UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)

ELENICE MONTE ALVARENGA

Efeito protetor do carvacrol e de seu derivado semissintético, o acetato de carvacrolila, na mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11): papel dos receptores TRPA1

Parnaíba-PI
2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

A473e Alvarenga, Elenice Monte.
Efeito protetor do carvacrol e de seu derivado semissintético, o acetato de carvacrolila, na mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11): papel dos receptores TRPA1 [manuscrito] / Elenice Monte Alvarenga. – 2017.
157 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.
Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

1. Inflamação. 2. Mucosa Intestinal. 3. Citocinas. 4. Estresse Oxidativo. 5. Docagem Molecular. I. Titulo.

CDD: 574.87

ELENICE MONTE ALVARENGA

Efeito protetor do carvacrol e de seu derivado semissintético, o acetato de carvacrolila, na mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11): papel dos receptores TRPA1

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí (UFPI) *campus* Ministro Reis Velloso para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Parnaíba-PI
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ELENICE MONTE ALVARENGA

TÍTULO DO PROJETO: "Efeito protetor do carvacrol e de seu derivado semissintético, o acetato de carvacrolila, na mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11): papel dos receptores TRPA1."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI (Presidente)	APROVADA	
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	APROVADA	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	Aprovada	
Prof. Dr. Giovanny Reboucas Pinto – UFPI (Examinador)	APROVADA	
Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira - UFC (Examinador)	APROVADA	

DATA DA AVALIAÇÃO: 07 de agosto de 2017.
HORÁRIO: 14:00h
LOCAL: No Auditório do Campus Ministro Reis Velloso da UFPI.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo Antonio e Zilmar, e ao meu irmão Leônidas, o meu maior agradecimento, pela compreensão, apoio e amor incondicionais, além dos constantes incentivos. Ao Jardel, pela enorme paciência.

Ao Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, que creditou a mim esta tarefa e tornou seu desempenho possível por meio de seus ensinamentos.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) que, provendo-me da estrutura física e acadêmica, em muito contribuíram para a realização deste trabalho. Aqui também se incluem as agências de fomento, em especial o CNPq e a FAPEPI, pela disponibilização de recursos financeiros que permitiram a consecução deste trabalho.

Aos Profs. Drs. membros desta banca, pela sua contribuição à melhoria do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Desordens Gastrointestinais (Lafidg): Nayara Sousa, Kerolayne Nogueira, Beatriz Melo, Patrícia Oliveira, Simone de Araújo, Gabriela Pacheco, Fabiana Souza, Caroline Brandão, Luan Kelves, Thiago Araújo, José Júnior, Matheus Sombra, Bruno Iles, Douglas Costa e Dvison Pacífico, pelo auxílio na realização dos experimentos e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), na pessoa de Alyne Araújo, e ao Laboratório de Preparação e Análise Histológica (LAPHIS), em atenção a Felipe Rodolfo, pelo auxílio na realização de experimentos.

Aos Profs. Drs. Damião Sousa e Rivelilson Freitas (*in memorian*) pela disponibilização dos compostos que constituem o cerne deste trabalho. Ao Prof. Dr. Emmanuel Souza, pela realização dos estudos de docagem molecular, que em muito contribuíram para a qualidade do trabalho. À Profa. Dra. Gerly Anne Brito e sua equipe pela obtenção dos preparados para as análises histológicas.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) *campus* Cocal, em atenção a todos os colegas de trabalho e aos meus alunos, que estimularam o início, compreenderam e auxiliaram nas adaptações da rotina de trabalho e, com isso, contribuíram para a finalização deste projeto.

Finalmente, a todos que, mesmo indiretamente, tenham estimulado o alcance deste objetivo pessoal e profissional.

RESUMO

Agentes antineoplásicos são compostos citotóxicos que possuem como alvo células com intensa e rápida proliferação, induzindo processos de morte celular em células normais e tumorais. Como uma das principais drogas antineoplásicas utilizadas tem-se o cloridrato de irinotecano (CPT-11), inibidor seletivo da enzima topoisomerase I, que é responsável pela realização de rupturas na dupla hélice de DNA, evitando a replicação do mesmo e, consequentemente, bloqueando processos de divisão celular. O CPT-11 produz danos sobre a mucosa gastrointestinal, resultando em mucosite do trato alimentar que, além de ser causa direta de mortes ocasionais em tratamentos antitumorais, também causa significativo ônus econômico, já que gera a necessidade de uso de mais medicamentos que minimizem seus efeitos. Com isso, buscou-se neste trabalho investigar a potencial ação de compostos de origem natural (carvacrol) e sintética (acetato de carvacrolila) sobre os efeitos da mucosite intestinal. Para isso, foram utilizadas as seguintes estratégias de ação: indução de mucosite intestinal com o uso do CPT-11, para avaliação da ação dos referidos compostos sobre a perda de massa corpórea, a sobrevida de camundongos, o número total de leucócitos e a proporção de bactérias presentes no sangue. Além disso, também foi avaliada a ação dos compostos sobre parâmetros histológicos e morfométricos. Ademais, foram quantificados marcadores de inflamação (MPO, COX-2, NF-κB, e citocinas – IL1β, TNF-α e KC) e estresse oxidativo (MDA, GSH e NOx), e foi avaliada a possível interação entre os compostos e o receptor TRPA1. Com isso, observou-se que carvacrol e acetato de carvacrolila possuem ação anti-inflamatória e protetora frente à mucosite intestinal induzida por CPT-11 e que os mecanismos de controle da mucosite por estes compostos estão associados ao receptor TRPA1. Ambos os compostos demonstraram ação promissora quanto à melhora nos parâmetros clínicos, à diminuição do dano tecidual e de parâmetros indicativos de inflamação e de estresse oxidativo. Finalmente, os resultados demonstram que o acetato de carvacrolila aparentemente pode ser tolerado em maiores doses, ainda que resultando em ação semelhante à do carvacrol.

Palavras-chave: Inflamação. Mucosa intestinal. Citocinas. Estresse oxidativo. Docagem molecular.

ABSTRACT

Antineoplastic agents are cytotoxic compounds that target cells with fast and intense proliferation and induce cell death in normal and tumor cells. Irinotecan hydrochloride (CPT-11), a selective inhibitor of topoisomerase I, is one of the main antineoplastic drugs. CPT-11 is responsible for make breaks in the DNA double helix, jeopardizing the replication and, consequently, blocking the cell division. CPT-11 causes damage to the gastrointestinal mucosa resulting in alimentary tract mucositis which is a direct cause of occasional deaths in antitumor treatments and also can causes a significant economic burden, since generates the need for more drugs for minimize its effects and more time of hospitalization. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential action of natural (carvacrol) and synthetic compounds (carvacryl acetate) on the effects of intestinal mucositis. For this, the following strategies were used: CPT-11-induced intestinal mucositis to evaluate the action of the compounds on body mass variation, survival, total leukocytes number and blood bacterial load in mice. In addition, it was also evaluated the action of the compounds on histological and morphometric parameters. Moreover, markers of inflammation (MPO, COX-2, NF-κB and cytokines - IL-1β, TNF-α and KC) and oxidative stress (MDA, GSH and NOx) were quantified. It was also evaluated the possible interaction between the compounds and the TRPA1 receptor. Carvacrol and carvacryl acetate were found to have anti-inflammatory and protective actions against CPT-11-induced intestinal mucositis. It was also noted that the mechanisms of mucositis control through these compounds are associated with the TRPA1 receptor. Both compounds demonstrated promising action regarding improvement in clinical parameters, reduction of tissue damage and parameters indicative of inflammation and oxidative stress. Finally, these results demonstrated that carvacryl acetate apparently can be tolerated in higher doses, although resulting in similar action to carvacrol.

Keywords: Inflammation. Intestinal mucosa. Cytokines. Oxidative stress. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Mecanismo de ação de análogo da camptotecina sobre a replicação do DNA..... 19
Figura 02 – Estudos sobre as atividades biológicas atribuídas ao carvacrol..... 29
Figura 03 – Estudos sobre as atividades biológicas atribuídas ao acetato de carvacrolila..... 31

Capítulo I

Figura 01 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes EPO, quanto aos países de depósito dos pedidos de patente..... 40
Figura 02 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes EPO, quanto aos períodos ou anos de ocorrência dos depósitos dos pedidos de patente..... 41
Figura 03 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes EPO, quanto à CIP..... 42
Figura 04 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes WIPO, quanto aos países de depósito dos pedidos de patente..... 43
Figura 05 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes WIPO, quanto aos anos de ocorrência dos depósitos dos pedidos de patente..... 44
Figura 06 – Resultados retornados para a busca pelo termo 'carvacrol' na base de patentes WIPO, quanto à CIP..... 45

Capítulo II

Figura 01 – Chemical structure of carvacrol (C10H14O), a TRPA1 agonist..... 82
Figura 02 – Carvacrol effect on survival and body mass variation in mice……. 83
Figura 03 – Carvacrol effect on total leukocytes number per mm3 and blood bacterial load……... 84
Figura 04 – Photomicrographs from small intestinal mucosa (jejunum) stained with hematoxylin and eosin……... 85
Figura 05 – Villi height and crypt depth of small intestinal mucosa (jejunum)…. 87
Figura 06 – Carvacrol effect on MPO activity and cytokine levels……... 88
Figura 07 – Photomicrographs from immunohistochemical staining for NF-κB in small intestinal mucosa (jejunum)…… 89

Figura 08 – Photomicrographs from immunohistochemical staining for COX-2 in small intestinal mucosa (jejunum)…… 90
Figura 09 – Carvacrol effect on GSH, MDA and NOx levels…… 91
Figura 10 – Models of molecular docking of carvacrol acting on TRPA1…… 93

Capítulo III

Figura 1 – Chemical structure of carvacryl acetate and models of molecular docking of carvacryl acetate onto TRPA1…… 122
Figura 2 – Carvacryl acetate effect on survival and change in body mass in mice…….. 123
Figura 3 – Carvacryl acetate effect on total leukocytes number per mm^3 and blood bacterial load…… 124
Figura 4 – Photomicrographs from mouse jejunum mucosa stained with hematoxylin and eosin……..... 125
Figura 5 – Villi height and crypt depth of mouse jejunum mucosa……... 127
Figura 6 – The Na^+/K^+-ATPase activity in the mouse jejunum……. 128
Figura 7 – Photomicrographs from immunohistochemical staining for NF-κB in jejunum of mouse…… 129
Figura 8 – Photomicrographs from immunohistochemical staining for COX-2 in jejunum mucosa…….. 130

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE	anti-inflamatório não esteroidal
COX-2	cicloxigenase-2
CPT	camptotecinas
CPT-11	cloridrato de irinotecano
ERO	espécie reativa de oxigênio
FU	fluorouracil
GSH	glutationa reduzida
hCE-2	enzima carboxilesterase 2 humana
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-18	interleucina 18
IL-33	interleucina 33
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LV	leucovorin
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	malondialdeído
NF-κB	fator nuclear *kappa* B
NO	óxido nítrico
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TRP	receptor de potencial transitório
TRPA1	receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPC	receptor de potencial transitório canônico
TRPM	receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	receptor de potencial transitório mucolipina
TRPN	receptor de potencial transitório "*no mechanoreceptor potential* C"
TRPP	receptor de potencial transitório policistina
TRPV	receptor de potencial transitório vaniloide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 10
2 OBJETIVOS..... 13
3 REVISÃO DE LITERATURA..... 14
3.1 Intestino delgado: aspectos estruturais..... 14
3.2 Doenças inflamatórias gastrointestinais..... 17
3.3 Drogas antineoplásicas inibidoras de topoisomerase I..... 17
3.3.2 Cloridrato de irinotecano (CPT-11)..... 20
3.4 Mucosite do trato gastrointestinal..... 21
3.4.1 Mediadores inflamatórios e estresse oxidativo no curso da mucosite intestinal..... 25
3.5 Moduladores farmacológicos..... 27
3.5.1 Carvacrol..... 28
3.5.2 Acetato de carvacrolila..... 30
3.6 Receptor TRPA1..... 31
4 CAPÍTULO I..... 34
5 CAPÍTULO II..... 49
6 CAPÍTULO III..... 94
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 132
8 CONCLUSÃO..... 134
REFERÊNCIAS..... 135
APÊNDICES..... 152
APÊNDICE A..... 152
APÊNDICE B..... 153
ANEXOS..... 154
ANEXO A..... 154
ANEXO B..... 155
ANEXO C..... 156
ANEXO D..... 157

1 INTRODUÇÃO

Drogas antineoplásicas são agentes citotóxicos que possuem como alvo células com intensa e rápida proliferação, característica própria às células tumorais, induzindo processos de morte celular. Entretanto, como diversos tecidos também apresentam, em condições normais, processos vigorosos de proliferação celular, muitos tipos celulares ditos normais acabam também por ser afetados pela ação dos antineoplásicos, resultando, de modo finalístico, em dor, ulcerações e outras sequelas que afetam significativamente a morbidez em pacientes submetidos a tratamentos antitumorais (YEOH et al., 2006; CINAUSERO et al., 2017). Neste sentido, células constituintes da mucosa gastrointestinal, que possuem ciclos celulares curtos e, portanto, altas taxas de renovação celular (de 3 a 4 dias), sofrem de modo mais intenso os efeitos colaterais provocados pelas drogas antineoplásicas. Assim, em razão dos danos provocados na mucosa gastrointestinal, há influência sobre o prognóstico dos pacientes, acometidos por dores intensas, diminuição da ingesta de nutrientes e consequente aumento da necessidade de nutrição intravenosa ou parenteral, além do risco potencial de infecção sistêmica (SONG et al., 2013).

Como uma das principais drogas antineoplásicas atualmente utilizadas, tem-se o cloridrato de irinotecano (CPT-11), um sal tri-hidratado, análogo semissintético da camptotecina, substância isolada da planta *Camptotheca acuminata*, nativa da China. Estudos iniciais revelaram potente ação antitumoral da camptotecina, associada também a uma alta toxicidade, o que levou ao desenvolvimento de seu derivado CPT-11, menos tóxico (ALIMONTI et al., 2004; MARTINO et al., 2017). O CPT-11 é um inibidor seletivo da enzima topoisomerase I, que é responsável pela realização de rupturas na dupla hélice de DNA, evitando a replicação do mesmo e, consequentemente, bloqueando processos de divisão celular. Assim, enquanto agente antineoplásico, o CPT-11 vem sendo amplamente utilizado em protocolos de ação individual ou combinada com outras substâncias, para o tratamento de diversos tipos de tumores sólidos, a saber: em ovário, linfoma, pâncreas, mama, útero e, até mesmo, tumores colorretais metastáticos não responsivos a outras intervenções quimioterápicas (STRINGER et al., 2009; LIMA-JÚNIOR et al., 2012).

No que se refere, especificamente, aos danos sobre a mucosa gastrointestinal provocados por drogas antineoplásicas, ou simplesmente mucosite do trato alimentar, esta pode ocorrer de modo localizado ou global, acometendo desde a mucosa oral até

a mucosa intestinal. Assim, a mucosite intestinal é a síndrome resultante de profundas alterações morfológicas e fisiológicas ocorridas na mucosa do intestino delgado em razão da utilização de drogas antineoplásicas, embora também possa ser causada por radiação. A mucosite intestinal, além de ser causa direta de mortes ocasionais em tratamentos antitumorais, também causa significativo ônus econômico, já que gera a necessidade de uso de novos medicamentos que minimizem seus efeitos, como antibióticos, bem como pode, inclusive, gerar a necessidade de períodos mais prolongados de hospitalização, encarecendo o tratamento (MAYO et al., 2017).

Admite-se que a mucosite intestinal se desenvolva em fases após a exposição ao agente antitumoral, com consequente dano às células da mucosa intestinal, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs). Com isso, fatores de transcrição são ativados e desencadeiam o processo inflamatório. Com a amplificação deste processo em uma cascata inflamatória, há a ativação de metaloproteinases que, em última instância, serão as enzimas responsáveis pela destruição da arquitetura tecidual (YEOH et al., 2006; VILLA; SONIS, 2015). Com isso, apresentam-se as implicações clínicas da mucosite, a saber: perda de massa corpórea por má absorção dos nutrientes; diminuição da sobrevida em função da má nutrição e da recorrência de episódios de diarreia causada pelos agentes antineoplásicos; neutropenia. Embora a patofisiologia da mucosite oral, por exemplo, já tenha sido amplamente estudada, diversos aspectos relativos à mucosite intestinal ainda permanecem por ser esclarecidos (YEOH et al., 2006; CINAUSERO et al., 2017), como seus mecanismos de deflagração e controle, bem como a participação de receptores específicos nestes processos.

Assim, estudos que reportem estratégias de minimização dos efeitos da mucosite intestinal são imprescindíveis. Neste sentido, testes com novos compostos que apresentem atividade anti-inflamatória são os mais necessários. Tendo em vista isso, sabe-se que as plantas são uma importante fonte de novas substâncias químicas que apresentam algum potencial efeito terapêutico. Frequentemente, tais substâncias são extraídas de óleos essenciais de vegetais, como é o caso do carvacrol (2-metil-5-isopropilfenol), um monoterpeno fenólico constituinte dos óleos essenciais de inúmeras plantas aromáticas das famílias Lamiaceae (VINCENZI et al., 2004; DAMASCENO et al., 2014), Euphorbiaceae, Verbenaceae e Poaceae, especialmente em espécies dos gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymus*, *Thymbra*, *Acalypha*, *Lippia* e *Cymbopogon*, comumente utilizadas na medicina popular e aromaterapia (OLIVEIRA

et al., 2012). No que se refere à sua atividade biológica, já há evidência científica para atividade antimicrobiana, antitrombótica, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória do carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2014). Contudo, em função de sua natureza fenólica, o carvacrol apresenta considerável toxicidade. Assim, justifica-se o desenvolvimento de um derivado semissintético do carvacrol, o acetato de carvacrolila, com vistas à obtenção de um composto menos tóxico (DAMASCENO et al., 2014) e que se prestaria a intervenções farmacológicas, desde que comprovadas ações semelhantes às do carvacrol, como o potencial anti-inflamatório, por exemplo, aplicável à mucosite intestinal.

Tendo em vista a relevância da mucosite intestinal para o prognóstico dos pacientes, o maior risco de mortalidade e o ônus econômico associado ao seu tratamento, buscou-se investigar a ação anti-inflamatória e protetora do carvacrol e do acetato de carvacrolila neste modelo de inflamação intestinal induzida por CPT-11 em camundongos. Após o protocolo de indução da mucosite intestinal, amostras de sangue e segmentos do intestino delgado (jejuno) dos animais foram utilizadas na investigação de parâmetros hematológicos, histológicos, morfométricos, inflamatórios e de estresse oxidativo. Além disso, análises computacionais de docagem molecular e o uso de antagonista em ensaio *in vivo* permitiram a descrição em detalhe da ação dos compostos (carvacrol e acetato de carvacrolila) sobre canais de cálcio do tipo potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na mucosa intestinal.

Finalmente, os resultados deste trabalho encontram-se descritos em três capítulos, originados de artigos científicos publicados ou submetidos a periódicos nacionais e internacionais de ampla divulgação científica. Neste sentido, apresenta-se prospecção biotecnológica de informações que versam sobre descrições prévias e registros de patentes, em diversas bases de dados nacionais e internacionais, apontando alguma ação anti-inflamatória e protetora de compostos como carvacrol e acetato de carvacrolila. Além disso, admite-se que as evidências experimentais possam embasar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas, por exemplo, na administração de formulações contendo tais compostos.

2 OBJETIVOS

Considerando-se o que fora anteriormente exposto, objetivou-se neste trabalho verificar a ação anti-inflamatória e protetora desencadeada pelo carvacrol e pelo acetato de carvacrolila em modelo específico de indução da mucosite intestinal por CPT-11, com realização de estudo comparativo entre os eventuais efeitos decorrentes da ação de ambos os compostos. Neste sentido, as metas resumiram-se a:

a) registrar a sobrevida dos animais submetidos ao tratamento com carvacrol e acetato de carvacrolila, de modo a se verificar a ação dos compostos frente à mortalidade reconhecidamente causada pelo CPT-11;
b) avaliar a ocorrência de alteração da massa corpórea, do número total de leucócitos e do número de bactérias presentes no sangue dos animais tratados com carvacrol e acetato de carvacrolila, com vistas a se determinar eventual reversão da perda ponderal, leucopenia e bacteremia causadas pelo CPT-11;
c) descrever parâmetros histológicos e morfométricos, bem como quantificar parâmetros indicativos da ocorrência de processos inflamatórios (dosagem de mieloperoxidase, citocinas, fatores de transcrição e enzimas) após o tratamento com carvacrol e acetato de carvacrolila;
d) analisar parâmetros indicativos de estresse oxidativo (presença de grupamentos glutationa, ocorrência de peroxidação lipídica e dosagem de nitritos e nitratos);
e) compreender a participação dos receptores TRPA1 sobre o controle do processo inflamatório representado pela mucosite intestinal após o tratamento com carvacrol e acetato de carvacrolila, por meio da realização de estudos de docagem molecular e da modulação da atuação destes receptores com o uso de antagonista;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Intestino delgado: aspectos estruturais

O intestino delgado é a porção do trato gastrointestinal responsável por funções diversas, como digestão e absorção de macro- e micronutrientes, secreção endócrina, com a produção de hormônios regulatórios, além de apresentar propriedades imunes, o que o torna uma barreira contra agentes nocivos (DUNCAN; GRANT, 2003).

Apresenta-se como um tubo com extensão que pode variar, em humanos, de 6 a 7 m de comprimento, iniciando-se no piloro e culminando na válvula ileocecal. Anatomicamente, costuma ser dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno, sua porção mais proximal, está fixa ao retroperitônio no ângulo duodeno-jejunal, que representa a transição entre o duodeno e a segunda porção do intestino delgado, o jejuno. Este segundo segmento possui aproximadamente 2,5 m de comprimento e encontra-se suspenso na cavidade peritoneal por uma fina camada de mesentério aderido à parede abdominal posterior, posicionando-o, assim, no quadrante superior esquerdo abdominal (FELDMAN; FRIEDMAN; SLEISENGER, 2010). A observação interna de sua superfície luminal demonstra a existência de especializações anatômicas que contribuem para o aumento da área de superfície de absorção, como a presença de pregas mucosas e submucosas permanentes (*plicae circularis*). A transição para a terceira porção do intestino delgado, o íleo, embora não seja bem demarcada por estruturas anatômicas, pode ser verificada na região inferior direita do abdômen e pélvis. No íleo, as pregas mucosas e submucosas não se encontram mais presentes, sendo, entretanto, possível observar a presença de tecido linfoide, compondo as numerosos conglomerados linfomodulares ileais (VOLK; LACY, 2017).

Quanto à sua estrutura histológica, o intestino delgado é constituído por quatro camadas, a saber: mucosa, submucosa, muscular e adventícia (serosa). A mucosa do intestino delgado é a camada que reveste internamente a superfície luminal do órgão e que, portanto, sofrerá maior degradação da estrutura tecidual em função da administração de cloridrato de irinotecano (CPT-11), por exemplo. A camada mucosa pode ainda ser subdividida em outras três subcamadas: epitelial, lâmina própria e a muscular da mucosa (VOLK; LACY, 2017). A subcamada epitelial constitui-se em uma única camada de células que determina o lúmen intestinal. Imediatamente adjacente

a esta, encontra-se a lâmina própria, um tecido conjuntivo com redes vascular e linfática bem desenvolvidas, além de leucócitos abundantes, após a qual, segue-se a subcamada muscular da mucosa, constituída por poucas fibras musculares lisas (LUISSINT; PARKOS; NUSRAT, 2016; PELED; HANASH; JENQ, 2016).

A subcamada epitelial se organiza em projeções digitiformes denominadas vilos, com cerca de 0,5 a 1,5 mm de comprimento, os quais, internamente, apresentam intensa vascularização e disposição de componentes linfáticos, que se estendem desde a lâmina própria. Existem diferenças regionais quanto à aparência dos vilos ao longo de toda a extensão do intestino delgado. No duodeno, os vilos apresentam-se como protrusões semelhantes a folhas, enquanto que no jejuno, disporão da aparência digitiforme acima descrita e serão progressivamente encurtados até o íleo, o que, portanto, reflete as diferentes capacidades absortivas dessas regiões do órgão (MADARA; TRIER, 1994; DUNCAN; GRANT, 2003).

As células diferenciadas que compõem o epitélio dos vilos são periodicamente renovadas, isto é, sofrem *turnover*, sendo substituídas por células tronco progenitoras provenientes de invaginações adjacentes aos vilos, as criptas de Lieberkühn ou, simplesmente, criptas intestinais. As células tronco intestinais localizam-se na base das criptas, se diferenciam e migram verticalmente em direção à porção apical dos vilos, de modo a promover sua renovação tecidual, sendo, portanto, críticas para a homeostase e regeneração tecidual do intestino delgado após injúria (POTTEN et al., 2009; PELED; HANASH; JENQ, 2016; VOLK; LACY, 2017). Isto porque, as criptas intestinais são regiões proliferativas do intestino delgado responsáveis não apenas pela produção das células epiteliais que compõem a estrutura dos vilos, mas também pela renovação de diversos outros tipos celulares no intestino delgado (DUNCAN; GRANT, 2003), como células enteroendócrinas, células de Paneth, células caliciformes, células M (*microfold*) entre outras (PELED; HANASH; JENQ, 2016; VOLK; LACY, 2017).

Sabe-se que cada cripta intestinal possui, originalmente, de quatro a seis células-tronco, que se dividem uma vez ao dia, aumentando rapidamente o número de células-tronco filhas clonogênicas. Até a sua terceira geração, tais células-filhas retêm muitas características das células parentais e, assim, podem reconstituir o *pool* de células-tronco, caso haja dano ou perda nas criptas. Isto porque, o dano ao DNA das células-tronco as encaminha para a morte celular por apoptose, enquanto as células-filhas clonogênicas dispõem de capacidade de reparo do DNA. A partir da

quarta geração, estas células-filhas já se encontram comprometidas e passam a se diferenciar nas células epiteliais funcionais (DUNCAN; GRANT, 2003; POTTEN et al., 2009).

Tais células são os enterócitos, as principais células constituintes dos vilos e que correspondem ao tipo celular predominante no epitélio de revestimento da mucosa intestinal. Os enterócitos completamente diferenciados migram das criptas para compor toda a superfície dos vilos. Uma vez atingindo o ápice dos vilos, tais células são esfoliadas para o lúmen intestinal, um processo contínuo e que resulta em uma renovação do epitélio intestinal a cada 3-7 dias (MARSHMAN; BOOTH; POTTEN, 2002). Estão associados à função absortiva, característica deste órgão, além de desempenharem função de barreira. Cada enterócito possui aproximadamente 3.000 microvilosidades em sua porção da membrana plasmática voltada à superfície luminal e, em conjunto, tais microvilosidades comporão a borda em escova, frequentemente observada na superfície dos vilos intestinais. Assim, nota-se que, neste órgão, diversas são as especializações estruturais que objetivam um aumento na superfície de absorção de nutrientes, incluindo desde as pregas mucosas e submucosas até a presença de vilos e microvilosidades no epitélio intestinal. Em conjunto, tais especializações podem aumentar em até 600 vezes a superfície de absorção do intestino delgado (VOLK; LACY, 2017).

Outros tipos celulares presentes no epitélio intestinal também são muito relevantes, como as células caliciformes, que secretam muco e, assim, produzem uma barreira adicional para proteção do órgão, além de funcionar como lubrificante. As células de Paneth, localizadas na porção basal das criptas intestinais, são células exócrinas que secretam peptídeos antimicrobianos, servindo ao controle da microbiota intestinal, e também produzem fatores de crescimento necessários à proliferação e diferenciação das células progenitoras presentes nas criptas intestinais (SATO et al., 2011; PELED; HANASH; JENQ, 2016). Já as células enteroendócrinas representam apenas cerca de 1% da população celular, mas são responsáveis por produzir uma ampla variedade de hormônios, como gastrina, secretina, colecistocinina, enteroglucagon e peptídeo YY (WALSH, 1994; DUNCAN; GRANT, 2003).

3.2 Doenças inflamatórias gastrointestinais

As desordens gastrointestinais de natureza inflamatória afetam grupos distintos de indivíduos, de diferentes idades, sexo, raça e situação socioeconômica. Isto porque diversas podem ser tais doenças inflamatórias (esofagite, gastrite, mucosite do trato alimentar, além de doença de Chron, colite, síndrome do intestino irritável, entre outras) e, consequentemente, muitas podem ser suas causas, levando ao acometimento de diferentes órgãos. Assim, estudos que importem no desenvolvimento de estratégias de tratamento para tais doenças são duplamente relevantes, primeiro, porque o impacto econômico do tratamento destas doenças para os serviços de saúde é sempre muito grande, e também porque tais doenças afetam seriamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (LACY et al., 2016).

Estudos têm demonstrado uma tendência mundial para o aumento da incidência de doenças inflamatórias que acometem o intestino delgado, especialmente em países em desenvolvimento (CAMBUI; NATALI, 2015). Metanálises sugerem que a prevalência mundial de tais doenças pode variar entre 10% e 25%, com alguns países apresentando prevalências mais baixas (como a África do Sul, em 4,2%) e em outros locais, como países da América do Sul, notam-se maiores prevalências, em cerca de 21% (ALOSAIMIA; ALI; RAZZAK, 2016).

Além da prevalência, do ônus econômico e da perda em qualidade de vida aos pacientes, doenças de natureza inflamatória que acometem o intestino delgado são também relevantes, pois incluem alterações na histoarquitetura da mucosa (DROSSMAN, 2016). Neste trabalho, enfoca-se a mucosite intestinal e os detalhes sobre sua deflagração serão abordados no item 3.4. Entretanto, para se compreender seus efeitos sobre a estrutura e função do intestino delgado, faz-se necessária a abordagem sobre seus fatores desencadeantes, especialmente as drogas antineoplásicas inibidoras de topoisomerase I, grupo de fármacos em que se inclui o cloridrato de irinotecano (CPT-11).

3.3 Drogas antineoplásicas inibidoras de topoisomerase I

Alguns compostos de origem natural têm sido identificados como possuidores de propriedades antineoplásicas, tendo em vista sua ação inibitória sobre a enzima topoisomerase I. Tais compostos, coletivamente descritos como camptotecinas, são

alcaloides que ocorrem em plantas de diferentes gêneros, como *Camptotheca acuminata*, nativa da China e do Tibete, *Nothapodytes nimmoniana*, *N. foetida*, *Tabernaemontana heyneana*, *Chonemorpha grandiflora*, *Ophiorrhiza pumila* e *O. rugosa* (MASUDA; KUDOH; FUKUOKA, 1996; MARTINO et al., 2016).

Há mais de 50 anos, o primeiro destes compostos, 20-(S)-camptotecina (CPT), foi identificado e isolado da planta *C. acuminata*, durante estratégias de *screening* que objetivavam a descoberta de novos compostos com propriedades esteroides (WALL et al., 1966). Nesta ocasião, observou-se que o extrato obtido da planta demonstrava uma relevante atividade antitumoral em testes *in vitro*, bem como em um modelo de leucemia murina. Estes achados estavam em concordância com conhecimentos da tradicional medicina chinesa que apontava o uso da planta *C. acuminata* em preparações naturais contra o câncer (MARTINO et al., 2016).

Recentemente, o conhecimento sobre a bioquímica da enzima topoisomerase, além dos avanços nas áreas da Genética e Biologia Molecular, permitiram uma ampliação no conhecimento acerca da atuação dos inibidores desta enzima. Além disso, muitos estudos pré-clínicos e clínicos vêm sendo realizados e também contribuíram para o entendimento da ação antitumoral das camptotecinas. Com isso, percebeu-se que CPT apresentava limitações quanto ao seu uso clínico, como a baixa estabilidade da molécula e os problemas enfrentados quanto à sua solubilidade. Isso fomentou o desenvolvimento de análogos que objetivam a superação de tais obstáculos ao seu uso clínico por meio do emprego de cátions de amina terciária (compostos orgânicos nitrogenados derivados da amônia que apresentam um par de elétrons livres). Atualmente, os seguintes análogos vêm sendo investigados quanto ao uso em terapias antineoplásicas individuais ou combinadas: topotecano, irinotecano (CPT-11), 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, belotecano e lurtotecano (GI 147211C, GG211) (DANCEY; EISENHAUER, 1996; VENDITTO; SIMANEK, 2010; MARTINO et al., 2017).

De modo a se compreender a ação biológica das camptotecinas, deve-se conhecer a enzima alvo de sua atuação. As topoisomerases, tipo I e tipo II, são enzimas nucleares que modulam a estrutura tridimensional do DNA, resolvendo problemas conformacionais e topológicos, induzindo quebras transitórias que irão determinar a perda da estrutura em hélice, típica do DNA, durante os processos de replicação, transcrição e recombinação do mesmo (GELLERT, 1981; CUYA; BJORNSTI; VAN WAARDENBURG, 2017). De modo mais específico, a

topoisomerase I humana é uma proteína monomérica de 100 kDa que desestrutura a dupla hélice de DNA, realizando quebras transitórias em uma das fitas de DNA, eventualmente, relaxando estruturas em super-hélice durante a duplicação ou a transcrição, facilitando-se, assim, o progresso da forquilha de replicação (DANCEY; EISENHAUER, 1996; MASUDA; KUDOH; FUKUOKA, 1996; PIZZOLATO; SALTZ, 2003; CUYA; BJORNSTI; VAN WAARDENBURG, 2017).

Estudos têm demonstrado que as camptotecinas estabelecem interações formando um complexo estável com a enzima topoisomerase I e o DNA após a clivagem do mesmo, impedindo sua liberação. Assim, a subsequente interação entre a forquilha de replicação no DNA e o complexo estável resultará na interrupção da replicação e a formação de quebras em ambas as fitas de DNA (Figura 01). Este processo causará a ativação de endonucleases, desencadeando a completa fragmentação do DNA e, finalmente, morte celular, pela ativação de caspases. A inibição da ativação das caspases pode, posteriormente, também desencadear morte celular por necrose (DANCEY; EISENHAUER, 1996; PIZZOLATO; SALTZ, 2003; MARTINO et al., 2017).

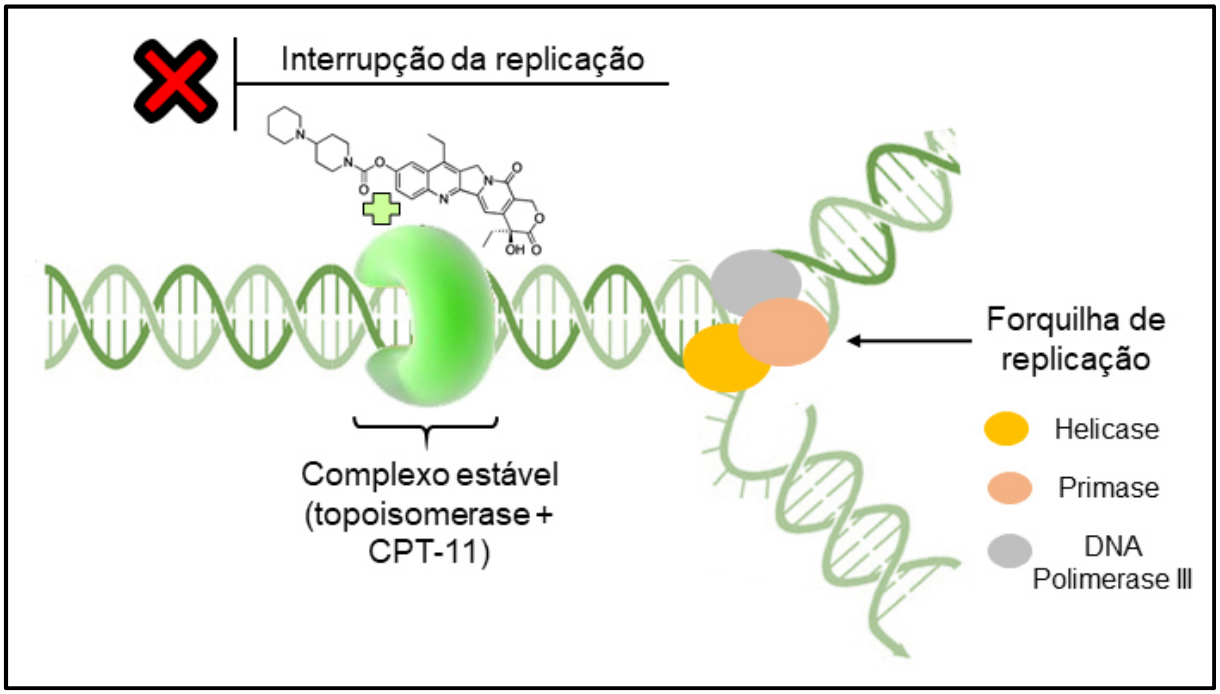


Figura 01: Proposta de mecanismo de ação de análogo da camptotecina sobre a replicação do DNA. Adaptado de: Oliveira et al., 2012; Alagawany et al., 2015; Suntres; Coccimiglio; Alipour et al., 2015.

Desta forma, percebe-se que a atividade antineoplásica das camptotecinas depende, invariavelmente, da expressão da topoisomerase I e dos processos de replicação do DNA que ocorrem na fase de síntese (S) do ciclo celular. Comparados aos tecidos normais, foram identificados níveis significativamente maiores de expressão de topoisomerase I em alguns tipos de tumores, como em adenocarcinoma de cólon, no ovário e esôfago, além de cultivos de linfoma não-Hodgkin e células leucêmicas, o que os torna mais sensíveis à ação citototóxica das camptotecinas. (MADDEN; CHAMPOUX, 1992; POTMESIL, 1994; DANCEY; EISENHAUER, 1996; PIZZOLATO; SALTZ, 2003).

3.3.2 Cloridrato de irinotecano (CPT-11)

O cloridrato de irinotecano (CPT-11), 7-etil-10-(4-[1-piperidino]-l-piperidino)metil-10-hidroxicamptotecina, foi o primeiro análogo de CPT solúvel em água a ser desenvolvido. O CPT-11, um sal tri-hidratado, é um pró-fármaco, de ação limitada, que é convertido à sua forma mais ativa, o metabólito SN-38, no plasma, no fígado, intestino e tecidos tumorais, por meio de uma reação de esterificação realizada pela enzima carboxilesterase 2 (hCE-2) (DANCEY; EISENHAUER, 1996; MARTINO et al., 2017). Este metabólito tóxico, até mil vezes mais ativo que o CPT-11, agora estará presente em altas concentrações no fígado e, com isso, conclui sua via metabólica por ação da enzima UDP-glicuroniltransferase, tornando-se SN-38G (glicuronídeo). SN-38G, que é menos tóxico, é transportado ao intestino durante o processo de secreção da bile, sendo hidrolisado por ação da enzima β-glicuronidase produzida pelos microrganismos entéricos, voltando à forma SN-38, mais tóxica. Assim, parte do SN-38G será eliminado com as fezes e parte será reabsorvida no sangue (ALIMONTI et al., 2004; TAKASUNA et al., 2006; VENDITTO; SIMANEK, 2010; MAYO et al., 2017).

Desde a década de 1990, o CPT-11 vem sendo empregado no tratamento de carcinoma colorretal metastático recorrente ou que progrediu mesmo após quimioterapia padrão. O CPT-11 também tem sido administrado em protocolos quimioterápicos em associação ao fluorouracil (FU) e leucovorin (LV) em tumores colorretais metastáticos ou ainda em terapias contra tumores pulmonares, no estômago, no colo uterino, cérebro, ovário e pâncreas (ALIMONTI et al., 2004; MARTINO et al., 2017). Além disso, o CPT-11 também se mostrou eficaz contra

tumores humanos enxertados em camundongos de linhagens imunodeficientes, como o adenocarcinoma de cólon (Co-4), carcinoma mamário (MX-1), adenocarcinoma gástrico (St-15 e SC-6) e carcinoma de células escamosas (QG-56) (MASUDA; KUDOH; FUKUOKA, 1996)

Embora eficaz nos tratamentos antitumorais, o CPT-11 é conhecido por desencadear dano à mucosa intestinal, em função da exposição cumulativa e contínua, durante o tratamento, ao SN-38, que induzirá degradação do epitélio intestinal, atrasos no ciclo celular das células das criptas intestinais e aumento da apoptose, efeitos característicos da mucosite intestinal, conforme abordado adiante no item 3.4. Finalmente, com a diminuição drástica da capacidade absortiva do intestino, responsabiliza-se o CPT-11 pela diarreia induzida por quimioterápico (ANTHONY, 2007). A diarreia é um dos principais efeitos adversos associados ao tratamento com CPT-11, e pode ocorrer no início ou no final do tratamento. Outros efeitos adversos do CPT-11 incluem alopecia, fadiga, erupções cutâneas e mielossupressão (DANCEY; EISENHAUER, 1996; PIZZOLATO; SALTZ, 2003; ALIMONTI et al., 2004; MARTINO et al., 2017).

3.4 Mucosite do trato gastrointestinal

A mucosite do trato alimentar ou do trato gastrointestinal é uma síndrome clínica oriunda de alterações morfológicas e fisiológicas da mucosa gastrointestinal, desencadeada pela alta toxicidade de agentes antineoplásicos, como substâncias quimioterápicas e radioterapia. A mucosite do trato gastrointestinal é frequentemente classificada em mucosite oral, quando afeta a mucosa nas regiões da boca e esôfago, que apresentam epitélio estratificado pavimentoso; e mucosite gastrointestinal, quando afeta os sítios remanescentes do trato gastrointestinal, que apresentam epitélio colunar (GIBSON et al., 2007; MAYO et al., 2017).

Os principais alvos de agentes antineoplásicos são células com alta capacidade proliferativa, tais como as células tumorais. Entretanto, outros tecidos no organismo podem apresentar células com grande capacidade de divisão celular, como a mucosa que limita internamente o trato gastrointestinal. Assim, a ação tóxica dos antineoplásicos, acaba por desencadear a ruptura da barreira mucosa do trato gastrointestinal, resultando em dor e ulcerações severas, principalmente na cavidade oral e no intestino delgado, neste caso, desencadeando a mucosite oral e a mucosite

intestinal, respectivamente. No intestino delgado, essa condição colabora para o aumento do risco de infecções, com a passagem de bactérias para a circulação sistêmica, e culmina em diarreia, pelo desbalanço entre os processos de secreção e absorção, o que é causa de significativa morbidade (SONIS, 2004a; YEOH et al., 2006; VAN SEBILLE et al., 2015).

A mucosite intestinal não apenas aumenta a morbidade, como também é causa indireta de mortes ocasionais durante o tratamento quimioterápico, por comprometer a dosagem necessária para a erradicação dos tumores. A mucosite também induz sofrimento e interfere com funções fisiológicas básicas, já que causa náuseas e vômitos, constipação, aumento da frequência e urgência para defecação, sangramento retal, incontinência fecal, má nutrição, infecção, sepse, desidratação e fadiga, além de interferir com a produção de hormônios, em função da destruição das células enteroendócrinas (YEOH et al., 1998; RUBENSTEIN et al., 2004; CINAUSERO et al., 2017). Além disso, a mucosite intestinal acaba por incorrer em significativo custo econômico, porque frequentemente exigirá a prescrição de medicamentos, como antibióticos e, em casos mais severos, aumento no período de hospitalização, durante o qual a administração parenteral de fluidos e nutrientes será necessária, além de medicação contra a dor e mais antibióticos (KEEFE et al., 2004; YEOH et al., 2006; BOWEN; GIBSON; KEEFE et al., 2011; MAYO et al., 2017).

Frequentemente, a quimioterapia, com o uso do CPT-11, por exemplo, gera efeitos citotóxicos também sistêmicos, enquanto a radioterapia culmina em efeitos citotóxicos locais. Assim, o desenvolvimento e a extensão do dano causado pela mucosite dependerá do tipo de tratamento empregado, já que a quimioterapia sistêmica tende a provocar danos de forma breve, porém intensa e generalizada ao longo de todo o trato gastrointestinal (KEEFE et al., 2004; YEOH et al., 2006; CINAUSERO et al., 2017).

Do ponto de vista histológico, a mucosite intestinal se caracteriza por um aumento na proporção de morte celular por apoptose das células da cripta e, com isso, hipoplasia das criptas, atrofia dos vilos, perda excessiva de células epiteliais, necrose, inflamação e secreção excessiva de muco (GIBSON et al., 2003; VAN SEBILLE et al., 2015). Neste sentido, pode-se estabelecer didaticamente o progresso da mucosite intestinal em cinco fases bem definidas: iniciação, ativação, amplificação, ulceração e cicatrização (SONIS, 2004b; VAN SEBILLE et al., 2015).

A fase de iniciação ocorre imediatamente após a exposição do tecido a agentes citotóxicos, como o CPT-11. O dano ao DNA e às demais estruturas celulares iniciam-se com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SONIS, 2004b). Os quimioterápicos e radioterápicos interferem com o metabolismo celular no epitélio, já que impedem a síntese ou causam danos ao DNA por meio das EROs. As células presentes nas criptas intestinais são particularmente afetadas, com inibição de mitoses, e impedimento das interações célula-célula e destas com a matriz extracelular. Admite-se que este fato esteja relacionado ao influxo de células imunes e componentes da resposta inflamatória para o sítio da lesão (DUNCAN; GRANT, 2003; YEOH et al., 2006; AL-DASOOQI et al., 2013).

A ativação, é a fase em que, admite-se, o fator nuclear kappa B (NF-κB) exerça papel efetor. Nesta segunda fase, as quebras na dupla hélice de DNA resultam na ativação de muitas vias de transdução de sinais que ativam fatores de transcrição, como NF-κB e p53 (SONIS, 2004b; AL-DASOOQI et al., 2013). Nesta fase, a divisão celular é interrompida dentro de poucas horas após o início da quimioterapia e segue-se ao aumento da apoptose em até 24 h. Isto leva a uma progressiva perda das células das criptas e também da superfície absortiva, culminando no colapso da estrutura tecidual das criptas e dos vilos dentro de 2 a 4 dias (KEEFE et al., 2000). A ativação de NF-κB também pode se dar por ação direta de agentes quimioterápicos ou EROs, o que desencadeará a transcrição de cerca de outros 200 genes associados à deflagração da mucosite, como genes associados à expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6 (SONIS, 2004b; DUNCAN; GRANT, 2003; YEOH et al., 2006; AL-DASOOQI et al., 2013).

Na fase de amplificação, as citocinas produzidas na fase anterior amplificam o sinal primário ou ativam NF-κB de modo a amplificar a via de sinalização, o que resulta na transcrição de genes como o da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e cicloxigenase-2 (COX-2). COX-2 exerce papel fundamental na iniciação da cascata inflamatória e sinalização para a ativação de metaloproteinases (MMPs) da matriz extracelular. Todos esses processos levarão à destruição tecidual e ruptura da barreira mucosa (SONIS, 2004b; YEOH et al., 2006).

Então, na fase ulcerativa, que normalmente se inicia após uma semana de quimioterapia, ocorre a perda do epitélio e aumento da exsudação, levando ao desenvolvimento de úlceras, o que expõe as terminações nervosas, levando à dor.

Nesta fase também ocorre a colonização da mucosa lesada por bactérias Gram-negativas e leveduras, além da neutropenia (SONIS, 2004b; YEOH et al., 2006).

Finalmente, ocorre a fase de cicatrização em que, eventualmente, a mucosite se resolverá quando a quimioterapia tiver cessado, por meio da reconstituição do epitélio na mucosa intestinal. A duração da fase de cicatrização irá depender de fatores, como a taxa de proliferação epitelial, recuperação hematopoiética, restabelecimento da microbiota local, além da ausência de outros fatores que interfiram com o processo de cicatrização, como infecções e agentes irritantes (SONIS, 2004b; YEOH et al., 2006). Assim, o aumento da proliferação celular no epitélio irá contribuir gradualmente para a recuperação funcional e para o aumento no número de criptas, ao que se seguirá a recomposição estrutural e funcional dos vilos em até uma semana (DUNCAN; GRANT, 2003).

A incidência de mucosite se dá em proporções variáveis, ocorrendo em 5 a 15% dos pacientes submetidos a protocolos quimioterápicos padrão (JONES et al., 2006). Os fatores que mais comumente predispõem os pacientes ao desenvolvimento da mucosite intestinal podem ser a situação do sistema imunológico, níveis endógenos elevados de citocinas pró-inflamatórias e a presença de patógenos. Fatores secundários, muitas vezes desencadeados após o início da quimioterapia, como o mau funcionamento do intestino e a inflamação localizada também tendem a favorecer o desenvolvimento da mucosite (DUNCAN; GRANT, 2003). Além disso, estudos reportam que o CPT-11 altera a microflora intestinal, quantitativamente e qualitativamente, cerca de 72 h após o início do tratamento, atuando, principalmente sobre as bactérias produtoras de β-glicuronidase, incluindo *Escherichia coli* (STRINGER et al., 2007, 2008, 2009). Sabe-se que alterações no ambiente luminal do trato gastrointestinal, especialmente no intestino delgado, resultam em alterações, entre outras funções, nos padrões de absorção de nutrientes. Tais alterações na absorção e na composição da microflora intestinal também levam a alterações na composição fecal, o que sugere que esta exerça papel fundamental no desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos, como o CPT-11 (GEIBEL, 2005; STRINGER et al., 2009).

Poucas são as opções de terapia medicamentosa contra a mucosite intestinal. Frequentemente, os efeitos da mucosite intestinal induzida por CPT-11 são tratados com o uso de agentes anticolinérgicos e antidiarreicos, além de agonistas opioides, como a loperamida e o difenoxilato (VAN SEBILLE et al., 2015; MAYO et al., 2017).

Além disso, também são utilizados antibióticos e analgésicos (MAYO et al., 2017), bem como octreotide, acetorfan, glutamina, budesonida, ciclosporina e, ainda, faz-se uso da alcalinização do lúmen intestinal (LIMA-JÚNIOR et al., 2012; LEE; RYAN; DOHERTY, 2014). Ademais desses medicamentos, realiza-se a reidratação e recomposição de eletrólitos, bem como faz-se uso de agentes farmacológicos que reduzem a perda de fluidos ou diminuem a motilidade intestinal (DAVILA; BRESALIER, 2008; CINAUSERO et al., 2017).

Outras estratégias vêm sendo estudadas objetivando-se o desenvolvimento de novas terapias contra a mucosite intestinal. O zinco, por exemplo, é um elemento essencial aos processos de reparação tecidual e, em vista disso, vem sendo estudado quanto ao uso contra a mucosite intestinal, dado seu efeito antioxidante, sua associação com processos de proliferação epitelial e síntese de matriz extracelular (LALLA et al., 2014). Já a proteína R-espondina 1, que modula a via Wnt/β catenina, com funções na regeneração epitelial e crescimento, vem sendo apontada como potencial alvo terapêutico para a mucosite intestinal (BHANJA et al., 2009; WARDILL; BOWEN; GIBSON, 2014). O hidrocloreto de benzidamina é um anti-inflamatório não esteroidal com propriedades analgésicas, anestésicas e antimicrobianas e vem sendo apontado como possível agente redutor da mucosite pela supressão de citocinas pró-inflamatórias (LOGAN et al., 2008). Probióticos contendo *Lactobacillus* spp. estão também emergindo como potenciais agentes efetores contra a diarreia, frequente durante a mucosite intestinal (ABD EL-ATTI et al., 2009; VAN SEBILLE et al., 2015).

3.4.1 Mediadores inflamatórios e estresse oxidativo no curso da mucosite intestinal

Estudos mostram que após tratamento com CPT-11 ocorre aumento dos níveis de mieloperoxidase na mucosa intestinal, demonstrando a relação entre o dano à mucosa e o aumento da infiltração neutrofílica, o que, portanto, confirma a ocorrência de uma fase inflamatória durante o curso da mucosite intestinal (SONIS, 2004b). A migração de neutrófilos para o sítio da lesão durante a fase inflamatória da mucosite intestinal representa um componente central da resposta imune, servindo ao desencadeamento de processos como fagocitose, produção de EROs e a liberação de mediadores inflamatórios (REAVES; CHIN; PARKOS, 2005; MELO et al., 2008; KWON, 2016).

Tais mediadores inflamatórios podem ser citocinas, fatores de transcrição e enzimas. No que se refere aos fatores de transcrição que atuam como mediadores inflamatórios, pode-se destacar a ação do NF-κB, que vem sendo apontado como elemento fundamental no desenvolvimento da mucosite (SONIS, 2002; KWON, 2016).

O fator de transcrição NF-κB é relevante, pois sua ação pode ser ativada por agentes quimioterápicos e este fator está associado à ativação da transcrição de aproximadamente outros 200 genes. Especificamente no contexto do desencadeamento da mucosite intestinal, ele é responsável pela ativação da transcrição do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL-6, que colaboram para o desencadeamento da apoptose nas criptas e demais etapas da deflagração da mucosite (LOGAN et al., 2008; KWON, 2016). Além disso, NF-κB está associado com a ativação da transcrição de genes, como o da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (SONIS, 2002; YEOH et al., 2005; AL-DASOOQI et al., 2013).

As ciclo-oxigenases (COX) são enzimas que catalisam reações relativas ao metabolismo do ácido araquidônico para produção de prostaglandinas. Tais enzimas regulam muitas funções fisiológicas, algumas associadas à toxicidade de agentes quimioterápicos (TRIFAN et al., 2002). As COX são expressas em três isoformas (COX-1, COX-2 e COX-3), e a COX-2 costuma estar mais ativa em situações de exacerbação de processos inflamatórios, como nota-se na mucosite intestinal. Nesse sentido, estudos mostram que o uso de alguns agentes anti-inflamatórios para inibir a ação de COX-2 acaba por reduzir a severidade dos efeitos adversos do uso de CPT-11 e aumentar a sobrevida ao tratamento em modelos de mucosite intestinal (TRIFAN et al., 2002; RIBEIRO et al., 2016).

A citocina TNF-α tem sido associada à estimulação inicial para o dano ao tecido conjuntivo, contribuindo para a redução da oxigenação do epitélio e, consequentemente, para a morte celular, além de alterar o padrão de glicosilação de mucinas produzidas pelas células caliciformes, modificando a produção de muco no intestino delgado (YEOH et al., 2005; LIMA-JÚNIOR et al., 2012).

A participação de algumas destas citocinas no desenvolvimento da mucosite intestinal tem sido confirmada por meio de estudos que revelaram, por exemplo, que a modulação farmacológica de IL-1β por um antagonista do receptor de IL-1 reduziu significativamente o dano e a inflamação em modelo de mucosite intestinal (ARIFA et al., 2014). Há, ainda, indicativos de que o bloqueio farmacológico ou deleção genética

de IL-18 aumentam a sobrevida, reduzem o dano tecidual e a inflamação local, melhorando parâmetros como a contratilidade e a ocorrência de diarreia (LIMA-JÚNIOR et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016). Associa-se também a liberação de IL-33 com o dano em células epiteliais produzido pelo CPT-11 em modelo de mucosite, contribuindo para recrutamento de neutrófilos e translocação bacteriana (GUABIRABA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

Sabe-se que algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e TNF-α, podem ativar a expressão da forma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), contribuindo, assim, com a síntese de óxido nítrico (NO) (YIP et al., 2008). Este, atuando como agente desencadeador de estresse oxidativo nas células, pode impulsionar a inflamação e a injúria tecidual produzida por antineoplásicos, além de estar implicado com desordens funcionais gastrointestinais (LEITÃO et al., 2007; LIMA-JÚNIOR et al., 2012). Os danos teciduais que ocorrem durante a mucosite intestinal também podem estar associados a um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, como o malondialdeído (MDA), resultante do dano oxidativo em membranas biológicas. Além disso, também pode ser associado ao dano tecidual da mucosite intestinal uma diminuição de agentes antioxidantes celulares, como a glutationa reduzida (GSH), que provê proteção contra o dano oxidativo, já que participa do sistema celular de defesa contra tais danos (ROSS, 1988; EL-GHAZALY; EL-HAZEK; KHAYYAL, 2015).

3.5 Moduladores farmacológicos

Há milênios as plantas medicinais têm se mostrado uma fonte valiosa para a prospecção de agentes terapêuticos e, mesmo atualmente, muitos fármacos ainda têm sido desenvolvidos com base em produtos de origem natural ou de seus derivados. No que se refere especificamente às pesquisas envolvendo o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios, diversos estudos têm apontado que os produtos de origem natural quase sempre representam uma fonte promissora de inibidores da produção de citocinas (LIMA et al., 2013). Entretanto, como muitos podem ser os entraves e dificuldades no desenvolvimento de fármacos baseados em produtos de origem natural, as abordagens farmacológicas têm centrado seus esforços na pesquisa de compostos sintéticos (ATANASOV et al., 2015).

Neste sentido, o carvacrol e o acetato de carvacrolila surgem como exemplos dessa abordagem em pesquisa farmacológica, haja vista a origem natural do carvacrol e a produção de um composto semissintético baseado nele, o acetato de carvacrolila.

3.5.1 Carvacrol

Carvacrol (2-Metil-5-(1-metiletil)-fenol), um isômero do timol (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR et al., 2015), é um monoterpeno fenólico líquido, predominantemente encontrado nos óleos essenciais de plantas das famílias Labiatae, Lamiaceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae e Poaceae. Mais comumente, o carvacrol pode ser extraído de plantas como o orégano (*Origanum vulgare*), o tomilho (*Thymus vulgaris*) e uma variedade de pimenta amarela aparentada à mostarda (*Lepidium flavum*), espécies de uso generalizado na medicina popular e aromaterapia (OLIVEIRA et al., 2012; ALAGAWANY et al., 2015).

Além de seu isolamento, a partir dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas, o carvacrol também pode ser obtido por síntese química e biotecnológica. Quanto à síntese química, os métodos utilizados incluem a sulfonação de para-cimeno seguida de fusão alcalina, cloração de alfa-pineno com hipoclorito de terc-butila ou a aromatização de carvona na presença de ácido sulfúrico com um catalisador ácido sólido eficiente (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR et al., 2015). Já a síntese biotecnológica, pode ser realizada por meio da utilização de microrganismos geneticamente modificados, especializados em sua produção (MORE et al., 2007). O carvacrol extraído a partir de óleos essenciais do tomilho pode apresentar um rendimento muito variável, de 5 a 98% (LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2008; ALAGAWANY et al., 2015; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR et al., 2015).

Após extração ou síntese, o carvacrol apresenta densidade variando entre 0,976g/cm^3 a 20°C e 0,975g/cm^3 a 25°C, seu ponto de ebulição é 237~238°C e seu ponto de fusão é 1ºC. Além disso, o carvacrol é um composto altamente lipofílico, portanto insolúvel em água, mas altamente solúvel em tetracloreto de carbono, etanol, éter dietílico e acetona (ALAGAWANY et al., 2015).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* vem descrevendo diferentes ações biológicas para o carvacrol, como sua ação antiviral, antisséptica, como promotor de crescimento, ou sua capacidade expectorante (LUNA et al., 2010; HASHEMIPOUR et

al., 2013; BRAVO et al., 2014; GILLING et al., 2014), além de outras ações descritas na Figura 02.



Figura 02: Estudos sobre as atividades biológicas atribuídas ao carvacrol. Adaptado de: Oliveira et al., 2012; Alagawany et al., 2015; Suntres; Coccimiglio; Alipour et al., 2015.

Como uma das principais ações biológicas do carvacrol, pode-se mencionar sua propriedade antioxidante, o que o torna um composto promissor na pesquisa farmacológica, tendo em vista seu potencial protetor sobre os tecidos. Neste sentido, o carvacrol atua reduzindo a peroxidação lipídica e, consequentemente, o dano tecidual pela degradação oxidativa das membranas das células, além de também agir diminuindo a produção de radicais livres que contribuiriam para a apoptose (YANISHLIEVA et al., 1999; ALAGAWANY et al., 2015). Alguns estudos asseguram que a eficiência do carvacrol na eliminação de radicais livres, como o óxido nítrico e os radicais superóxidos, podem estar associados à presença do grupamento hidroxila ligado a um anel aromático em sua estrutura química, o que, supostamente, facilitaria a associação entre o carvacrol e os radicais livres (GUIMARÃES et al., 2010; ALAGAWANY et al., 2015; ARISTATILE et al., 2015).

Embora já haja um razoável volume de informações acerca das atividades biológicas do carvacrol, pouco é sabido sobre sua toxicologia. Estudos reportam que

a dose letal média de carvacrol para ratos seria de 810 mg/kg de massa corpórea, quando administrado por via oral, enquanto a dose letal média de carvacrol administrado por via intravenosa ou intraperitoneal em camundongos seria de, respectivamente, 80 e 73 mg/kg de massa corporal (ANDERSEN, 2006; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR et al., 2015).

3.5.2 Acetato de carvacrolila

O acetato de carvacrolila (5-isopropil-2-metilfenil acetato) é um éster monoterpênico, que apresenta ponto de ebulição em 247ºC e densidade de 0,994 g/cm^3. Mais comumente, é obtido por meio de síntese química realizando-se a acetilação do carvacrol, com anidrido acético como agente acilante e piridina como catalizador. Entretanto, além de ser sintetizado quimicamente com pureza de até 98%, o acetato de carvacrolila também pode ser obtido, em menores proporções, a partir de óleos essenciais de plantas como *Mosia chinensis*, *Thymus caespititius*, *Thymus spathulifolius* (CAO et al., 2009; UFPI, 2013).

Como o carvacrol, assim como os demais fenois, costuma apresentar maior toxicidade do que os ésteres, a síntese química do acetato de carvacrolila mostrou-se uma boa alternativa, objetivando-se a obtenção de um derivado do carvacrol com perfil de atuação farmacológica semelhante ou superior e que também apresentasse uma menor toxicidade. Com isso, admite-se que a presença de um grupamento éster, em lugar de um grupamento hidroxila presente na estrutura molecular do carvacrol, possa conferir ao acetato de carvacrolila maior segurança e eficácia, se comparado ao carvacrol (DAMASCENO et al., 2014). Sabe-se também que a adição do grupamento éster à molécula do acetato de carvacrolila também lhe conferiu um adicional caráter lipofílico, em comparação ao carvacrol (PIRES et al., 2014).

Estudos também têm demonstrado que substâncias acetiladas, em substituição a grupamentos hidroxila, tendem a apresentar menor toxicidade e ações biológicas semelhantes aos compostos que tiveram a estrutura modificada (MORAIS et al., 2014; ANDRE et al., 2016). No acetato de carvacrolila, os três hidrogênios benzílicos e os três α-hidrogênios presentes em sua estrutura molecular podem servir, inclusive, como sítios de ligação para radicais livres, o que, em parte, corrobora a tese de menor toxicidade apresentada por este composto em comparação ao carvacrol (PIRES et al., 2014).

Diferentemente do carvacrol, as atividades biológicas do acetato de carvacrolila ainda não foram extensamente estudadas e claramente definidas. Entretanto, alguns estudos *in vivo* já realizados encontram-se destacados na Figura 03.

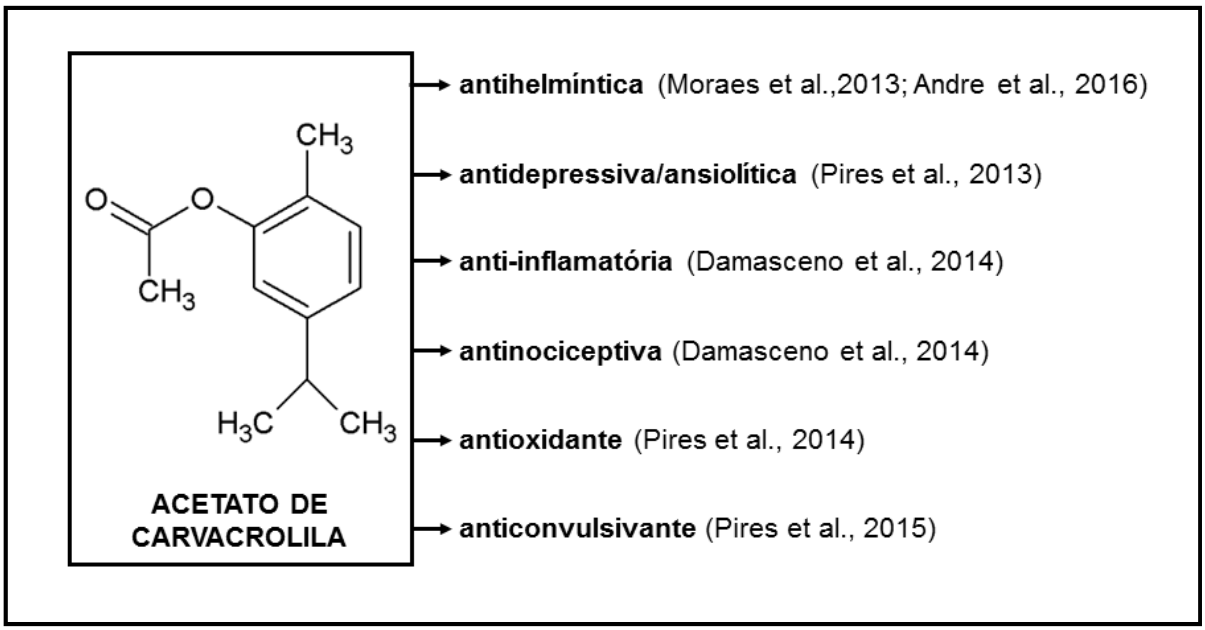


Figura 03: Estudos sobre as atividades biológicas atribuídas ao acetato de carvacrolila.

Como poucos são os estudos explorando as potencialidades do acetato de carvacrolila, tornam-se relevantes mais pesquisas que busquem descrever as ações biológicas do composto, tornando-o promissor na pesquisa farmacológica.

3.6 Receptor TRPA1

A superfamília dos receptores canais de cátion de potencial transitório (TRP) compreende 28 proteínas sensoriais que são expressas na maioria das células e tecidos animais e exercem funções relevantes para a manutenção da homeostase. Os receptores TRPs encontram-se classificados em sete subfamílias: TRPC (canônica), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPN (NOMP-C) e TRPA (anquirina), dispondo esta última de um único representante (NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012; COHEN; MOISEENKOVA-BELL, 2014).

O canal de cátion da subfamília anquirina (TRPA1) é uma proteína sensorial para sinalização de dano celular e fatores irritantes (NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012), codificada pelo gene *Trpa1*, com cerca de 1100 aminoácidos (1119 aminoácidos em humanos e 1115 aminoácidos em camundongos) e peso molecular variando entre 120-130 kDa. É um canal não-seletivo permeável ao cálcio e, assim como outros receptores da superfamília TRP, TRPA1 apresenta-se como um homotetrâmero e sua estrutura compreende seis segmentos transmembrana. Seu domínio aminoterminal apresenta 18 domínios de repetições de anquirina, compostos por 33 aminoácidos, possivelmente envolvidos nas interações estabelecidas entre o receptor e outros compostos (BARALDI et al., 2010; NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012; COHEN; MOISEENKOVA-BELL, 2014).

Além de um grande número de ativadores eletrofílicos, TRPA1 pode também ser modulado pela capsaicina ou por outros compostos que interagem covalentemente com resíduos de cisteína e lisina em sua estrutura molecular, como agentes anestésicos gerais e locais, algumas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), paracetamol e acetaminofeno, além de compostos utilizados em cosmética, como parabenos, e compostos químicos oriundos da poluição do ar e fumaça de cigarro (NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012). É sabido que o carvacrol também atua como agonista de TRPA1 (OZ et al., 2015). Nesse sentido, admite-se que os compostos de origem vegetal agonistas de TRPA1 correspondem a estratégias evolutivas que permitiram às plantas desenvolverem sistemas de defesa contra predadores herbívoros, uma vez que tais compostos produzem dor aguda por ativação de TRPA1 (BARALDI et al., 2010).

Inicialmente, o receptor TRPA1 foi descrito como um canal iônico nociceptivo, capaz de responder a frio extremo e compostos pungentes, expresso em neurônios sensoriais de raízes de gânglios dorsais. Evidências posteriores sugerem que o receptor TRPA1 encontra-se amplamente expresso em diversos órgãos e tecidos, incluindo cérebro, coração, estômago, intestino delgado, pulmões, musculatura esquelética, cólon e pâncreas (HOLZER, 2011; NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012). Especificamente no trato gastrointestinal, TRPA1 ocorre em três distintos sistemas celulares: neurônios aferentes primários extrínsecos, neurônios entéricos intrínsecos e células endócrinas da mucosa (HOLZER, 2011).

Sabe-se que o receptor TRPA1 exerce relevante influência no desenvolvimento da dor e da inflamação, o que gera a necessidade pela busca de antagonistas

específicos que possam ser utilizados na pesquisa farmacológica. O primeiro antagonista de TRPA1 já descrito e ainda amplamente utilizado é o HC-030031, uma xantina alcaloide, inibidor não eletrofílico que age realizando interações não covalentes com o receptor TRPA1. Além dele, a cânfora, um monoterpeno extraído da planta *Cinnamomum camphora*, também pode agir como um antagonista natural de TRPA1 (NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012; CHEN; HACKOS, 2015).

4 CAPÍTULO I

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA, COM ÊNFASE EM ATIVIDADE ANTIDIARREICA, DE CARVACROL E ACETATO DE CARVACROLILA

EXPLORATION TECHNOLOGY OF BIOLOGICAL ACTIVITY WITH FOCUS ON ANTIDIARRHEAL ACTIVITY OF CARVACROL AND CARVACRYL ACETATE

Resumo

Nesta prospecção, objetivou-se realizar um estudo sobre atividades biológicas já descritas para o carvacrol e para o acetato de carvacrolila, com especial destaque para as eventuais aplicações destas substâncias enquanto agentes antidiarreicos. Para isso, foram obtidas informações sobre artigos científicos nas bases PubMed, Web of ScienceTM, Scopus e Scielo, bem como sobre documentos de patentes nas bases USPTO, EPO, WIPO e INPI, com o uso de palavras-chave e operadores boleanos específicos, sempre utilizados no campo de busca relativo ao resumo dos trabalhos. Desse modo, verificou-se que em bases de dados internacionais de artigos científicos, muitos são os trabalhos publicados envolvendo o carvacrol, mas há número relativamente baixo de documentos de patentes, principalmente, no que se refere à descrição de eventual ação antidiarreica do composto. Além disso, de modo generalizado nas bases de dados, tanto a produção científica em artigos, quanto os pedidos de depósito de patentes são escassos envolvendo o acetato de carvacrolila. Isso demonstra que há grandes oportunidades de pesquisa envolvendo a descrição da atividade biológica de compostos, como o carvacrol e o acetato de carvacrolila.

Palavras-chave: oléos essenciais, diarreia, patentes, desordem gastrintestinal.

Abstract

In this technology prospection, the aim of this study was realize a technological exploration about the biological activities already described for carvacrol and carvacryl acetate, with emphasis on the possible applications of these substances as antidiarrheal agents. For this, it was obtained information about scientific publications in PubMed, Web of ScienceTM, Scopus and Scielo. Information about patents were obtained in USPTO, EPO, WIPO and INPI. In both cases were used specific key words and boolean operators in the abstract field of search. Thus, it was verified that in international databases of scientific publications, there are many articles about

carvacrol, but is relatively low the number of patents, specifically involving an eventual antidiarrheal activity for the substance. Furthermore, generally in all databases, the scientific production and the patents deposit applications are scarce as regard carvacryl acetate. This demonstrates that there are great opportunities for scientific research involving the description of biological activities of compounds, such as carvacrol and carvacryl acetate, especially about the possible occurrence of antidiarrheal properties.

Key-words: essential oils, diarrhea, patents, gastrointestinal desorders.

1. Introdução

Sabe-se que as plantas são fonte significativa de novas substâncias químicas que apresentam algum potencial efeito terapêutico. Frequentemente, tais substâncias são extraídas de óleos essenciais de vegetais, como é o caso do carvacrol (2-metil-5-isopropilfenol), um monoterpeno fenólico constituinte dos óleos essenciais de inúmeras plantas aromáticas das famílias Lamiaceae (VINCENZI et al., 2004 apud DAMASCENO et al., 2014), Euphorbiaceae, Verbenaceae e Poaceae, especialmente em espécies dos gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymus*, *Thymbra*, *Acalypha*, *Lippia* e *Cymbopogon,* comumente utilizadas na medicina popular e aromaterapia (OLIVEIRA et al., 2012).

No que se refere à sua atividade biológica, já há evidência científica para atividade antimicrobiana, antitrombótica, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória do carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2014). Contudo, em função de sua natureza fenólica, o carvacrol apresenta considerável toxicidade. Daí o desenvolvimento de um derivado semissintético do carvacrol, o acetato de carvacrolila, construído, portanto, com vistas à obtenção de um composto menos tóxico (DAMASCENO et al., 2014).

Como atividade biológica popularmente creditada ao carvacrol, devido ao uso de óleo de orégano em várias doenças, mas ainda pendente de confirmação científica, tem-se o seu uso enquanto agente com propriedades antidiarreicas. Assim, considerando-se a proximidade estrutural e funcional do carvacrol e de seu derivado acetato de carvacrolila, pode-se supor uma ação antidiarreica semelhante também para este novo composto, uma vez que a estrutura básica é pouco alterada. Neste

sentido, estudos que busquem afirmar tal propriedade antidiarreica de ambos os compostos, carvacrol e acetato de carvacrolila, estaria contribuindo tanto para o campo da Ciência como também da Saúde Pública, posto que a diarreia é, atualmente, uma das principais causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (LUMPU et al., 2012). Estima-se que cerca de dois milhões de crianças morram por ano em consequência de doenças diarreicas (NAJEEB-UR-REHMAN et al., 2012). A desordem gastrointestinal causada pela diarreia envolve um aumento na frequência de evacuações e alteração na consistência das fezes. Caracteriza-se, ainda, pela perda de fluidos e eletrólitos, com consequente evolução para quadro de desidratação, podendo induzir colapso vascular em função da hipovolemia (RAHMAN et al., 2013).

Na seara da prospecção tecnológica, estudos que apontem o conhecimento já descrito sobre a atividade antidiarreica de compostos de origem natural e sintética, representam ferramenta muito útil, já que constituem-se como meios sistemáticos de disponibilização de informações. Assim, ao realizarem-se buscas sobre temas específicos em bases de informações tecnológicas pode-se mapear de modo confiável diversas vertentes do desenvolvimento científico, já que contém informações relacionadas à inovação. Isto porque, tais estudos constituem-se em informação de base para orientação no desenvolvimento de novas tecnologias (MACHADO et al., 2014). Tendo em vista o exposto, neste trabalho objetivou-se realizar um estudo sobre a atividade biológica já descrita para o carvacrol e para o acetato de carvacrolila, com especial destaque para eventuais aplicações destas substâncias enquanto agentes antidiarreicos.

2. Metodologia

Este trabalho foi realizado tendo por base os artigos científicos publicados nas bases PubMed, Web of ScienceTM, Scopus e Scielo. Além disso, foram também investigados os documentos de patentes depositados nas principais bases de dados de patentes: USPTO (United States Patent and Trademark Office), EPO (European Patent Office), WIPO (World Intellectual Property Organization) e INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial). A pesquisa nas bases de dados de artigos

científicos e patentes foi realizada sem definição de prazo para busca, sendo consultados, portanto, todos os artigos científicos e documentos de patentes já disponíveis para consulta até a data de realização da referida pesquisa (27/11/2014). As buscas foram realizadas utilizando-se palavras-chave, conforme apresenta a Tabela 1, e o operador boleano “and” em todas as bases, eventualmente associando-se os termos com o uso de aspas (“ “). Tendo em vista a necessidade de realização de uma busca mais ampla, tais palavras-chave e operador boleano foram sempre utilizados no campo de busca relativo ao resumo.

Tabela 1 – Bases de dados consultadas e palavras-chave utilizadas em consultas em bases de dados de artigos científicos e patentes.

	Palavras-chave
PubMed	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
Web of Science™	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
Scopus	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
Scielo	Carvacrol, acetato de carvacrolila, diarreia.
USPTO	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
EPO	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
WIPO	Carvacrol, carvacryl acetate, diarrhea.
INPI	Carvacrol, acetato de carvacrolila, diarreia.

3. Resultados e Discussão

Os resultados da prospecção tecnológica apresentados referem-se, conforme já mencionado, a todos os artigos científicos já publicados e todos os depósitos de patentes já efetuados sobre as temáticas avaliadas, considerando-se, quanto aos artigos científicos, a abordagem temática da publicação, e, quanto às patentes, o ano e país de depósito bem como a Classificação Internacional de Patentes (CIP).

A consulta à base de dados PubMed revelou a existência de 936 trabalhos publicados envolvendo o termo 'carvacrol'. Tais artigos reportam a ação antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória do composto, destacando-se, ainda,

artigos que reportam metodologias para a aferição da concentração deste composto (CRUZ et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2014; RASHIDIPOUR et al., 2014), que é um dos constituintes de óleos essenciais de determinadas plantas aromáticas. No que se refere à busca pelo termo 'acetato de carvacrolila', apenas 5 resultados foram retornados, destacando-se suas funções antihelmínticas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Na busca associada pelos termos 'carvacrol' e 'diarreia' foram retornados 6 resultados que esboçam pesquisas associando o carvacrol ao combate de viroses intestinais, bem como alguns artigos de revisão reportando a suposta atuação antidiarreica de alguns componentes vegetais, como o carvacrol. Da mesma forma, embora a busca associada pelos termos 'acetato de carvacrolila' e 'diarreia' tenha retornado dois resultados, não há referência à elucidação da atuação do referido composto sobre os mecanismos de ação das doenças diarreicas.

Na base de dados Web of ScienceTM foram apontados 2459 registros de artigos científicos publicados envolvendo o termo ‘carvacrol’. Tais publicações referem-se, majoritariamente, ao reporte de atividades antimicrobiana, antifúngica e antioxidante do composto, aplicáveis, na maioria das publicações, às práticas de conservação de alimentos. Há, ainda, a descrição de atividade repelente de insetos para este e outros compostos constituintes de óleos essenciais em plantas (MA et al., 2014; PAVELA, 2014). No que se refere à existência de publicações revelando propriedades do carvacrol úteis à área de saúde, houve algumas dezenas de ocorrências de publicações dessa natureza. Nesse caso, houve associação do carvacrol e a avaliação de suas propriedades na inflamação (SANTANA et al., 2014), bem como na circulação (SHABIR et al., 2014; SUO et al., 2014) e na nocicepção (BONFIM et al., 2014). Na busca associada dos termos ‘carvacrol’ e ‘diarreia’ foram encontrados na base de dados Web of ScienceTM 13 registros, que, entretanto, somente referem-se à ação do carvacrol sobre a redução da produção da toxina do *Clostridium difficile* (MOOYOTTU et al., 2014) e à presença deste composto em óleos essenciais e extratos com atividade antimicrobiana sobre *Vibrio cholerae* e outras bactérias causadoras de diarreias, antiviral sobre vírus indutores de diarreia, e também sobre a flora intestinal. Quanto à busca pelo termo ‘acetato de carvacrolila’, a mesma base de dados retornou 15 resultados, associando-se o acetato de carvacrolila a atividade antioxidante e antifúngica. Aplicações específicas para a área de saúde apresentam atividade do acetato de carvacrolila na redução da resposta

inflamatória e nocicepção (DAMASCENO et al., 2014), atividade anti-helmíntica contra *Schistosoma mansoni* (MORAES et al., 2013). Além disso, não houve registros de publicações científicas nesta base de dados envolvendo a busca associada dos termos ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’.

Na base de dados Scopus, os registros retornados apontam situação bastante semelhante à observada na base de dados Web of ScienceTM, tendo sido retornados 2681 resultados para a busca pelo termo ‘carvacrol’, 23 resultados para a busca por ‘acetato de carvacrolila’ e 20 resultados para a busca associada entre ‘carvacrol’ e ‘diarreia’. No que se refere aos artigos científicos que envolvam a associação de termos ‘carvacrol’ e ‘diarreia’, percebe-se, novamente, a ocorrência de 16 descrições sobre a atividade biológica dos compostos sobre agentes causadores de diarreia e também seis artigos de revisão sobre o tema. Novamente, não houve registros de publicações científicas nesta base de dados envolvendo a busca associada dos termos ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’.

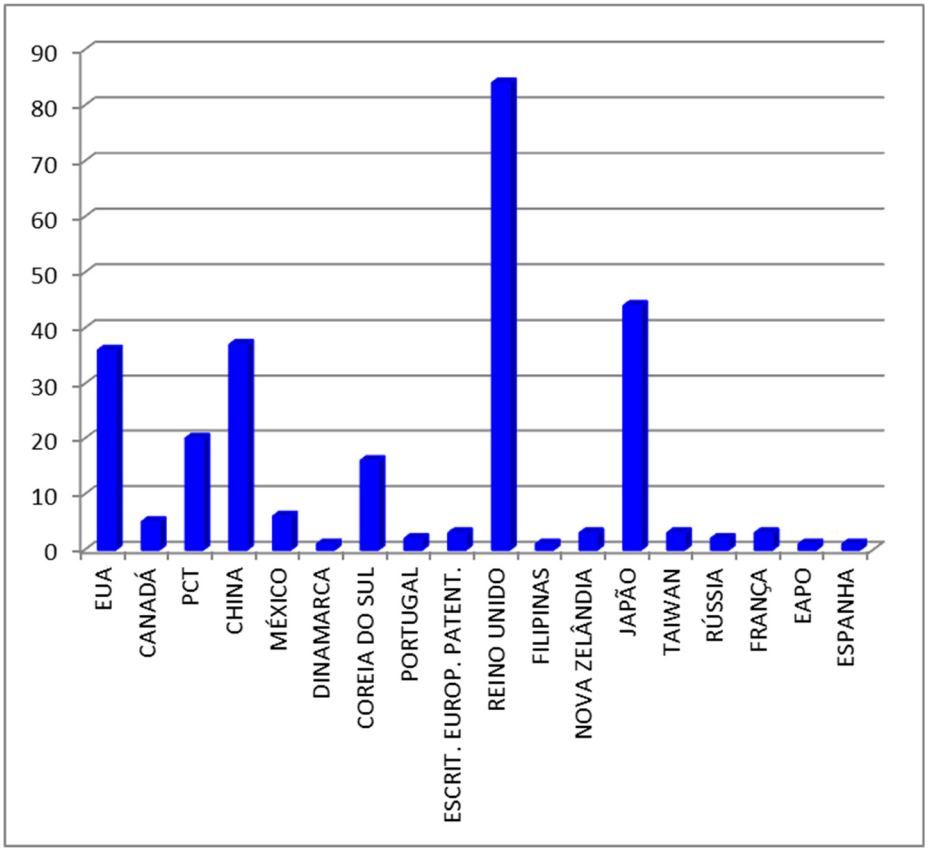
Os resultados retornados para a pesquisa de artigos científicos realizada na base Scielo indicam apenas 47 artigos publicados sobre o carvacrol, 1 resultado envolvendo o acetato de carvacrolila, 1 resultado apontando associação de termos entre carvacrol e diarreia e nenhum resultado envolvendo a associação entre acetato de carvacrolila e diarreia. Mais uma vez, os 47 resultados retornados para a pesquisa pelo termo ‘carvacrol’ apontam dezenas de descrições sobre sua atividade contra agentes biológicos, com especial destaque para sua ação antimicrobiana.

Em relação aos documentos de patentes já depositados envolvendo a temática em análise, a busca na base de dados USPTO retornou 41 resultados de documentos de patentes envolvendo o termo ‘carvacrol’ e apenas 3 resultados envolvendo a associação de termos ‘carvacrol’ e ‘diarreia’. Tendo em vista a baixa proporção de resultados, dados gráficos não foram apresentados. Tais resultados referem-se à proteção de formulações farmacêuticas baseadas no uso de óleos essenciais de plantas, que, além de carvacrol, podem apresentar outros compostos, conforme trazem os documentos 6106838 e 6921539. Tais formulações, contudo, expressam apenas o potencial antimicrobiano do carvacrol e também dos demais compostos, traduzindo-se sua eficiência, portanto, apenas em situação de diarreia causada por agente microbiano. Além disso, o documento 8734859 apresenta uma composição molecular para utilização no tratamento de câncer, que apresenta, dentre outros

compostos, o carvacrol. Nenhum resultado foi retornado por esta base após a busca pelo termo ‘acetato de carvacrolila’ e pela associação de termos ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’.

Na base de patentes europeia EPO foram obtidos 268 resultados para a busca pelo termo ‘carvacrol’. No que se refere aos países de depósito, tais resultados encontram-se sumarizados na Figura 1.

Figura 1 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes EPO, quanto aos países de depósito dos pedidos de patente. Fonte: autoria própria (10/12/2014).

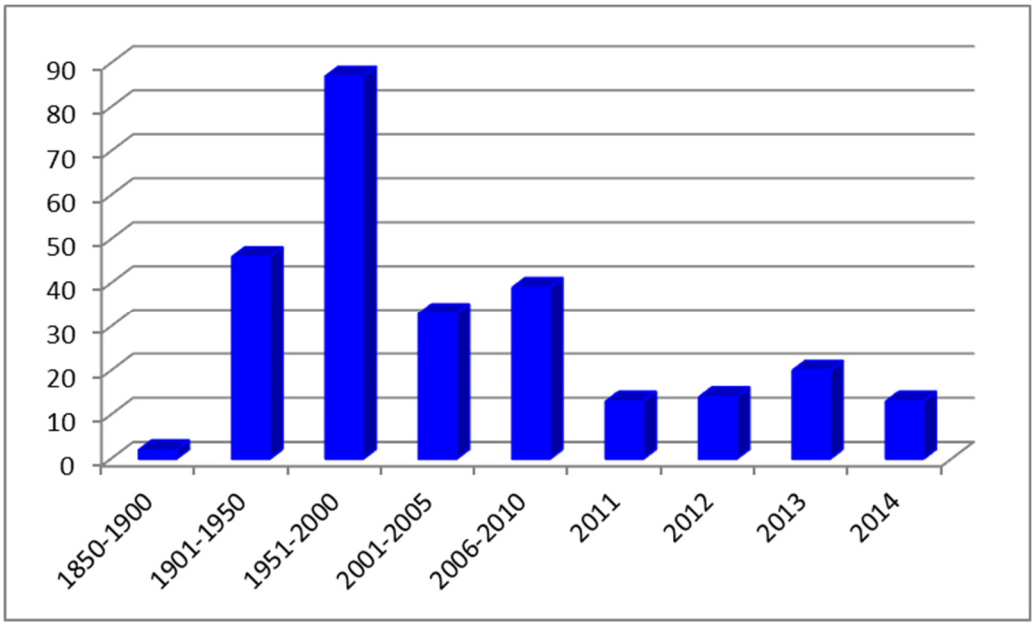


Nota-se que o Reino Unido, junto ao Japão, Estados Unidos da América (EUA) e China são os países com maior número de pedidos de depósito de patentes envolvendo o carvacrol, sendo o número de pedidos de depósito do Reino Unido correspondente a aproximadamente o dobro dos pedidos de depósito dos demais países supramencionados. Mostra-se também relevante o número de pedidos de

depósito de patentes ao PCT (Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes), que prevê o depósito de um só pedido internacional, havendo a possibilidade de conversão do mesmo em uma multiplicidade de pedidos nacionais. Destaca-se, ainda, o número de pedidos de depósito de patentes envolvendo o carvacrol pela Coreia do Sul, maior que o número de pedidos de depósito realizados no escritório europeu de patentes (EPO) ou mesmo em países como Canadá e França.

Na Figura 2 tem-se a distribuição dos 268 pedidos de depósito de patentes realizados ao EPO por períodos ou anos de depósito.

Figura 2 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes EPO, quanto aos períodos ou anos de ocorrência dos depósitos dos pedidos de patente. Fonte: autoria própria (10/12/2014).

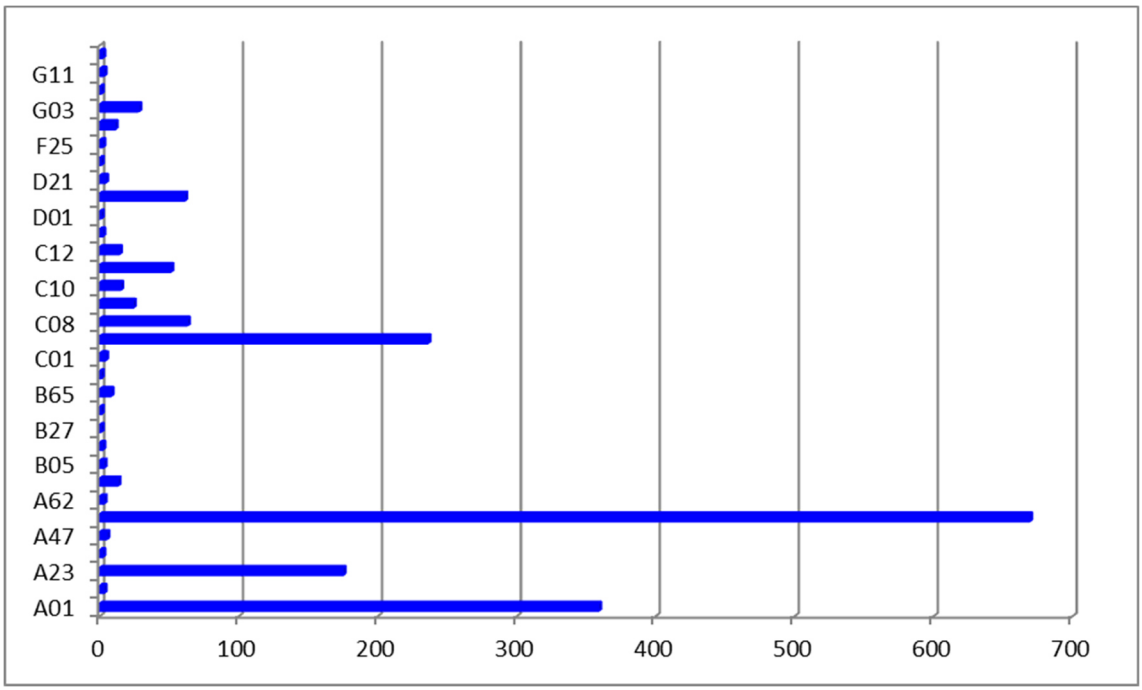


É possível observar que, a produtividade em inovação envolvendo o carvacrol, refletida pelo número de depósitos de pedidos de patentes no EPO é, atualmente, maior, pois de 2006 a 2010 houve 39 pedidos de depósito de patentes, o que corresponde a quase 45% do total de pedidos de depósito de patentes ocorridos entre 1951 a 2000, em que foram depositados 87 pedidos. Além disso, de 2011 a 2014 somam-se 60 pedidos de depósito de patentes ao EPO envolvendo o carvacrol, o que corresponde a cerca de 69% do total de pedidos de depósito de patentes ocorridos

entre 1951 a 2000. Se tais períodos forem divididos em duas fases distintas, pode-se perceber que de 1850 a 2000 foram registrados no EPO 135 pedidos de depósito de patentes envolvendo o carvacrol, enquanto que de 2001 a 2014, em um período de apenas 13 anos, foram depositados 132 pedidos de patentes, o que evidencia a grande produtividade em inovação envolvendo o carvacrol nos últimos anos.

No que se refere à Classificação Internacional de Patentes (CIP) (Figura 3), nota-se que a maior parte dos pedidos de depósito de patente foram incluídos nas categorias de classificação A01, A62, C08 e A23, relativas, respectivamente, à agricultura e reflorestamento, caça e pesca; saúde e resguardo de vidas (com a maior proporção de registros dentre todas as demais classes); componentes macromoleculares orgânicos, sua preparação e composições baseadas nos mesmos; alimentos e fumo, alimentos e seu tratamento. Note-se que o somatório dos números de pedidos de depósitos apontado na Figura 3 é consideravelmente maior ao total inicial indicado na busca realizada na base de dados. Isto porque, no processo de registro, eventualmente, podem ser indicadas classificações diversas, que apontam, portanto, aplicações diversas da tecnologia a ser protegida em distintas áreas.

Figura 3 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes EPO, quanto à CIP. Fonte: autoria própria (10/12/2014).

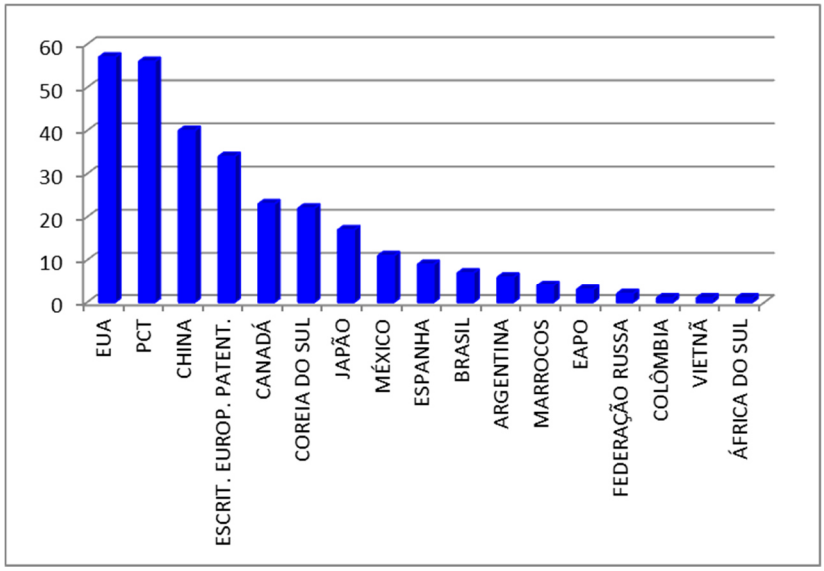


A busca associada pelos termos ‘carvacrol’ e ‘diarreia’ na base de dados EPO retornou 3 resultados, que trazem documentos de patentes propondo a utilização da referida substância na composição de aditivos alimentares ou, ainda, em composições farmacêuticas baseadas na atividade antimicrobiana do composto, conforme demonstram os documentos CN102987093, US6106838 e KR100438209.

Na base de dados europeia, a busca pelo termo ‘acetato de carvacrolila’ retornou apenas 5 resultados, datados da década de 1950 e dos anos 2000. Nenhum destes resultados corresponde a alguma propriedade biológica do composto, mas sim à sua utilização em processos de manufatura de outras substâncias ou, ainda, sua utilização em composições cosméticas ou herbicidas. A busca nesta base pela associação dos termos ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’ não retornou resultados.

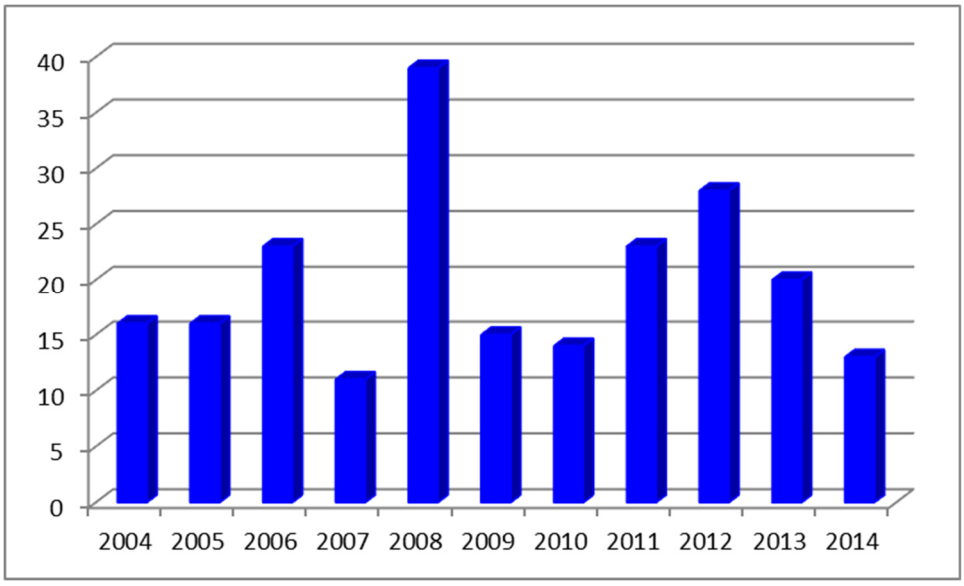
Na base de dados da WIPO foram retornados 293 resultados para a busca pelo termo ‘carvacrol’. Na Figura 4 nota-se que o maior número de patentes envolvendo o carvacrol foi depositado nos EUA, por meio do Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT), na China, no Escritório Europeu de Patentes (EPO), no Canadá, na Coreia do Sul e também no Japão. Juntos estes pedidos de depósito de patentes representam mais de 80% do total de depósitos disponíveis nesta base de dados.

Figura 4 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes WIPO, quanto aos países de depósito dos pedidos de patente. Fonte: autoria própria (10/12/2014).



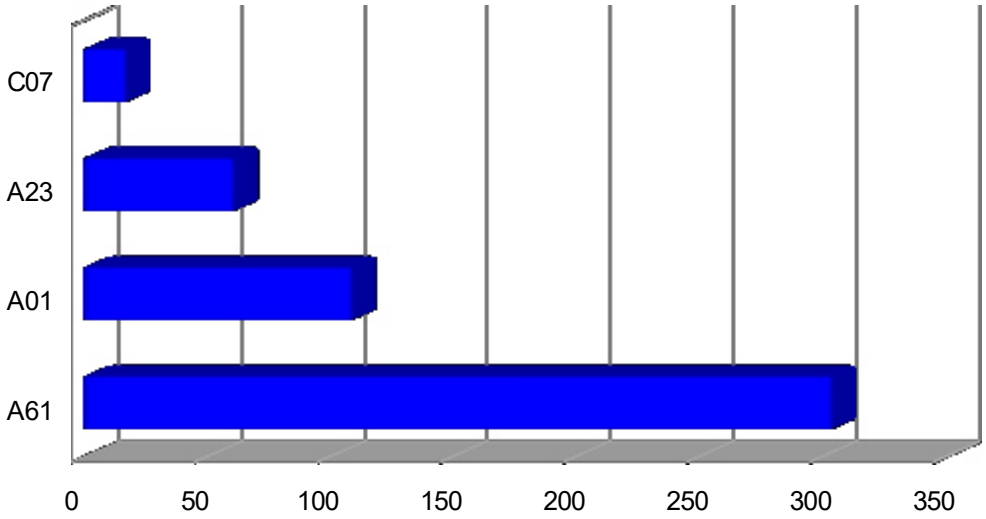
Os pedidos de depósito de patente registrados nesta base envolvendo o uso do carvacrol apontam a registros apenas a partir do ano de 2004 (Figura 5), tendo sido os anos de 2006, 2008 e de 2011 a 2013 os mais produtivos em termos de pedidos de depósito.

Figura 5 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes WIPO, quanto aos anos de ocorrência dos depósitos dos pedidos de patente. Fonte: autoria própria (10/12/2014).



Em uma busca orientada pela CIP, nota-se que a maior proporção dos pedidos de depósito de patentes nesta base de dados encontra-se distribuída entre as seguintes classes: A61 (saúde, resguardo de vidas, ciência médica ou veterinária e higiene) e A01 (agricultura, reflorestamento, caça e pesca).

Figura 6 - Resultados retornados para a busca pelo termo ‘carvacrol’ na base de patentes WIPO, quanto à CIP. Fonte: autoria própria (10/12/2014).



Em busca na mesma base de dados pelos depósitos de pedidos de patentes envolvendo o acetato de carvacrolila, tem-se apenas 5 resultados, com dois pedidos de depósito na China, um no Escritório Europeu de Patentes (EPO), um nos EUA e um sob o Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT), apenas a partir do ano de 2004. Tais pedidos de depósito de patentes envolvendo o acetato de carvacrolila foram registrados segundo as seguintes classes da IPC: A61K, A01N, A01P, A61Q, C07B, C07C e fazem referência à solicitação de registro de um herbicida e de uma mesma composição cosmética contendo a substância, que foi registrada em quatro diferentes países e escritórios de registro.

Em uma busca associada pelos termos ‘carvacrol’ e ‘diarreia’, foram retornados apenas 2 resultados, que remontam a pedido de depósito na República da Coreia e outro nos EUA. Tais patentes encontram-se depositadas segundo as seguintes classes da IPC: A61K, A01N e A23L, tendo sido registradas ainda em 2004, visando-se à proteção de formulações antimicrobianas contendo, entre outras substâncias, o carvacrol. Já a busca associada entre os termos ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’ não retornou qualquer resultado.

Já a busca pelo termo ‘carvacrol’ realizada na base de patentes nacional do INPI retornou apenas 13 resultados, objetivando a proteção de formulações contendo o composto carvacrol e sua ação carrapaticida, larvicida e antimicrobiana. Tendo em vista a baixa proporção de resultados, dados gráficos não foram apresentados. A busca pelo termo ‘acetato de carvacrolila’ e a busca associada de termos entre ‘carvacrol’ e ‘diarreia’ e ‘acetato de carvacrolila’ e ‘diarreia’ não retornaram resultados.

4. Conclusão

Os resultados expostos neste trabalho apontam que, embora a produção científica em artigos envolvendo o carvacrol e suas ações biológicas seja abundante, com alguns milhares de artigos publicados sobre a temática, pouco tem sido aplicado no desenvolvimento de tecnologias envolvendo o uso deste composto, já que o número de pedidos de depósitos de patentes envolvendo o carvacrol é consideravelmente menor (algumas dezenas ou centenas), em relação ao número de publicações científicas. Em relação ao acetato de carvacrolila, notam-se boas oportunidades de pesquisa no que se refere à definição de atividade biológica para este composto, em razão do baixo número de publicações científicas e de pedidos de depósito de patentes (apenas 5) envolvendo tal substância. Ao aprofundar-se no processo de busca de informações sobre as atividades biológicas já descritas para o carvacrol e para o acetato de carvacrolila, observa-se que nada foi descrito acerca da eventual ação dos compostos sobre mecanismos específicos de ação das doenças diarreicas. Assim, mostra-se relevante a pesquisa visando à descrição da atividade biológica de compostos, como o carvacrol e o acetato de carvacrolila, especialmente, no que se refere à eventual ocorrência de propriedades antidiarreicas, tendo em vista o fato de não haver artigos científicos ou qualquer documento de patente relatando-as.

Referências

BONFIM, R. R.; PAIVA-SOUZA, I. O.; MORAES, J. P.; PEREIRA, D. S.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; THOMAZZI, S. M.; FERRO, J. N. S.; Barreto, E.O.; SOUSA, D.P. Isopropoxy-carvacrol, a derivative obtained from carvacrol, reduces acute

inflammation and nociception in rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, p. 237-243, 2014.

CRUZ, E. M.; PINTO, J. A.; FONTES, S. S.; ARRIGONI, M. F.; BACCI, L.; JESUS, H. C.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B. BLANK, A. F. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *Lippia gracilis* Schauer germplasm. **Scientific World Journal**, 2014.

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

LUMPU, S. N.; LUTETE, G. T.; KABANGU, O. K.; KANYANGA, R. C.; APERS, S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Assessment of the antidiarrhoeal properties of the aqueous extract, the 80% methanol extract and its soluble fractions of the leaves of *Alstonia congensis* Engl. (Apocynaceae) in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 620–626, 2012.

MA, W. B.; FENG, J. T.; JIANG, Z. L.; WU, H.; MA, Z. Q.; ZHANG, X. Fumigant activity of eleven essential oil compounds and their selected binary mixtures against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 3631-3637, 2014.

MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; ARARUNA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, R. M. Uso de marcadores moleculares na depressão: prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC**, v.4, n.3, p.1008-1016, 2014.

MOOYOTTU, S.; KOLLANOOR-JOHNY, A.; FLOCK, G.; BOUILLAUT, L.; UPADHYAY, A.; SONENSHEIN, A. L.; VENKITANARAYANAN, K. Carvacrol and trans-cinnamaldehyde reduce *Clostridium difficile* toxin production and cytotoxicity *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 4415-4430, 2014.

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

NAJEEB-UR-REHMAN; BASHIR, S.; AL-REHAILY, A. J.; GILANI, A. H. Mechanisms underlying the antidiarrheal, antispasmodic and bronchodilator activities of *Fumaria parviflora* and involvement of tissue and species specificity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, p. 128–137, 2012.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.385, p. 899–908, 2012.

PAVELA, R. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 247-258, 2014.

RAHMAN, K.; BARUA, S.; ISLAM, F.; ISLAM, R.; SAYEED, M. A.; PARVIN, S.; ISLAM, E. Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 3, n. 8, p. 639-643, 2013.

RASHIDIPOUR, M.; HEYDARI, R.; FEIZBAKHSH, A.; HASHEMI, P. Rapid monitoring of carvacrol in plants and herbal medicines using matrix solidphase dispersion and gas chromatography flame ionisation detector. **Natural Product Research**., v. 25, n. 17, 2014.

RODRIGUEZ, S. R.; SALGADO, J. M., DOMINGUEZ, J. M.; DIÉGUEZ, C. S. Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GCMS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLCESI/MS/MS) from Lamiaceae Species. **Phytochemical Analysis**. 2014.

SANTANA, M. T.; SILVA, V. B.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; CAVALCANTI, S. C. D.; BARRETO, E. O.; FERRO, J. N. D.; SANTOS, M. R. V.; ARAUJO, A. A. D. S.; QUINTANS, L. J. Synthesis and pharmacological evaluation of carvacrol propionate. **Inflamation**, v. 37, p. 1575-1587, 2014.

SHABIR, H.; KUNDU, S.; BASIR, S. F.; KHAN, L. A. Modulation of Pb(II) caused aortal constriction by eugenol and carvacrol. **Biological Trace Element Research**, v. 161, p. 116-122, 2014.

SUO, L.; KANG, K.; WANG, X.; CAO, Y. G.; ZHAO, H. F.; SUN, X. Y.; TONG, L. Q.; ZHANG, F. Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats. **Plos One**, v. 9, e104043, 2014.

VINCENZI, M. D.; STAMMATI, A.; VINCENZI, A. D.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, constatou-se que ambos os compostos (carvacrol e acetato de carvacrolila) demonstraram ação promissora quanto à diminuição do dano tecidual deflagrado no curso da mucosite no jejuno de camundongos. Entretanto, o acetato de carvacrolila aparentemente pode ser tolerado em maiores doses, ainda que resultando em ação semelhante à do carvacrol.

De modo geral, o conjunto de dados apresentados demonstrou que animais tratados com carvacrol ou com acetato de carvacrolila melhoraram parâmetros pré-clínicos, como o aumento da sobrevida, a diminuição da perda de massa corpórea, da neutropenia e da bacteremia associados à mucosite intestinal. Quanto à manutenção da arquitetura tecidual do jejuno, houve recomposição das estruturas de vilos e criptas intestinais, bem como diminuição da presença de células não residentes, como hemácias e neutrófilos, após o tratamento com carvacrol ou acetato de carvacrolila. Os parâmetros indicativos de inflamação, como MPO, citocinas e algumas enzimas, como COX-2, também se apresentaram diminuídos após o tratamento dos animais com carvacrol e acetato de carvacrolila. Resultado semelhante foi também observado para os parâmetros característicos de situação de estresse oxidativo, como indicadores de peroxidação lipídica e presença de nitritos e nitratos. Finalmente, a realização de ensaios *in vivo* com o uso de antagonista e modelagens computacionais permitiram também elucidar a participação dos receptores TRPA1 no processo de controle da mucosite intestinal desencadeado após administração de carvacrol ou acetato de carvacrolila.

Embora diversos tenham sido os avanços ora descritos no que concerne à proposição do uso de carvacrol ou acetato de carvacrolila como estratégias promissoras de controle da mucosite intestinal, há ainda muito o que se desvendar sobre os mecanismos de deflagração e controle da mucosite intestinal. Neste sentido, admitem-se como perspectivas futuras de exploração da temática a utilização de técnicas de Biologia Molecular que permitam descrever e quantificar a expressão dos receptores TRPA1 em jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 ou, ainda, permitam avaliar a expressão diferencial de diversos genes simultaneamente, contribuindo para o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares de desenvolvimento da mucosite intestinal. Tais estudos também poderiam ser explorados por meio da utilização de técnica tridimensional de cultivo de

células, com a manutenção de criptas intestinais (organoides) *ex vivo*, o que amplificaria as possibilidades de testes com novos compostos, como o carvacrol e o acetato de carvacrolila, sem a utilização de modelos animais.

Propõe-se, ainda, como perspectivas futuras de exploração da temática em estudo, a avaliação de aspectos relativos à motilidade intestinal, com o estudo de alterações no plexo mioentérico em modelo de mucosite intestinal. Admite-se também o monitoramento de indicadores das funções hepática e renal nos animais submetidos ao tratamento com carvacrol e acetato de carvacrolila, que permitiriam a avaliação sobre a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade desses compostos. Finalmente, de modo a se compreender melhor o processo da desestruturação da histoarquitetura no jejuno de animais submetidos à mucosite, propõe-se o acompanhamento da ocorrência de apoptose em células das criptas intestinais.

8 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

a) tanto o carvacrol como o acetato de carvacrolila melhoraram os parâmetros pré-clínicos observados, com o aumento da sobrevida dos animais e do número total de leucócitos, além da diminuição da variação de massa corpórea e do número de bactérias presentes no sangue dos animais submetidos à mucosite intestinal e tratados com os compostos;
b) os compostos também melhoraram parâmetros histológicos e morfométricos indicativos de manutenção da estrutura tecidual de vilos e criptas no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal e tratados com os compostos;
c) carvacrol e acetato de carvacrolila diminuíram parâmetros indicativos da ocorrência de processos inflamatórios (dosagem de mieloperoxidase, citocinas, fatores de transcrição e enzimas), o que confirmou a ação anti-inflamatória dos compostos;
d) também se comprovou o efeito protetor de carvacrol e acetato de carvacrolila sobre a mucosa intestinal, tendo em vista a diminuição de parâmetros indicativos de estresse oxidativo (MDA, NOx) e o aumento de parâmetros indicativos de proteção tecidual (GSH, SOD);
e) foi possível se estabelecer uma relação entre a atuação de carvacrol e acetato de carvacrolila na minimização dos danos da mucosite intestinal e a ativação de receptores TRPA1 expressos na mucosa intestinal;
f) os resultados obtidos possibilitaram a sistematização de informações úteis à composição de um pedido do registro de depósito de patente que proteja o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica envolvendo o carvacrol e o acetato de carvacrolila.

REFERÊNCIAS

ABD EL-ATTI, S.; WASICEK, K.; MARK, S.; HEGAZI, R. Use of probiotics in the management of chemotherapy-induced diarrhea: a case study. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 5, p. 569–570, 2009.

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41–50, 2011.

AL-DASOOQI, N.; SONIS, S. T.; BOWEN, J. M.; BATEMAN, E.; BLIJLEVENS, N.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; NAIR, R. G.; STRINGER, A. M.; YAZBECK, R.; ELAD, S.; LALLA, R. V. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 7, p. 2075-2083, 2013.

ALAGAWANY, M.; EL-HACK, M. E. A.; FARAG, M. R.; TIWARI, R.; DHAMA, K. Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health - a review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2s, p. 73-84, 2015.

ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRETTI, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; PALMA, M. D. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n.6, p. 555-562, 2004.

ALOSAIMIA, M.; ALI, A.; RAZZAK, H. A. Epidemiology of irritable bowel syndrome: a systematic review of literature. **Journal of Health Informatics in Developing Countries**, v. 10, n. 1, p. 89-113, 2016.

ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chlorom-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol,mixed cresols, m-cresol, o-cresol p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International Journal of Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 29–127, 2006.

ANDRE, W. P.; RIBEIRO, W. L.; CAVALCANTE, G. S.; DOS SANTOS, J. M.; MACEDO, I. T.; DE PAULA, H. C.; DE FREITAS, R. M.; DE MORAIS, S. M.; DE MELO, J. V.; BEVILAQUA, C. M. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.

ANTHONY, L. Irinotecan toxicity. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 1, n. 1, p. 35–39, 2007.

ARIFA, R. D.; MADEIRA, M. F.; DE PAULA, T. P.; LIMA, R. L.; TAVARES, L. D.; MENEZES-GARCIA, Z.; FAGUNDES, C. T.; RACHID, M. A.; RYFFEL, B.; ZAMBONI, D. S.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecaninduced mucositis through IL-1β and IL-18 in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 7, p. 2023–2034, 2014.

ARISTATILE, B.; NUMAIR, A. K. S.; VEERAMANI, C.; PUGALENDI, K. V. Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine induced-hepatotoxicity in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 6, p. 757-765, 2009.

ARISTATILE, B.; AL-NUMAIR, K. S.; AL-ASSAF, A. H.; PUGALENDI, K. V. Pharmacological effect of carvacrol on D: -galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 568–577, 2011.

ARISTATILE, B.; NUMAIR, A. K. S.; ASSAF, A. H. A; VEERAMANI, C.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 29, n. 11, p. 497-507, 2015.

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, p. 581–588, 2010.

ASTUDILLO, A.; HONG, E.; BYE, R.; NAVARRETE, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* cav. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 102–106, 2004.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BARALDI, P. G.; PRETI, D.; MATERAZZI, S.; GEPPETTI, P. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and

anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5085–5107, 2010.

BEN-ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BHANJA, P.; SAHA, S.; KABARRITI, R.; LIU, L.; ROY-CHOWDHURY, N.; ROY-CHOWDHURY, J.; SELLERS, R. S.; ALFIERI, A. A.; GUHA, C. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e8014, 2009.

BOSKABADY, M. H.; JAFARI, Z.; POURABOLI, I. The effect of carvacrol on muscarinic receptors of guinea-pig tracheal chains. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 4, p. 530–535, 2011.

BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Animal models of mucositis: implications for therapy. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 9, n. 5, p. 161-168, 2011.

BRAVO, D.; PIRGOZLIEV, V.; ROSE, S. P. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 4, p. 1531-1536, 2014.

CAMBUI, Y. R. S.; NATALI, M. R. M. Doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 17, n. 3, p. 116 - 119, 2015.

CANBEK, M.; UYANOGLU, M.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; USLU, S.; DEMIRUSTU, C.; ARAL, E.; HUSNU, C. B. K. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. **Phytomedicine**, v.15, n. 6-7, p. 447-452, 2008.

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

CAVALCANTI, S. C.; NICULAU EDOS, S.; BLANK, A. F.; CAMARA, C. A.; ARAUJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil

against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829–832, 2010.

CHAMI, F.; CHAMI, N.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 909–914, 2004.

CHAMI, N.; BENNIS, S.; CHAMI, F.; ABOUSSEKHRA, A.; REMMAL, A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 106–111, 2005.

CHEN, J.; HACKOS, D. H. TRPA1 as a drug target - promise and challenges. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 4, p. 451–463, 2015.

CHO, S.; CHOI, Y.; PARK, S.; PARK, T. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 192–201, 2012.

CINAUSERO, M.; APRILE, G.; ERMACORA, P.; BASILE, D.; VITALE, M. G.; FANOTTO, V.; PARISI, G.; CALVETTI, L.; SONIS, S. T. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 354, 2017.

COHEN, M. R.; MOISEENKOVA-BELL, V. Y. Structure of thermally activated TRP channels. **Current Topics in Membranes**, v. 74, p. 181–211, 2014.

COX, S. D.; MARKHAM, J. L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 930–936, 2007.

CUYA, S. M.; BJORNSTI, M. A.; VAN WAARDENBURG, R. C. A. M. DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new?. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2017.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGES, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 572–576, 2008.

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

DANCEY, J.; EISENHAUER, E. A. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 3, p. 327-338, 1996.

DAVILA, M.; BRESALIER, R.S. Gastrointestinal complications of oncologic therapy. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 12, p. 682–696, 2008.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745–2749, 2006.

DONG, R. H.; FANG, Z. Z.; ZHU, L. L.; LIANG, S. C.; GE, G. B.; LIU, Z.Y. Investigation of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) inhibitory properties of carvacrol. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 86–90, 2012.

DROSSMAN, D. A. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. **Gastroenterology**, v. 150, p. 1262–1279, 2016.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 853–874, 2003.

EARLEY, S.; GONZALES, A. L.; GARCIA, Z. I. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 612–620, 2010.

EL-GHAZALY, M. A.; EL-HAZEK, R. M.; KHAYYAL, M. T. Protective effect of the herbal preparation, STW 5, against intestinal damage induced by gamma radiation in rats. **International Journal of Radiation Biology**, v. 91, n. 2, p. 150–156, 2015.

ENOMOTO, S.; ASANO, R.; IWAHORI, Y.; NARUI, T.; OKADA, Y.; SINGAB, A.N.; OKUYAMA, T. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 307–310, 2001.

FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L. S.; SLEISENGER, M. H. **Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease:** pathophysiology, diagnosis, management. 9. ed. Philadelphia: Saunders, 2010.

GEIBEL, J. P. Secretion and absorption by colonic crypts. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 471–490, 2005.

GELLERT, M. DNA topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 879-910, 1981.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 1095–1100, 2003.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; ALVAREZ, E.; FINNIE, J.; KEEFE, D. M. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 360–369, 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 2006.

GILLING, D. H.; KITAJIMA, M.; TORREY, J. R.; BRIGHT, K. R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1149-1163, 2014.

GUABIRABA, R.; BESNARD, A. G.; MENEZES, G. B.; SECHER, T.; JABIR, M. S.; AMARAL, S. S.; BRAUN, H.; LIMA-JUNIOR, R. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; BEYAERT, R.; GRAHAM, G. J.; LIEW, F. Y. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1079–1093, 2014.

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

HASHEMIPOUR, H.; KERMANSHAHI, H.; GOLIAN, A.; VELDKAMP, T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.

HOLZER, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 131, n. 1, p. 142–170, 2011.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma, and suppresses COX-2 expression. **The Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 132-39, 2010.

JAYAKUMAR, S.; MADANKUMAR, A.; ASOKKUMAR, S.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; GOKULA DHAS, K.; KAMARAJ, S.; JOSEPHINE DIVYA, M. G.; DEVAKI, T. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 360, n. 1-2, p. 51–60, 2012.

JONES, J.A.; AVRITSCHER, E. B.; COOKSLEY, C. D.; MICHELET, M.; BEKELE, B. N.; ELTING, L. S. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Support Care Cancer**, v. 14, n. 6, p. 505–515, 2006.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 259–261, 2007.

KARKABOUNAS, S.; KOSTOULA, O.; DASKALOU, T. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Experimental Oncology**, v. 28, n. 2, p. 121-125, 2006.

KEEFE, D. M.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, n. 5, p. 632–637, 2000.

KEEFE, D. M.; GIBSON, R. J.; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 20, n. 1, p. 38-47, 2004.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 797–803, 2005.

KOPARAL, A. T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. **Cytotechnology**, v. 43, n. 1-3, p. 149–154, 2003.

KWON, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2007-2016, 2016.

LACY, B. E.; MEARIN, F.; CHANG, L.; CHEY, W. D.; LEMBO, A. J.; SIMREN, M.; SPILLER, R. Bowel disorders. **Gastroenterology**, v. 150, p. 1393–1407, 2016.

LALLA, R. V.; BOWEN, J.; BARASCH, A.; ELTING, L.; EPSTEIN, J.; KEEFE, D. M.; MCGUIRE, D. B.; MIGLIORATI, C.; NICOLATOU-GALITIS, O.; PETERSON, D. E.; RABER-DURLACHER, J. E.; SONIS, S. T.; ELAD, S. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-1461, 2014.

LANDA, P.; KOKOSKA, L.; PRIBYLOVA, M.; VANEK, T.; MARSIK, P. *In vitro* anti-inflammatory activity of carvacrol: inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 1, p. 75–78, 2009.

LEE, S. Y.; JIN, H. H. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 315–321, 2008.

LEE, C. S.; RYAN, E. J.; DOHERTY, G. A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 14, p. 3751-3761, 2014.

LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 603–612, 2007.

LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ESCALANTE-MINAKATA, P.; JIMÉNEZ-GARCÍA, M. I.; ORDOÑEZ-ACEVEDO, L. G.; FLORES, J. L. F.; DE LA ROSA, A. P. B. Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 448-455, 2008.

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

LIMA-JÚNIOR, R. C.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H. C.; MELO, M. L.; WONG, D. V.; LEITE, C. A.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V. T.; WANDERLEY, C. W.; NUNES, L. G.; LEITE, L. L.; MIRANDA, S. P.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A.; MAGALHÃES, P. J.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335–2350, 2014.

LOGAN R. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother and Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 33–41, 2008.

LUISSINT, A. C.; PARKOS, C. A.; NUSRAT, A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. **Gastroenterology**, v. 151, n. 4, p. 616-632, 2016.

LUNA, A.; LÁBAQUE, M. C.; ZYGADLO, J. A.; MARIN, R. H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 366-370, 2010.

MADARA, J. L.; TRIER, J. S. The functional morphology of the small intestine. In: JOHNSON, L. R.; ALPERS, D. H.; CHRISTENSEN, J.; JACOBSON, E. D.; WALSH, J. H. (Org.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1994, p. 1577–1622.

MADDEN, K. R.; CHAMPOUX, J. J. Overexpression of human topoisomerase I in baby hamster kidney cells: hypersensitivity of clonal isolates to camptothecin. **Cancer Research**, v. 52, n. 3, p. 525-532, 1992.

MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. The intestinal epithelial stem cell. **Bioessays**, v. 24, n. 1, p. 91–98, 2002.

MARTINO, E.; DELLA VOLPE, S.; TERRIBILE, E.; BENETTI, E.; SAKAJ, M.; CENTAMORE, A.; SALA, A.; COLLINA, S. The long story of camptothecin: from traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 701-707, 2016.

MARTINO, E.; VOLPE, S. D.; TERRIBILE, E.; BENETTI, E.; SAKAJ, M.; CENTAMORE, A.; SALA, A.; COLLINA, S. The long story of camptothecin: from traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 701-707, 2017.

MASUDA, N.; KUDOH, S.; FUKUOKA M. Irinotecan (CPT-11): pharmacology and clinical applications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 24, n.1, p. 3-26, 1996.

MAYO, B. J.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; BATEMAN, E. H.; KEEFE, D. M. Irinotecan-induced mucositis: the interactions and potential role of GLP-2 analogues. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 233-249, 2017.

MELO, M. L. P.; BRITO, G. A. C.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B. L. M.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M. G.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF-α, IL-1 and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 775–784, 2008.

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

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

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*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603–610, 2013.

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

MORE, U. B.; NARKHEDE, H. P.; DALAL, D. S.; MAHULIKAR, P. P. Synthesis of biologically active carvacrol compounds using different solvents and supports. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 12, p. 1957-1964, 2007.

NILIUS, B.; APPENDINO, G.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 464, n. 5, p. 425-58, 2012.

NOSTRO, A.; MARINO, A.; BLANCO, A. R.; CELLINI, L.; DI GIULIO, M.; PIZZIMENTI, F.; SUDANO ROCCARO, A.; BISIGNANO, G. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 791–797, 2009.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899–908, 2012.

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

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1547–1553, 2011.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol

and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341–350, 2010.

PELED, J. U.; HANASH, A. M.; JENQ, R. R. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. **Blood**, v. 128, n. 20, p. 2395-2402, 2016.

PEREZ-CONESA, D.; CAO, J.; CHEN, L.; MCLANDSBOROUGH, L.; WEISS, J. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 1, p. 55–62, 2011.

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

PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. A.; SILVA, O. A.; CERQUEIRA, G. S.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Is there a correlation between *in vitro* antioxidant potential and *in vivo* effect of carvacryl acetate against oxidative stress in mice hippocampus? **Neurochemical Research**, v. 39, n. 4, p. 758-769, 2014.

PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. A.; SILVA, O. A.; CERQUEIRA, G. S.; DE SOUSA, D. P.; PIRES, R. M. C.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M. Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ-aminolevulinic dehydratase, Na^+, K^+-ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 226, p. 49–57, 2015.

PIZZOLATO, J. F.; SALTZ, L. B. The camptothecins. **The Lancet**, v. 361, n. 9376, p. 2235–2242, 2003.

POTMESIL, M. Camptothecins: from bench research to hospital wards. **Cancer Research**, v. 54, n. 6, p. 1431- 1439, 1994.

POTTEN, C. S.; GANDARA, R.; MAHIDA, Y. R.; LOEFFLER, M.; WRIGHT, N. A. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? **Cell Proliferation**, v. 42, n. 6, p. 731–50, 2009.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 614–619, 2010.

RAVISHANKAR, S.; ZHU, L.; LAW, B.; JOENS, L.; FRIEDMAN, M. Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 6, p. 1145–1149, 2008.

RAVISHANKAR, S.; ZHU, L.; REYNA-GRANADOS, J.; LAW, B.; JOENS, L.; FRIEDMAN, M. Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 234–240, 2010.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 191–198, 2005.

RIBEIRO, R. A.; WANDERLEY, C. W. S.; WONG, D. V. T.; MOTA, J. M. S. C.; LEITE, C. A. V. G.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 881-893, 2016.

RIVAS, L.; MCDONNELL, M. J.; BURGESS, C. M.; O'BRIEN, M.; NAVARRO-VILLA, A.; FANNING, S.; DUFFY, G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 70–78, 2010.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione dependent protection. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 231–249, 1988.

RUBENSTEIN, E. B.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L. S.; FOX, P. C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S. T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, n. 9, p. 2026–2046, 2004.

SASAKI, K.; WADA, K.; TANAKA, Y.; YOSHIMURA, T.; MATUOKA, K.; ANNO, T. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2, p. 184–189, 2005.

SATO, T.; VAN ES, J. H.; SNIPPERT, H. J.; STANGE, D. E.; VRIES, R. G.; BORN, M. V. D.; BARKER, N.; SHROYER, N. F.; WETERING, M. V.; CLEVERS, H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 415-418, 2011.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA, M; MARSALKOVA, L. DNA protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. **Neoplasma**, v. 54, n. 2, p. 108–112, 2007.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; MARSALKOVA, L.; WSOLOVA, L. Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H(2)O(2). **Neoplasma**, v. 55, n. 5, p. 394–399, 2008.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; CHALUPA, I.; WSOLOVA, L.; NAVAROVA, J. *Ex vivo* assessment of protective effects of carvacrol against DNA lesions induced in primary rat cells by visible light excited methylene blue (VL+MB). **Neoplasma**, v. 58, n. 1, p. 14–19, 2011.

SONG, M. K.; PARK, M. Y.; SUNG, M. K. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/C mice. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p. 322-329, 2013.

SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 5, p. 380–390, 2002.

SONIS, S. T. A biological approach to mucositis. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2004a.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004b.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, A. S.; BURNS, J.; KEEFE, D.M. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 1, p. 96–106, 2007.

STRINGER, A.; GIBSON, R.; LOGAN, R.; BOWEN, J.; YEOH, A.; KEEFE, D. Faecal microflora and β-glucuronidase expression are altered in an irinotecan-induced diarrhoea model in rats. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1919–1925, 2008.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; LOGAN, A. K.; YEOH, A. S. J.; AL-DASOOQUI, N.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 5, p. 489-499, 2009.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304–318, 2015.

TAKASUNA K.; HAGIWARA, T.; WATANABE, K.; ONOSE, S.; YOSHIDA, S.; KUMAZAWA, E.; NAGAI, E.; KAMATAKI, T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 494–503, 2006.

TANG, X.; CHEN, S.; WANG, L. Purification and identification of carvacrol from the root of *Stellera chamaejasme* and research on its insecticidal activity. **Natural Product Research**, v. 25, n. 3, p. 320–325, 2011.

TRIFAN, O. C.; DURHAM, W. F.; SALAZAR, V. S.; HORTON, J.; LEVINE, B. D.; ZWEIFEL, B. S.; DAVIS, T. W.; MASFERRER, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Research**, v. 62, n. 20, p. 5778–5784, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ (UFPI). FORTES, A. C.; SOUSA, D. P.; NAKANO, E.; MORAES, J.; ANDRADE, L. N.; FREITAS, R. M. **Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose**. BR 1 O 2012 007004-9 A2, 19 mar. 2012, 19 nov. 2013.

UYANOGLU, M.; CANBEK, M.; ARAL, E.; HUSNU, CAN BASER K. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. **Phytomedicine**, v. 15, n. 3, p. 226–229, 2008.

VAN DEN BROUCKE, C. O.; LEMLI, J. A. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. **Planta Medica**, v. 45, p. 188–190, 1982.

VAN SEBILLE, Y. Z. A.; STANSBOROUGH, R.; WARDILL, H. R.; BATEMAN, E.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 50, p. 1-8, 2015.

VENDITTO, V. J.; SIMANEK, E. E. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 2, p. 307-349, 2010.

VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, n. 3, p. 159-164, 2015.

VINCENZI, M. D.; STAMMATI, A.; VINCENZI, A. D.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7, p. 801-804, 2004.

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and physiology of the small bowel. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 1–13, 2017.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOKE, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 16, p. 3888–3890, 1966.

WALSH, J. H. Gastrointestinal hormones. In: JOHNSON, L. R.; ALPERS, D. H.; CHRISTENSEN, J.; JACOBSON, E. D.; WALSH, J. H. (Org.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1994, p. 1–128.

WARDILL, H. R.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. New pharmacotherapy options for chemotherapy-induced alimentary mucositis. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 3, p. 347-354, 2014.

WONG, S. Y.; GRANT, I. R.; FRIEDMAN, M.; ELLIOTT, C. T.; SITU, C. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 5986–5990, 2008.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M.; GORDON, M. H.; RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.

YEOH, E.; RUSSO, A.; BOTTEN, R.; FRASER, R.; ROOS, D.; PENNIMENT, M.; BORG, M.; SUN, W. Acute effects of therapeutic irradiation for prostatic carcinoma on anorectal function. **Gut**, v. 43, n. 1, p. 123–127, 1998.

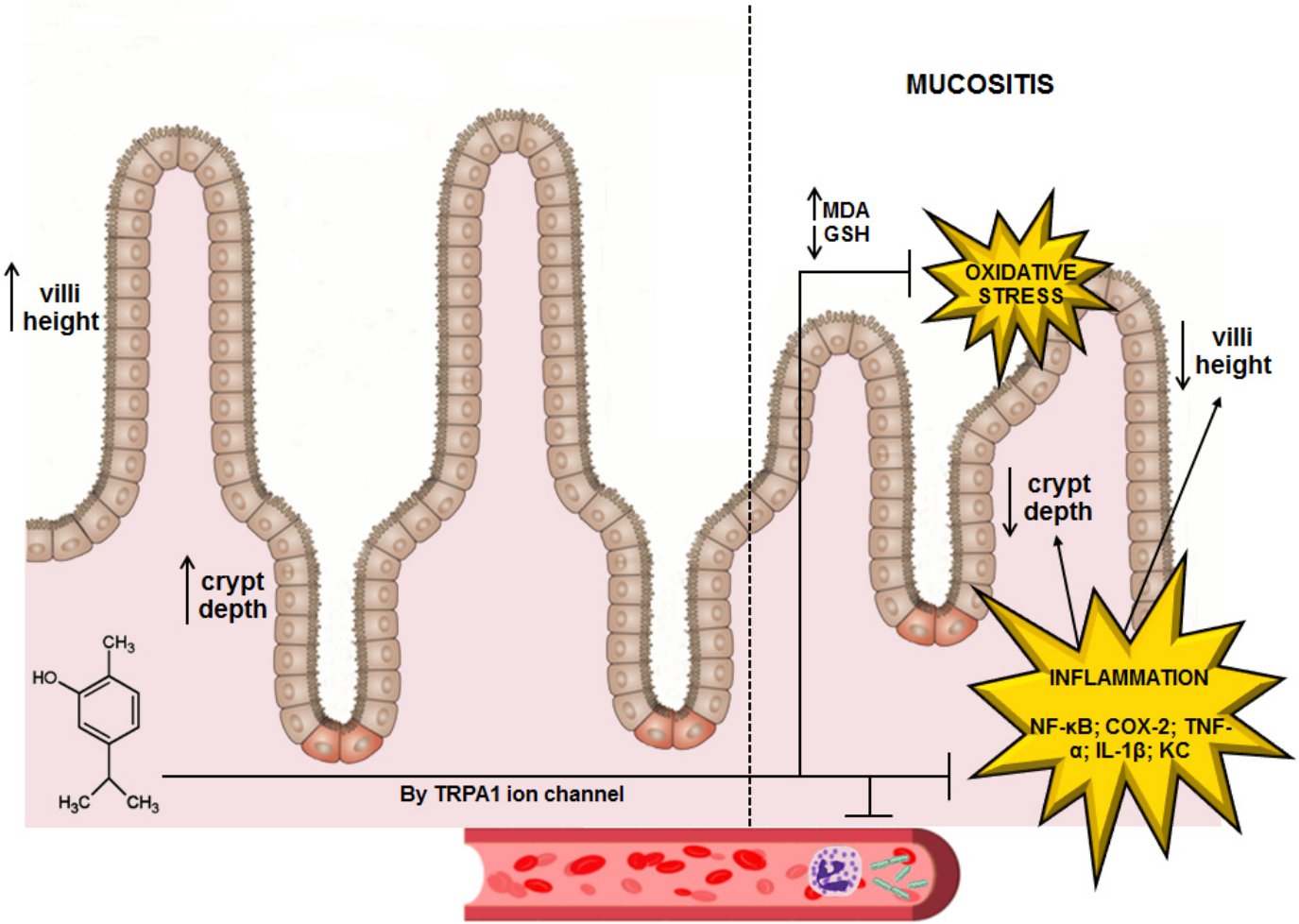
YEOH, A. S.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. Nuclear factor kappa B (NF-κB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. **International Journal of Radiation Oncology * Biology * Physics**, v. 63, n. 5, p. 1295–1303, 2005.

YEOH, A. S.; GIBSON, R.; YEOH, E.; BOWEN, J.; STRINGER, A.; GIAM, K.; LOGAN, R.; KEEFE, D. Radiation therapy-induced mucositis: relationships between fractionated radiation, NF-κB, COX-1, and COX-2. **Cancer Treatment Reviews**, v. 32, n. 8, p. 645–651, 2006.

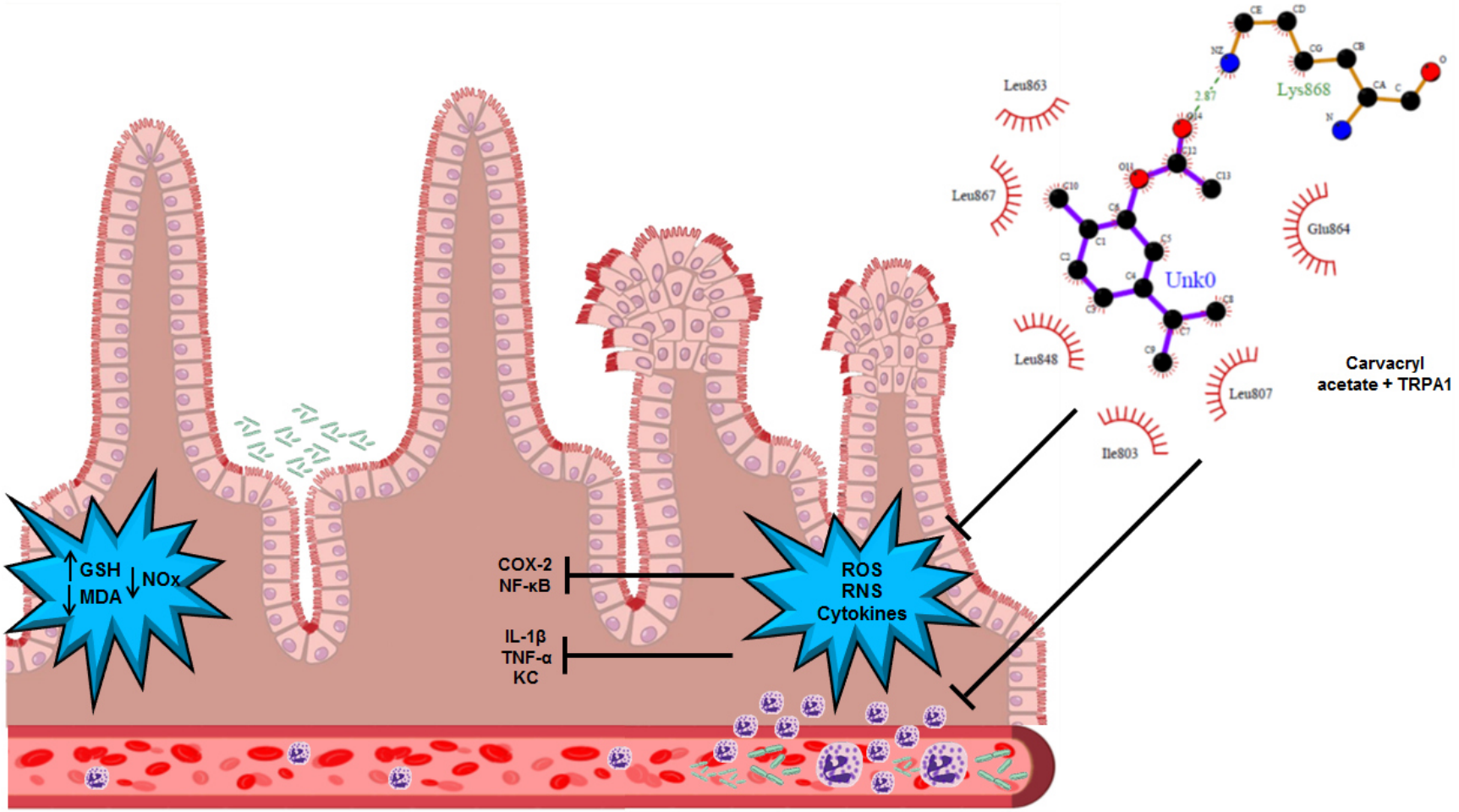
YIP, K. H.; HUANG, Y.; WAYE, M. M.; LAU, H. Y. Induction of nitric oxide synthases in primary human cultured mast cells by IgE and proinflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 764–768, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Graphical abstract que sumariza os resultados do artigo "Carvacrol reduces irinotecan-induced mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation" publicado no periódico Chemico-Biological Interactions.



APÊNDICE B – Graphical abstract que sumariza os resultados submetidos ao periódico Journal of Pharmacy and Pharmacology no artigo "Carvacryl acetate binds more favorably to the TRPA1 receptor than carvacrol does and is more effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice".



ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de publicação de artigo científico oriundo da tese no periódico nacional Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias (ISSN: 2237-0722; Qualis B4 em Biotecnologia).

www.revistageintec.net
ISSN: 2237-0722
revista GEINTEC Gestão, Inovação e Tecnologias

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA, COM ÊNFASE EM ATIVIDADE ANTIDIARREICA, DE CARVACROL E ACETATO DE CARVACROLILA

EXPLORATION TECHNOLOGY OF BIOLOGICAL ACTIVITY WITH FOCUS ON ANTIDIARRHEAL ACTIVITY OF CARVACROL AND CARVACRYL ACETATE

Elenice Monte Alvarenga[1]; Rivelilson Mendes de Freitas[1,2]; Jand-Venes Rolim Medeiros[1,3]
[1]Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO
Universidade Federal do Piauí – UFPI – Parnaíba/PI – Brasil
elenice_ma@hotmail.com
[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal do Piauí – UFPI – Brasil
rivmendes@hotmail.com
[3] Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (BIOTEC)
Universidade Federal do Piauí – UFPI – Parnaíba/PI – Brasil
jandvenes@ufpi.edu.br

Resumo

Nesta prospecção, objetivou-se realizar um estudo sobre atividades biológicas já descritas para o carvacrol e para o acetato de carvacrolila, com especial destaque para as eventuais aplicações destas substâncias enquanto agentes antidiarreicos. Para isso, foram obtidas informações sobre artigos científicos nas bases PubMed, Web of ScienceTM, Scopus e Scielo, bem como sobre documentos de patentes nas bases USPTO, EPO, WIPO e INPI, com o uso de palavras-chave e operadores boleanos específicos, sempre utilizados no campo de busca relativo ao resumo dos trabalhos. Desse modo, verificou-se que em bases de dados internacionais de artigos científicos, muitos são os trabalhos publicados envolvendo o carvacrol, mas há número relativamente baixo de documentos de patentes, principalmente, no que se refere à descrição de eventual ação antidiarreica do composto. Além disso, de modo generalizado nas bases de dados, tanto a produção científica em artigos, quanto os pedidos de depósito de patentes são escassos envolvendo o acetato de carvacrolila. Isso demonstra que há grandes oportunidades de pesquisa envolvendo a descrição da atividade biológica de compostos, como o carvacrol e o acetato de carvacrolila.

Palavras-chave: oléos essenciais, diarreia, patentes, desordem gastrintestinal.

ANEXO B – Comprovante de publicação de artigo científico oriundo da tese no periódico internacional Chemico-Biological Interactions (ISSN: 0009-2797; Qualis B1 em Biotecnologia; Impact Factor 3,143).

Chemico-Biological Interactions 260 (2016) 129–140

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

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

Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation

Elenice M. Alvarenga [a], Luan K.M. Souza [a], Thiago S.L. Araújo [a], Kerolayne M. Nogueira [a], Francisca Beatriz M. Sousa [a], Alyne R. Araújo [b], Conceição S. Martins [c], Dvison M. Pacífico [c], Gerly Anne de C. Brito [c], Emmanuel P. Souza [c], Damião P. Sousa [d], Jand Venes R. Medeiros [a, *]

[a] Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Gastrointestinal Disorders (Lafidg), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil
[b] Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil
[c] Postgraduate Program in Morphofunctional Sciences, Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
[d] Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 September 2016
Received in revised form
17 October 2016
Accepted 8 November 2016
Available online 9 November 2016

Keywords:
CPT-11
Cytokines
NF-κB
COX-2
Oxidative stress
Molecular docking

ABSTRACT

Intestinal mucositis is an inflammatory process occurring in the intestinal mucosa and is a common side effect of irinotecan hydrochloride (CPT-11) based anticancer regimens. The transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 (TRPA1) receptor is highly expressed in the intestinal mucosa and has the ability to identify cell damage signaling indicates its possible association with intestinal mucositis. Carvacrol is an agonist of the TRPA1 receptor and has anti-inflammatory properties. Thus, the aim of the present study was to verify the supposed anti-inflammatory and protective action of carvacrol via TRPA1 activation against intestinal mucositis induced by CPT-11 in mice. Briefly, mice were treated with either DMSO 2% or CPT-11 (75 mg/kg, per 4 days, i.p.) or the carvacrol (25, 75 or 150 mg/kg, per 8 days, i.p.) before CPT-11. In other group, the animals were pretreated with HC-030031, a TRPA1 antagonist, 30 min before treatment with carvacrol. On day 7, animal survival and bacteremia were assessed, and following euthanasia, samples of the jejunum were obtained for morphometric analysis and measurement of antioxidant and pro-inflammatory markers. Carvacrol was found to exert an anti-inflammatory action against CPT-11-induced intestinal mucositis through strong interactions with TRPA1 receptors; reduction in the production or release or both of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, and KC); and decrease in other indicators of inflammation (MPO, NF-κB, COX-2) and oxidative stress (GSH, MDA, and NOx levels). It also contributed to the restoration of the tissue architecture of the villi and crypts in the small intestine, and improved clinical parameters such as survival, body mass variation, leukogram, and blood bacterial count. Thus, TRPA1 could be a target for future therapeutic approaches in the treatment of intestinal mucositis.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

ANEXO C – Comprovante de aceite de artigo científico oriundo da tese no periódico internacional Journal of Pharmacy and Pharmacology (ISSN: 2042-7158; Qualis B1 em Biotecnologia; Impact Factor 2,405).

Journal of Pharmacy and Pharmacology - Decision on Manuscript ID JPP-17-0444.R1 [email ref: DL-RW-1-a]

Journal of Pharmacy and Pharmacology 26 de agosto de 2017
<onbehalfof+jppeditor+qub.ac.uk@manuscriptcentral.com> 06:24
Responder a: jppeditor@qub.ac.uk
Para: elenice.alvarenga@ifpi.edu.br, nayaranayvinsck@hotmail.com, simonedearaujo-fnt@hotmail.com, jrlp2009@hotmail.com, alyne_biomed@hotmail.com, iles630@gmail.com, dvisonpacifico@gmail.com, britogerly@hotmail.com, emmanuelprata@gmail.com, damiao_desousa@yahoo.com.br, jandvenes@ufpi.edu.br

26-Aug-2017

Dear Dr. Medeiros:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice" in its current form for publication in Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution. I look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. David Jones
Editor in Chief, Journal of Pharmacy and Pharmacology
jppeditor@qub.ac.uk

ANEXO D – Certificado de aprovação de projeto intitulado "Prospecção farmacológica de compostos de origem natural e sintética sobre a mucosite intestinal induzida por antineoplásicos" junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o nº de protocolo 080/2015.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Prospecção farmacológica de compostos de origem natural e sintética sobre a mucosite intestinal induzida por antineoplásicos**", protocolo nº **080/15**, sob a responsabilidade de **JAND VENES ROLIM MEDEIROS**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/112015.

Vigência do Projeto	**Dezembro/ 2015 à Dezembro/ 2019**
Espécie/Linhagem	**Camundongo isogênico/*Swiss***
Nº de Animais	**350**
Peso/ Idade	**20-35g/ 1 mês**
Sexo	**M + F**
Origem	**Biotério Central do CCA/UFPI, *campus* Ministro Petrônio Portela.**

Teresina, 27 de Novembro de 2015.

Profª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora