The results suggest a complexation of nerol with β-CD having detours and changed the intensity of various bands. The thermogravimetric curve of CI found to indicate an output of solvating water molecules from the complex cavity formed for replacement of drug molecules probably included. Thus, it is concluded a possibility to obtain inclusion complexes of nerol monoterpene with β-CD, which will increase its solubility and facilitate delivery process.

Keywords: nerol; monoterpene; β-cyclodextrin; inclusion complex; solubility.

1. INTRODUCTION

Medicinal plants are wide spread and nowadays they are being widely used as alternative medicine sources (Rodrigues, 2013). Among the other chemical moieties, monoterpenes, a member of essential oils (EOs) under the class of terpenes have gained an attention with promising biological activities (Carvalho, 2013). Generally, they are repellent or attractive properties, volatile in nature with low molecular weight (Knaak, 2010; Angelis, 2012). They are with 10 carbon atom molecules and constitute the most representative part (90%) in the class. The major interest of these compounds goes to accounts of perfumery and flavoring applications in food beyond a number of pharmacological effects. These substances are generally volatile and may be detected by antennae or tarsi insects (Marciel, 2011).

The nerol (cis-2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol), an acyclic primary alcohol, is a monoterpene having used as a fragrance compound in perfumery found in various plant species. It is used as an anti-inflammatory, antiseptic, antispasmodic and antidepressant agent. It has also used in gastric ulcer (Angelis, 2012). However, being an EO, it has poor solubility in aqueous medium, thus limiting its applications in *in vivo* systems. Complexation with a suitable substance may increase the solubility of poorly soluble materials, which is helpful to attain a desired bioavailability in a number test system (Melo et al., 2007).

The CDs are cyclic oligosaccharides with D-glucose molecules, which enable them to form inclusion complexes with other substances (Nephew, 2009). To be noted that CDs (alpha, beta and gamma) are the natural compounds containing six to eight glucose units. In the pharmaceutical area, the β-CD has mainly been explored in increasing the solubility, bioavailability, and to reduce the side effects of a variety of drugs (Silva, 2014). Vectoring of a drug is an operation to modulate and, if possible, direct totally the distribution of a substance associating to an appropriate system called vector (Feuzer, 2012). Several studies have been used to characterize inclusion complexes between the drugs and CDs and the more experimental techniques used are: thermal analysis, nuclear magnetic resonance spectroscopy, ultraviolet-visible, and infrared (Arrais, 2012). Given the above, the aim of this study is shot out to obtain a complexation between nerol and β-cyclodextrin and nerol, following by characterization thereby.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Materials

Nerol, β-CD and other chemicals and reagents required for this purpose were purchased from the Sigma-Aldrich (USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of inclusion complex

The inclusion complex of nerol was prepared with natural cyclodextrin, β-CD by applying the kneading method in a molar. Briefly, 1:1 of nerol and β-CD was grounded in a porcelain grail with the aid of a pistil adding a small amount of ethanol sufficient to obtain a paste. Then the grail containing the mixture was kept in a water bath protected from light with a temperature under 37 °C until it was completely dried. The resulting material was comminuted, desiccated, and placed in a sealed glass vial being stored in a desiccator.

2.2.2. Thermogravimetry (TG)

The thermoanalytical characterization by TG was performed by a thermobalance (Shimadzu® TGA 51) in a nitrogen atmosphere inflow of 50 mL/min being the mass of the sample around 6.0 mg of nerol was put in a platinum crucible at a temperature range 25-600 °C with a heating rate of 10 ºC/min.

2.2.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis using DSC-60 (Shimadzu®) was performed in a dynamic atmosphere of nitrogen (50 mL/min) having a mass of about 5.0 mg and packaged in an aluminum sealed container. The temperature and heating rate were maintained as mentioned above.

2.2.4. Spectroscopy Fourier transform infrared (FTIR)

The absorption spectra in infrared by Fourier transform were obtained by the attenuated total reflectance method (ATR). The nerol samples, β-CD, MF and the inclusion complex were obtained by Spectrometer ThermoNicolet is5 equipped with accessory ID5 of attenuated total reflectance and the control software and acquisition Omnic 9.0. The mid-infrared region comprises of 650-4000 cm^{-1}, was used for this analysis (Zeni, 2005).

2.3. Statistics

The data were analyzed by using the software OriginPro, Ta-60ws and Graphpad Prism®. For the organization of tables, Microsoft Excel® were used.

2. RESULTS AND DISCUSSION

We conducted a complexation process of the monoterpene, nerol with β-CD in order to get a better solubility pattern in the viewpoint of applicability in a wider range of *in vivo* test systems. Characterization was performed by IR spectroscopy, and thermal analysis DSC and TG.

3.1. Identification by IR spectroscopy

Analysis of the spectra can be made by comparing the bands of the guest molecule (nerol) of the CD and the physical mixture with the complex is shown in **Figure 1** and **2**.

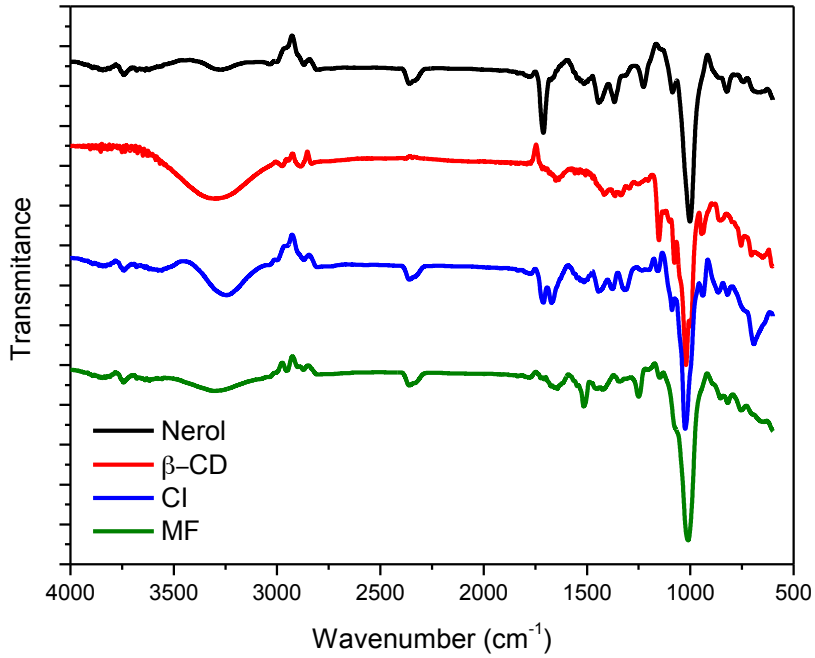


Figure 1 - FTIR spectrum of Nerol and β-CD and inclusion complex, IC (nerol: β-CD) and their physical mixture, MF (nerol: β-CD).

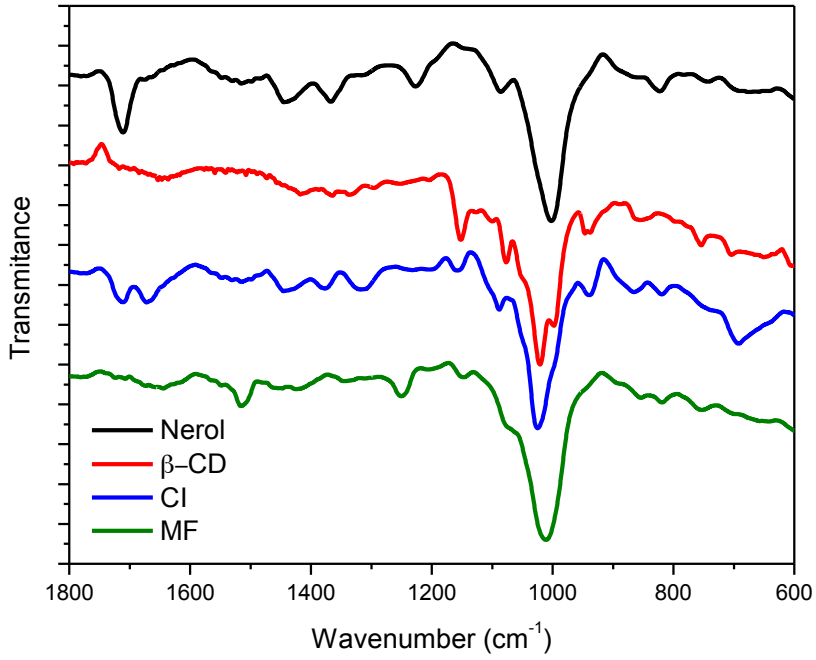


Figure 2 - Extended spectrum from the region "finger print" of the Nerol FTIR and β-CD FTIR and IC and MF.

Generally, the spectrum of the physical mixture and CI corresponds to the overlapping spectrum of the guest molecule and the spectrum of the CD, but with the bands of the guest molecule less evident due to its lower concentration. When there is a complexation, bands can change position, diminish or even may disappear (Nascimento, 2013).

The infrared spectrum of β-CD showed absorption bands at 3381 cm -1 (stretching O - H,) 2922 cm-1 (C stretch - H), 1153 cm-1 (C stretch - O) and 1024 cm-1 (stretching C - O - C). The IR spectrum showed leading bands of the strong absorption of nerol at 1675 cm -1 (stretching C = O) of ketone and 1127 cm -1 (stretching C = C) of alkene. Although the interactions in the inclusion complex between the β-CD and nerol, are not very strong due to having noncovalent electrostatic bonds, it was observed detours and changes in the intensity of many bands when we compared with the complex and nerol. The disappearance of the absorption band of the carbonyl (C = O stretch) and bonds (C = C stretch) of nerol confirms the formation of a complex. In the physical mixture, there was a beginning of interaction between β-CD and nerol

due to the disappearance of the carbonyl group, however, is continued with the connections (C = C stretch) reacting after inclusion complex between them.

3.2. Thermogravimetric analysis

On this occasion, the most used techniques are the DSC and TG (Novak et al., 2006). In the TG analysis, the mass of a sample is under inert or oxidant atmosphere of gas being continuously monitored in function of temperature at a heating ramp. The obtained curves are two where one is related to the mass percentage (%W) (**Figure 3**) and other derivative, in relation to the temperature, the weight percentage (Derived from %M/°C) as shown in **Figure 4**. The latter case allows the exact determination of the temperature at which is determined mass loss of the sample (Arrais, 2012).

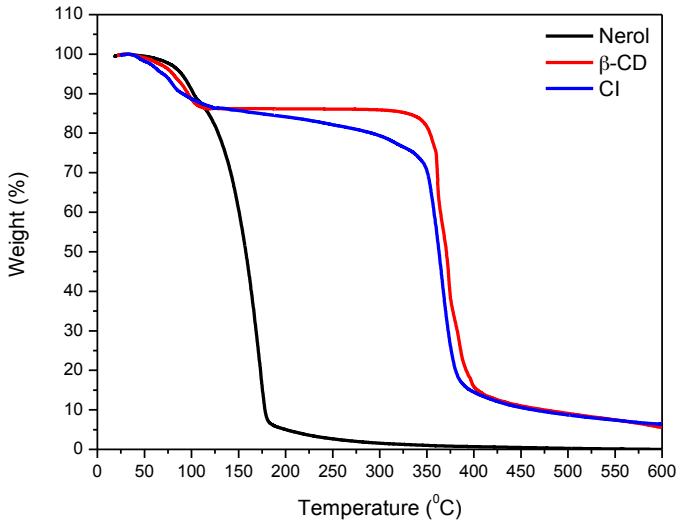


Figure 3: TG curve of the free species of nerol, β-CD and Cl (complex nerol: βCD)

The analysis of TG/DTG curves of β-CD shown in **Figure 3**, CD allows to identify that the 67-120 °C temperature range (~ 95 °C T_{peak}) occurred a mass loss event of 29.25% referring to the release of water molecules from the β-CD cavity. Then it's been a thermal stability level of between 124-320 °C, while in the temperature range was 334-415 ° C (T_{peak} ~ 368 °C). There was a weight loss of 5.96%, related to rapid melting / decomposition of β-CD.

From the TG/DTG curves of nerol, two thermal events were observed. Firstly, at a temperature of 100 °C caused a slight loss of water with a weight loss of 7.64%. Secondly, at a

temperature range of 109-192 °C caused a mass loss of 27% related to the boiling point of decomposition of the substance.

However, the TG/DTG curve of the complex showed a quite similar to the β-CD curve. In **Table 1**, one can observe an increase in mass loss between 334-415 °C from 5.9% to 62.49% indicating loss of water molecules from the complex cavity formed, possibly by the replacement of drug molecules included in. In comparison with the nerol absorption band, it was observed that within the range of 109-192 °C (T_{peak} ~ 124 °C), was evaporated completely, thus, indicating a complex formation.

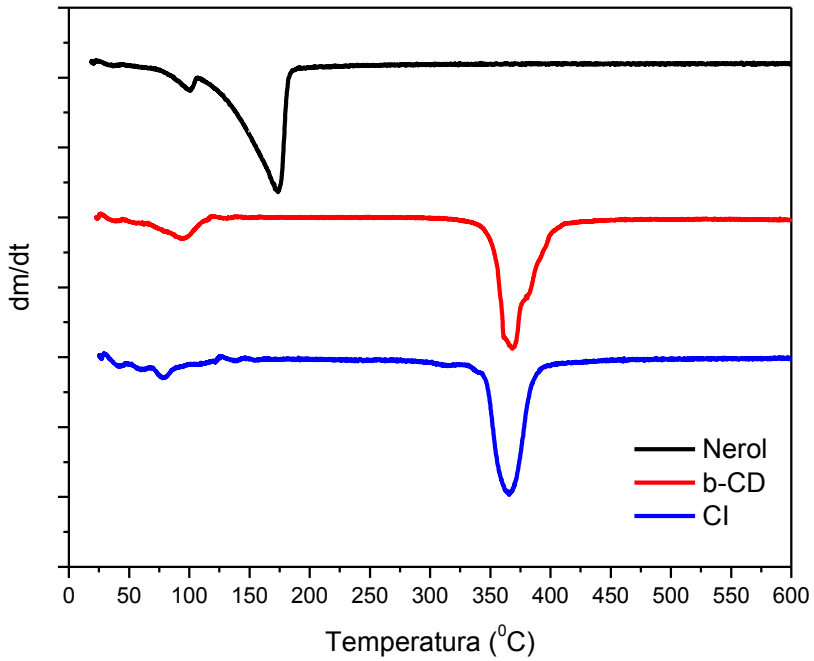


Figure 4 - Curves of the derived of TG of free species of nerol, β-CD, and Cl (nerol complex:β-CD).

Table 1. Percentage mass loss obtained by TG samples of nerol, β-CD and CI (nerol:β-CD).

Samples	**%M loss**	
	*Step I (%)**	*Step II (%)***
Nerol	7.64	27.00
β-CD	29.25	5.96
CI	43.58	62.49

* Percentage of released water to 120 °C; ** weight loss related to the onset of decomposition of the molecule

3.3. Differential scanning calorimetry analysis

DSC is one of the most widely used techniques to confirm the formation of the inclusion complex in solid state having sensitivity to detect possible changes in the characteristic thermal events of the guest molecule when it is inside the CD cavity, system stability and its crystallinity (Aguiar, 2013). In our study, the thermal behavior of all materials was investigated by using DSC in an inert atmosphere. The curve of nerol shown in **Figure 5** offering two endothermic events featuring as 1) water loss at 42 °C and b) boiling point and degradation of the substances at 150 °C.

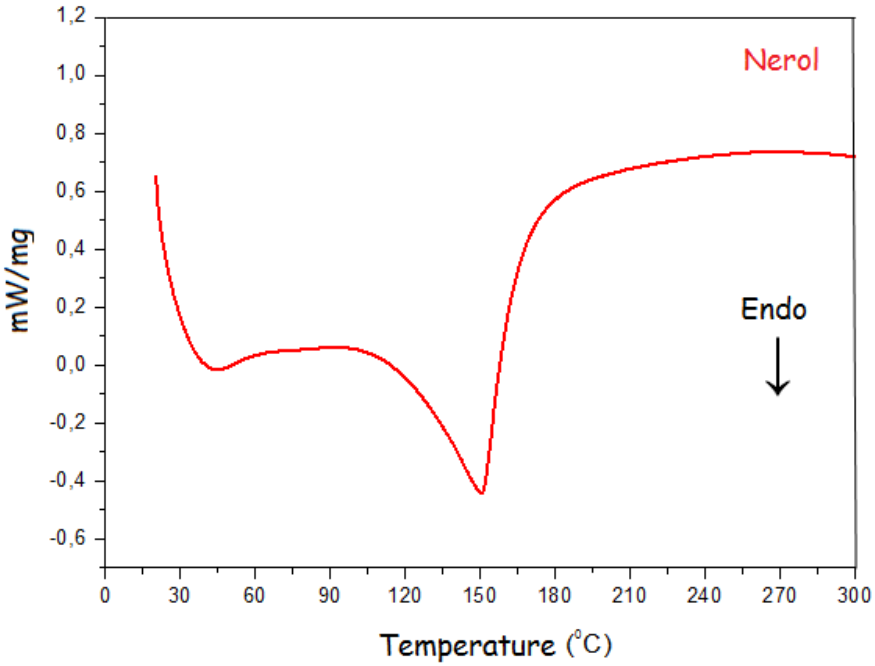


Figure 5 - DSC thermogram of pure nerol monoterpene

The DSC curve of β-CD (**Figure 6**) telling three endothermic events followed by an exothermic event and subsequent decomposition stage. The endothermic events occurred in the temperature ranges 140, 165 and 307 °C, respectively. Initiation was occurring with the loss of water molecules within the hydrophobic cavity followed by an event caused by a physical

process attributed to the change of crystalline phase. Then there was a fusion followed by degradation of β-CD.

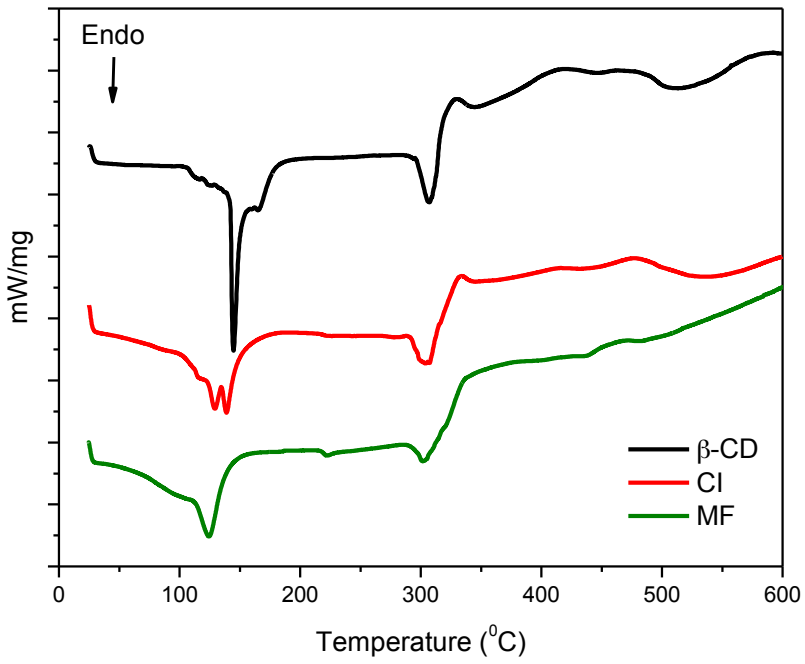


Figure 6 - DSC thermogram of the β-CD, CI (nerol:β-CD) and MF (nerol:β-CD).

The DSC curve of MF also presented three endothermic events followed by a decomposition. The events occurred in the following temperature ranges: 108-161 °C, 217-230 °C and 285-348 °C. An initiation was occurred by the summation of pure nerol and β-CD, leading to a corroborate of crystals of β-CD, and finally the fusion of β-CD followed by decomposition.

The DSC curve of the complex showed an overlapping of the thermal events of β-CD. This demonstrates that the presence of the guest molecule (nerol) did not affect the thermal stability of β-CD. This result can be confirmed in the analysis of the TG/DTG curve of the complex and β-CD watching the mass losses in observed temperatures.

In curves of these last two methods (MF, E and IC) shown in **Figure 6**, significant differences were observed mainly related to the reduction of the intensity of the peak

corresponding to the loss of water and disappearance of the endothermic event related to crystalline phase transition of the pure β-CD in CI.

It is also observed in the DSC curves of the MF and in the complex some changes in the profiles of β-CD curves at 307 °C temperature range showing a slight displacement in relation to curve Cl. This can be explained by the interaction of the drug with β-CD suggesting the inclusion of the nerol molecule in replacement and release of water into the β-CD cavity.

3. CONCLUSION

From this study, it is possible to obtain inclusion complexes of nerol with β-cyclodextrin, which may permit its high solubility in aqueous medium. The results of the spectroscopy FTIR, DSC, TG of the nerol, βCD, physical mixture, and the obtained inclusion complexes allowed visualizing interactions between the drug and β-CD suggesting a successful complexation. Finally, the complex can be prepared from the blend of nerol and β-CD in highlighting the use of delivery systems in which there may be a real improvement in solubility.

4. REFERENCES

Aguiar, U.N., Lima, S.G., Rocha, M.S., Freitas, R.M., Oliveira, T.M., Silva, R.M., Moura, L.C.B., Almeida, T.G. **Preparation and characterization of the inclusion complex essential oil of *Croton zehntneri* with β-cyclodextrin**. Química Nova. Vol. 37, n.1, p. 50-55, 2014.

ALVES, M.S.M.; **Caracterização farmacognostica, físico-químico e estudos preliminares de pré-formulação da Arrabidaea chica (Humb&Bonpl) B. Verlt**. 2008 114f. Dissertação (mestrado em ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

ANGELIS, C. D. **Avaliação da proteção gástrica e duodenal do monoterpeno nerol em roedores**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/91622/angelis_cd_me_botib.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04 Ago. 2014.

ARAÚJO, M,V,G. **Química supramolecular: complexos de inclusão de fármacos antitoxoplasmose em derivado de ciclodextrina**. São Cristóvão, 2007. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Sergipe. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp140196.pdf>. Acesso em: 01 nov 2015.

ARRAIS, M. A. S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona:βcd e dapsona:sbeβcd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/9a_dissertacao_monica_amaral.PDF>. Acesso em: 15 set. 2014.

CARVALHO, C. S. **Efeito gastroprotetor de monoterpenos presentes em plantas medicinais do cerrado e da caatinga em modelos de lesões gástricas em roedores**. Teresina, p.1-3, 2013.

EVANGELISTA, B. A. L. **Caracterização, analise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametazona**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Andr%C3%A9%20Luis/Downloads/Dissertacao_BrunoALEvangelista%20(3).pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B.; **Nanotecnologia aplicada a fármacos**. 2011. 98 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, 2011. Disponível em: <http://www.catolica-es.edu.br/fotos/files/06.pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.

FALLEIROS, J. P.B; BRANDL, A.L; FONSECA, A.R.A. **Aplicações da Nanotecnologia no Diagnóstico e Tratamento de Câncer**. n 1. v 8. São Paulo, 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-AplicacoesDaNanotecnologiaNoDiagnosticoETratamento-4039448%20(1).pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.

FERREIRA, M. D. L. **Terpenos: potenciais agentes quimioterapêuticos obtidos de fontes naturais usados contra o câncer de pulmão**. 2014. 38 f. Projeto de pesquisa (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2014. Disponível em: <http://rei.biblioteca.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/608/1/MDLF22072014.pdf>. Acesso em: 02 set. 2014.

FEUZER. Paulo Emilio. **Encapsulamento simultâneo de nanopartículas magnéticas (npms) com ftalocianina de zinco (znpc) via polimerização em miniemulsão**. 2012. 120f. Dissertação (Grasuação em Engenharia Quimica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M.; **Potencial dos Óleos Essenciais de Plantas no Controle de Insetos e Microrganismos**. São Leopoldo, v.5, n. 2, p. 120-123, 2010. Disponível em: < http://www.unisinos.br/blogs/ppg-biologia/files/2011/05/art08_knaak_et_al.pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

KUBOTA, Daniela. **Estudo fisico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

LIMA, J. R. **Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais**. Revista Brasileira de Farmácia. Recife, p.1-7, Agosto, 2012.

LOREGIAN. A. **Comparação entre dois métodos de extração e caracterização de óleos essenciais de plantas do horto de plantas medicinais do grupo pet - agronomia utfpr - pato branco**. 2013. 45f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Quimica) – Universidade de Tcnologia do Paraná, Pato Branco, 2013.

LYRA, M.A.M. et al. **Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina**. Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Teresina, p. 1-8, Setembro, 2010.

MACIEL, M.V. et al. **Atividade inseticida dos óleos essenciais de *lippiasidoides*e *coriandrumsativum*sobre *lutzomyialongipalpis***. Ceará, n 19, p. 77-87, 2011.

MEIRELLES, L. M. A. **Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Lyghia_Meirelles.pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

MELO, N. F. et al. **Preparação e Caracterização Inicial de Complexo de Inclusão entre Nitrofurazona e 2-Hidroxipropil—Ciclodextrina**. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**.** São Paulo,v. 28, n.1, p.35-44, 2007. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/343/328>. Acesso em 20 Ago. 2014.

MIRANDA, V. C. **Influência de condições de secagem, sombreamento, horário de colheita e procedência das plantas sobre o teor de óleo essencial de cymbopogoncitratus**

(d.c) stapf. 2012. 41 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal de Tocantins, Tocantins, 2012. Disponível em: <http://www.site.uft.edu.br/producaovegetal/dissertacoes/Valdilene%20Coutinho%20Miranda.pdf>. Acesso em: 21 Ago. 2014.

MOURAO, L. C. S. **Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais**. 2012. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

NASCIMENTO, J. L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platoniainsignis*Mart e β-ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

NOVAK, C.; EHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, L.; ORGOVANYI, J. **Aplication of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexs.**J. Therm. Anal. Calorim. v.84, n.3, p.693-701, 2006

PEREIRA, T. M. M. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platoniainsignis*Mart e β-ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de tepernóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 2006. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/11201/000609581.pdf?sequence=1>. Acesso em: 28 Ago. 2014.

PUISIEUX, F.; ROBLOT, L. **Vetorização e vetores de fármacos**. Rio Grande do Sul, v. 4, n. 1/2, p. 29-50, 2014. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/96434492/VETORIZACAO-E-VETORES-DE-FARMACOS>. Acesso em: 10 set. 2014.

RODRIGUES, M. M.**Inventário de Plantas Medicinais do Programa Farmácia Viva da Cidade de Picos**. 2013. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Piauí. Picos, 2013. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/picos/arquivos/files/monografia(2).pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Dissertacao_de_Mestrado_Eliamara_Barroso_Sabino.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014.

SAITO, M., L; **As Plantas Praguicidas:** alternativa para o controle de pragas da agricultura. Jaguariúna, p. 01-05, 2004. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. **Análise térmica aplicada à cosmetologia**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, jul./set., 2007. Disponível em: <file:///C:/Users/Andr%C3%A9%20Luis/Downloads/44215-52712-1-PB%20(1).pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

SILVA, J. L. G. H. **Síntese e caracterização do complexo ternário B-ciclodextrina: colecalciferol: íons metálicos**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, J. S. S. **Complexos de inclusão de fármacos com Ciclodextrinas e Cucurbiturilos. Aplicações Farmacoterapêuticas**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro, 2011.

SOBRINHO, J. L. S. **Atividade inseticida dos óleos essenciais de *lippiasidoides*e *coriandrumsativum*sobre *lutzomyialongipalpis***. 2009.174f. Tese (Doutorado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, M. R. P.; PERETIATKO, C. D. S. **Avaliação química de óleo essencial e alopáticade extrato hidroalcoólico de *artemisiavulgaris*l**. 2014. 40 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná., Pato Branco, 2014. Disponível em: <https://www.google.com.br/#q=http%3A%2F%2Frepositorio.roca.utfpr.edu.br%2Fjspui%2Fbitstream%2F1%2F2197%2F1%2FPB_COQUI_2013_2_05.pdf>. Acesso em: 28 Ago. 2014.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em:<file:///C:/Users/André%20Luis/Downloads/Dissertacao_AndreaIkeda%20(3).pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.

ZENI, Diego. **Determinação de cloridrato de propanolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.