

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS–BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES REDOX-ATIVAS E CITOTÓXICAS OU
CITOPROTETORAS DO CARVACROL EM CULTURA DE CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

SOHEYLA MOHD SOUZA RABIE

PORTO ALEGRE, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS–BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES REDOX-ATIVAS E CITOTÓXICAS OU
CITOPROTETORAS DO CARVACROL EM CULTURA DE CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

ALUNA: SOHEYLA MOHD SOUZA RABIE

ORIENTADOR: PROF. DR. DANIEL PENS GELAIN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

PORTO ALEGRE, 2013.

*Dedico este trabalho à minha família, pelo incentivo
constante, compreensão e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Daniel Pens Gelain pela oportunidade, orientação e paciência em todos os momentos.

Aos amigos queridos do laboratório 32 pela amizade, ajuda e colaboração constante para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais pelo incentivo, exemplo de caráter e dedicação constante.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

À CAPES, CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS e PRONEX, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

PARTE 1	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1- INTRODUÇÃO	9
1.1. FAMÍLIA <i>LAMIACEAE</i>	11
1.2. MONOTERPENOS.....	12
1.3. CARVACROL	13
1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	15
1.5. SISTEMA ANTIOXIDANTE	16
1.6. SISTEMA NERVOSO CENTRAL/CARVACROL	18
2- OBJETIVOS	19
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
PARTE 2	20
3- MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. CULTURA CELULAR	21
3.2. TRATAMENTOS	21
3.2.1. CARVACROL	21
3.2.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	22
3.3. TESTE DE REDUÇÃO DE MTT	22
3.4. TESTE DE INCORPORAÇÃO DE SULFORRODAMINA B (SRB)	23
3.5. TESTE DE OXIDAÇÃO DE DCFH-DA EM PLACA	23
3.6. PERFIL CINÉTICO PRÓ OU ANTIOXIDANTE GERAL – TRAP (<i>TOTAL REACTIVE ANTIOXIDANT POTENTIAL</i>)	24
3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNA (LOWRY)	24
3.8. ANÁLISE MORFOLÓGICA	25
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4- RESULTADOS	27
4.1 ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	27
4.2 ESTUDOS DAS PROPRIEDADES REDOX-ATIVAS	40
PARTE 3	48
5- DISCUSSÃO	49
6- CONCLUSÃO	57
7- PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	59

Parte 1

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas através da respiração aeróbica e durante processos inflamatórios. Além disso, agressões externas como radiações, poluição, estresse, alcoolismo e tabagismo aumentam a sua produção. Altos níveis de ERO podem ocasionar dano oxidativo à lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a função normal da célula, podendo estar envolvidos na patogênese e agravamento de diversas doenças. Há evidências que sugerem que antioxidantes naturais presentes em alimentos conferem benefícios adicionais à saúde, atuando como anticarcinogênicos, antiinflamatórios ou agentes antimutagênicos. O orégano (*Oreganum sp*) é uma especiaria mediterrânea usada como condimento na alimentação e pela medicina popular para diversos tipos de moléstias. O óleo possui forte ação antimicrobiana, devido ao elevado conteúdo de monoterpenos, sendo os principais o carvacrol, o timol e o para-cimeno. O carvacrol (5-isopropil-2metilfenol) é um fenol monoterpênico, com sabor picante e odor característico e tem sido amplamente usado na indústria de alimentos como aditivo seguro para aumentar a vida útil dos alimentos, como aromatizante em produtos assados, doces, bebidas e gomas de mascar, e/ou agente antimicrobiano com atividades contra bactérias, fungos e leveduras. Estudos têm relatado efeito antidepressivo e ansiolítico do carvacrol em camundongos, assim como proteção contra a radiação UVB diminuindo a peroxidação lipídica, estresse oxidativo e danos no DNA em células linfocitárias humanas e atividade antioxidante em diferentes sistemas de lipídios. Nós avaliamos a viabilidade celular e parâmetros de citotoxicidade do carvacrol em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Este parece modificar levemente a morfologia das células, sem modificar significativamente a biomassa celular, parecendo ser tóxico na concentração de 100 µg/mL. Nas demais concentrações (1 a 50 µg/mL) não houve citotoxicidade. No ensaio de DCFH-DA o carvacrol reduziu a produção de ERO intracelular e diminui significativamente a produção de radicais peroxil no ensaio TRAP. Esses dados reforçam a ideia do carvacrol ser um potencial antioxidante, sendo necessários mais estudos para avaliar o mecanismo de ação deste composto.

Palavras chave: carvacrol, células SH-SY5Y, citotoxicidade.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are produced through aerobic respiration and during inflammation. Besides, external aggressions such as radiation, pollution, stress, alcoholism and smoking increase their production. Elevated levels of ROS can cause oxidative damage to lipids, proteins and DNA, compromising the normal cell function, and may be involved in the pathogenesis and progression of several diseases. There is suggesting that natural antioxidants found in foods provide additional health benefits, acting as anticarcinogenic, anti-inflammatory agents or antimutagenic. Oregano (*Oreganum* sp) is a Mediterranean spice used in food as a condiment and in popular medicine to treat several types of diseases. The essential oil has strong antimicrobial activity, due to the high content of monoterpenes, the main ones being carvacrol, thymol and para-cymene. Carvacrol (5-isopropyl-2metilfenol) is a phenol monoterpene with spicy taste and odor and has been widely used in food industry as additive to preserve foods, as flavoring agent in baked goods, candy, drinks and chewing gums, and/or antimicrobial agent with activity against bacteria, fungi and yeasts. Studies have reported antidepressant and anxiolytic effects of carvacrol in mice, as well as protection against UVB radiation, decreased lipid peroxidation, oxidative stress and DNA damage in human lymphocyte cells, and antioxidant activity in different lipid systems. We evaluated cell viability and cytotoxicity parameters of carvacrol in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. Carvacrol induced morphology changes in cells without significant modification of the cellular biomass content and it was toxic at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In other concentrations (1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) it showed no cytotoxicity. In DCFH-DA assay carvacrol reduced the intracellular ROS production and significantly decreased the production of peroxy radicals in the TRAP assay. These data reinforce the idea of carvacrol as a potential antioxidant and more research is needed to evaluate the mechanism of action of this compound.

Keywords: carvacrol, SH-SY5Y cells, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dicloridrato

BCRJ: Banco de células do Rio de Janeiro

BHT: Hidroxitolueno butilado

CAT: Catalase

DCFH-DA: 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína diacetato

DMEM: *Dulbecco's modified eagle médium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GPx: Glutaciona-peroxidase

GSH: Glutaciona reduzida

MTT: 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazolio brometo

PBS: *Phosphate buffered saline*

SFB: Soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

SRB: Sulforrodamina B

TCA: ácido tricloroacético

TNF- α : Fator de necrose tumoral

TRAP: *Total reactive antioxidant potential*

TRL2: *Toll-like receptor 2*

TRL4: *Toll-like receptor 4*

TXA2: Tromboxano A2

UVB: Radiação ultra-violeta

1- INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam um fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, sendo muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL, PINTO, VEIGA-JUNIOR, 2002). Além da comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, a importância da fitoterapia também reside na preservação da cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações (LEITE, 2000).

Como já revelado em diversos estudos, a fitoterapia é uma prática tradicional de saúde com finalidade terapêutica importante para uma parcela significativa da população (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006). O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana e a história tem mostrado que elas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, que obtiveram sucessos e fracassos, sendo que, muitas vezes, as plantas utilizadas curavam e em outras ocasiões produziam efeitos colaterais severos podendo levar ao óbito (DORTA et al, 1998; MACIEL, PINTO, VEIGA-JUNIOR, 2002).

Desde muito tempo antes da era moderna, egípcios, sírios e hebreus criavam medicamentos a partir de plantas que cultivavam e traziam de suas expedições. Na antiga Grécia, as plantas e o seu valor terapêutico ou tóxico eram muito conhecidos e Hipócrates (460-377 a.C.), denominado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra “*Corpus Hipocraticum*” a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado. Observa-se que as práticas da medicina tradicional são baseadas em crenças existentes há centenas de anos, antes mesmo do desenvolvimento da medicina científica moderna e prevalecem

até hoje, fazendo parte da tradição de cada país, onde as pessoas passam seus conhecimentos de uma geração a outra e sua aceitação é fortemente condicionada pelos fatores culturais (MARTINS et al, 2000).

No Brasil, o uso de ervas para fins medicinais é uma prática generalizada, decorrente da colonização por populações Europeias e Africanas, além de conhecimentos indígenas tradicionais (GOMES, DANTAS, CATÃO, 2008; MARTINS et al, 2000). A flora brasileira, aliada às influências e plantas trazidas pelos colonizadores, transformou o Brasil em um verdadeiro celeiro, onde plantas nativas e exóticas são utilizadas pela população, principalmente na forma de chás, decocções, “garrafadas” e na alimentação (CHEN, LIN, HSIEH, 2007).

Com os avanços ocorridos nas ciências da saúde, surgiram novas formas de tratamento e cura das doenças como o uso de medicamentos industrializados, que foram introduzidos no cotidiano das pessoas, não somente através dos profissionais de saúde como também, por campanhas publicitárias pelos próprios laboratórios que os produzem (BADEK et al, 2012). Mesmo com os avanços da indústria farmacêutica, o uso de plantas medicinais como forma de tratamento e cura de doenças permaneceu em várias partes do mundo observando-se uma crescente necessidade de valorizar o emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006).

O aumento do consumo de fitoterápicos atualmente pode ser associado à preocupação quanto ao uso abusivo e irracional de produtos farmacêuticos pela população, a qual procura substituí-los por plantas medicinais, ao alto custo dos medicamentos industrializados e ao difícil acesso da população à assistência médica (BADEK et al, 2012; LEITE, 2000). Além disso, registra-se a insatisfação da população

perante o sistema de saúde e a necessidade de poder controlar seu próprio corpo e recuperar sua saúde (LEITE, 2000).

Além da crença sobre o poder de cura de determinadas plantas, a fitoterapia evoluiu e sofisticou-se desempenhando um papel muito importante na medicina moderna. Portanto o conhecimento sobre o poder curativo das plantas não pode mais ser considerado apenas como tradição passada de pais para filhos, mas como ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas, ao longo dos tempos (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006; TUROLLA, NASCIMENTO, 2006).

Devido aos poucos trabalhos na literatura detalhando o potencial pró ou antioxidante de produtos fitoterápicos e de seus componentes ativos e dado o potencial farmacológico exibido por esses produtos para o desenvolvimento de medicamentos visando o combate de patologias diretamente associadas aos radicais livres, a necessidade de estudos sistemáticos e evidências experimentais se faz necessária para assim avaliar o uso terapêutico de produtos fitoterápicos bem como um melhor entendimento das propriedades redox-ativas dos compostos isolados dessas plantas.

1.1. Família *Lamiaceae*

Esta família é composta por diferentes plantas como ervas, arbustos e árvores que apresentam caules jovens quadrangulares, grande número de tricomas glandulares ricos em terpenos e flores bilabiadas com 5 pétalas (JUDD et al, 2002). Muitas plantas da família *Lamiaceae* têm importância hortícola e são utilizadas na medicina caseira, na indústria farmacêutica e cosmética, na produção de óleos essenciais e na culinária como condimento (SOUZA, LORENZI, 2005). Existem aproximadamente 300 gêneros que

são subdivididos em 7500 espécies, sendo 3500 nativas, principalmente, na área do Mediterrâneo (CUPPETT, HALL, 1998; SOUZA, LORENZI, 2005). São exemplos as espécies de alecrim (*Rosmarinus sp.*), sálvia (*Salvia sp.*), orégano (*Origanum sp.*), tomilho (*Thymus sp.*), manjeriço (*Ocimum sp.*), manjerona (*Marjorana sp.*), menta (*Mentha sp.*), segurelha (*Satureja sp.*), dentre outras, as quais são estudadas por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e medicinais (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; KRUPPA, RUSSOMANNO, 2008).

Os vegetais possuem atividades antioxidantes que são atribuídas a componentes específicos como vitamina C, betacaroteno e compostos fenólicos. A maioria destes compostos ativos possui estrutura similar, e apresenta pelo menos um anel aromático ligado a um grupo hidroxila, o qual ligado a outros compostos produz um arranjo de antioxidantes que atua através de diferentes mecanismos, conferindo um eficaz sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio (SHAHIDI, 1997).

A capacidade antioxidante das *Lamiaceae* é atribuída, principalmente, à grande quantidade de compostos fenólicos presentes, entre eles encontram-se os monoterpenos carvacrol, para-cimeno e timol, que são predominantemente encontrados nas espécies de *Origanum sp.*, *Satureja sp.* e *Thymus sp.* (SERRANO et al, 2011; COSGE et al, 2011; LIOLIOS et al, 2009).

1.2. Monoterpenos

Os monoterpenos são constituintes moleculares de frutas, óleos essenciais de frutas cítricas e ervas pertencentes a um grupo de compostos químicos denominados terpenos, que são formados a partir de duas unidades de isoprenos ligados entre si, possuindo um total de 10 carbonos. São os maiores representantes dos óleos essenciais,

constituindo cerca de 90% destes, com diferentes estruturas podendo ser classificados em cetonas, álcoois, fenóis, aldeídos, ésteres, entre outros, de acordo com a sua função (BAKKALI et al, 2008). Entre as propriedades já observadas em estudos prévios destacam-se as de antimicrobiana, hipotensor, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena (ARISTATILE et al, 2010; ARUNASREE 2010; NOSTRO et al, 2012; WAGNER, ELMADFA, 2003; YANISHLIEVA, 1999) e mais recentemente de protetor gástrico e anti-úlceras (OLIVEIRA et al, 2012; SILVA et al, 2012).

Estes compostos têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica como aromas em fragrâncias e medicamentos devido ao grande potencial terapêutico que apresentam e baixo custo financeiro na sua utilização (GHASEMI et al, 2009). Já se sabe que os monoterpenos presentes em alimentos possuem baixa toxicidade sendo esta uma vantagem na busca por novos compostos com atividade terapêutica. Um exemplo é o capim-limão, amplamente utilizado como matéria-prima para a síntese de α e β -ionona, na perfumaria e na síntese de vitamina A (PRINS et al., 2008).

1.3. Carvacrol

Muitas pesquisas têm demonstrado que os óleos essenciais e seus principais componentes possuem uma ampla atividade biológica, podendo ser de grande utilidade na indústria farmacêutica e alimentícia (CRISTIANI et al, 2007). O orégano (*Oreganum sp*) é uma especiaria mediterrânea usada como condimento na alimentação e pela medicina popular para diversos tipos de patologias. O chá fitoterápico é empregado para tratar azia, tosse, resfriados, distúrbios do estômago, psoríase, aftas e doenças fúngicas, entre outras (GUNTHER, 1968 apud BASER, 2008). O óleo de orégano possui forte

ação antimicrobiana, devido ao elevado conteúdo de monoterpenos, sendo os principais o carvacrol, o timol e o para-cimeno, (LIOLIOS et al, 2009), estando o carvacrol presente em maior quantidade, equivalendo de 60 a 74% da sua composição (ULTEE, KETS, SMID, 1999).

O carvacrol é quimicamente denominado 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso de 150,22 g/mol (Fig.1). Apresenta-se em forma líquida de coloração amarelo claro, cuja densidade é de 0,975 g/ml (20°C). O carvacrol possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, bem como, pouca solubilidade em água. Seu ponto de fusão é de 2°C e seu ponto de ebulição é de 234 – 236°C.

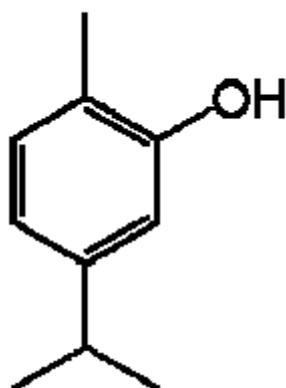


Figura 1: Fórmula molecular do Carvacrol.

O carvacrol é um componente de óleos essenciais encontrados em grande quantidade no óleo de orégano e tomilho, com sabor picante e odor característico (MELO et al, 2010) e tem sido amplamente usado na indústria de alimentos como aditivo seguro para aumentar a vida útil dos alimentos, como aromatizante em produtos assados, doces, bebidas e gomas de mascar, e/ou agente antimicrobiano com atividades

contra bactérias, fungos e leveduras (KNOWLES et al 2005; ULTEE et al 2000). Martínez-Romeno et al (2007) encontrou atividade antifúngica do carvacrol, podendo ser usado como alternativa natural a fungicidas sintéticos para evitar a deterioração de uvas no armazenamento pós-colheita.

Estudos tem relatado efeito antidepressivo e ansiolítico (MELO et al, 2010) do carvacrol em camundongos, assim como proteção contra a radiação UVB diminuindo a peroxidação lipídica, estresse oxidativo e danos no DNA em células linfocitárias humanas (ARISTATILE et al, 2010) e atividade antioxidante em diferentes sistemas de lipídios (YANISHLIEVA, 1999). Segundo Liang e Lu (2012), o carvacrol induz a morte celular *in vitro* em cultura de células de glioblastoma humano e de células de câncer de mama (ARUNASREE, 2010) apresentando efeito anti-proliferativo. Recentemente também tem sido atribuída capacidade anti-inflamatória e de atenuar a hipernocicepção em camundongos (GUIMARÃES et al, 2010, 2012; SILVA et al, 2012) assim como efeito anti-ulcerativo (SILVA et al, 2012) e antiobesogênico (CHO et al, 2012).

1.4. Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o íon superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO) são produzidas através da respiração aeróbica e durante processo inflamatório. Além disso, agressões externas como radiações, poluição, estresse, alcoolismo e tabagismo aumentam a sua produção (YILDIRM et al, 2000). EROs são liberadas no espaço extracelular por neutrófilos e macrófagos residentes nos tecidos, por enzimas associadas a membranas,

tais como a NADPH oxidase, mieloperoxidase, e enzimas solúveis, como a xantina oxidase e óxido nítrico sintase. (CSÁNYI, TAYLOR, PAGANO, 2009; KIELLAND, et al 2009).

Em concentrações não-patológicas, as EROs desempenham um papel molecular de sinalização celular e regulação de diversos processos fisiológicos (KIELLAND, et al 2009). No entanto, altos níveis de EROs podem ocasionar dano oxidativo à lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a função normal da célula (GENESTRA, 2007; VALKO et al., 2007). Dentre os componentes celulares suscetíveis à ação das EROs, a membrana celular é um dos mais atingidos devido a grande disponibilidade e suscetibilidade dos ácidos graxos polinsaturados da membrana à peroxidação lipídica, tendo como produtos finais o malondialdeído, o etano e o pentano (SOUZA, FERNANDEZ, CYRINO, 2006).

1.5. Sistema antioxidante

O organismo dispõe de mecanismos protetores conhecidos como sistemas antioxidantes de defesa, que retardam e/ou previnem o acúmulo de espécies reativas e seus efeitos deletérios (NIKI, 2009). Os sistemas antioxidantes de defesa podem ser enzimáticos, sendo representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona-peroxidase (GPx) e os não-enzimáticos, que incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathiona, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Os sistemas de defesa antioxidante controlam os níveis de espécies reativas, mas não as eliminam e, conseqüentemente, o dano oxidativo às biomoléculas não é

completamente evitado (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Um desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa leva à modificação oxidativa das moléculas intracelulares ou da membrana celular (KAPLAN et al, 2007).

As EROs estão envolvidas na patogênese e agravamento de diversas doenças, tais como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e processos inflamatórios crônicos e agudos, entre outras (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Além disso, as EROs podem causar peroxidação de lipídios em alimentos durante o processo de fabricação e armazenamento, o que conseqüentemente leva à perda de qualidade e segurança alimentar (MAU et al, 2004).

Há evidências que sugerem que antioxidantes naturais presentes em alimentos conferem benefícios adicionais à saúde, atuando como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios ou agentes antimutagênicos. No entanto, dependendo de suas concentrações e potenciais interações com outros componentes do microambiente celular, muitas substâncias tradicionalmente consideradas “antioxidantes” podem atuar como agentes redox ativos, promovendo estresse oxidativo e dano irreversível a biomoléculas. Micronutrientes, tais como polifenóis ou vitaminas, podem atuar dessa maneira, agindo como antioxidantes em certas doses ou como pró-oxidantes em elevadas concentrações (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2008).

Assim, terapias com base em antioxidantes têm sido sugeridas para o tratamento de tais patologias, utilizando compostos naturais que previnem ou diminuem a ação danosa de espécies reativas em determinados órgãos e sistemas. Sabe-se que parte significativa da população brasileira utiliza uma grande variedade de plantas medicinais no tratamento de doenças crônicas e agudas. Isso se deve a fatores como baixo poder

aquisitivo e acesso limitado aos serviços de saúde, associados à disposição de uma rica e variada flora regional de fácil acesso para uso medicinal (SANTOS et al., 2008).

1.6. Sistema nervoso central/carvacrol

A fim de elucidar os efeitos atribuídos ao carvacrol em relação às propriedades antioxidantes e/ou pró-oxidantes em cultura de células SH-SY5Y e devido à escassez de trabalhos na literatura detalhando esse potencial, diversos parâmetros foram analisados associando o carvacrol, os sistemas de defesa antioxidantes e possível toxicidade dessa substância.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

Uma vez que espécies reativas e estresse oxidativo exercem um papel central em diversos processos patológicos, fisiológicos e de toxicidade, e considerando a escassez de dados sobre os potenciais efeitos e mecanismos de ação terapêutica do carvacrol, bem como de informações detalhadas sobre sua potencial toxicidade, o presente projeto tem como objetivo determinar o perfil redox-ativo do carvacrol e seu efeito sobre parâmetros de estresse oxidativo e de viabilidade e toxicidade em culturas de células da linhagem derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.2 Específicos

- Determinar o perfil cinético pró- ou antioxidante geral não-enzimático – TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*);
- Avaliar a viabilidade celular através de ensaios de redução de 3-(4,5-dimetil)-2,5- difeniltetrazolio brometo (MTT) e de incorporação de Sulforrodamina B (SRB).
- Avaliar a produção intracelular de espécies reativas pelo teste de oxidação de DCFH-DA em placa.
- Avaliar a ação do carvacrol frente a um tratamento pró-oxidante (peróxido de hidrogênio).

Parte 2

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

Células da linhagem derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y obtidas do BCRJ foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio DMEM/F12 (1:1) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1% de fungicida (anfotericina-B), 0,72% de antibiótico gentamicina em pH 7.4, a 37 graus Celsius em estufa de incubação de células com 95% de ar umidificado e 5% CO₂. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 6 poços (9 cm² de área total por poço) ou de 96 poços (0.3 cm² de área) na densidade inicial de 20.000 células por cm² e utilizadas para experimento (início dos tratamentos) após 24 horas (GELAIN, MOREIRA, 2008). As células foram incubadas por 1, 4, 24, 48 e 72 horas com concentrações variadas de carvacrol (1 µg/mL a 100 µg/mL) na presença ou ausência de concentrações citotóxicas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em seguida, as células foram utilizadas para avaliar o estresse oxidativo, a atividade antioxidante não-enzimática, além de parâmetros de citotoxicidade descritos a seguir.

3.2. Tratamentos

3.2.1. Carvacrol

O carvacrol (98% de pureza, líquido) foi obtido comercialmente (SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Uma solução-mãe foi preparada pela homogeneização em uma

mistura de água destilada (70%) e DMSO (30%) na concentração de 6 mg/ml. A partir dessa solução-mãe foram realizadas as diluições no meio de incubação de forma a atingir as concentrações utilizadas nesse estudo. A maior concentração de DMSO no meio de incubação foi de 0,5%, sendo esta a concentração utilizada nos grupos “veículo”.

3.2.2. *Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)*

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como indutor de dano oxidativo nas células. Foram utilizadas duas concentrações de H₂O₂, uma para induzir um estado de estresse oxidativo mais prolongado, em uma concentração baixa (“estresse crônico”, caracterizado por incubações de 48 e 72 horas com H₂O₂ 100 µM) e outra para avaliar o efeito do carvacrol em um estresse agudo, com uma concentração mais alta (H₂O₂ 1 mM nos períodos de 1, 4 e 24 horas de tratamento).

3.3. Teste de redução de MTT

Para determinar a viabilidade celular após os tratamentos, as células foram incubadas por aproximadamente 40 minutos com MTT (3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazolio brometo) na concentração final de 0,5 mg/mL adicionado ao meio de incubação. Em seguida o meio foi desprezado e foi adicionado DMSO às placas, sendo estas incubadas por 15 minutos no escuro, para solubilização completa do produto da redução do MTT, o formazan azul. A absorbância a 540 nm desse produto foi determinada espectrofotometricamente (GELAIN et al, 2004).

3.4. Teste de incorporação de Sulforrodamina B (SRB)

Para determinação da densidade celular, após os tratamentos o meio foi descartado e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e mantidas em temperatura de 4 graus Celsius por 1 hora. Após o TCA foi descartado e as células lavadas com água destilada e mantidas à temperatura ambiente até a completa secagem da placa. Depois foi adicionada a Sulforrodamina B diluída em ácido acético a 1% e a placa colocada pra secar em temperatura ambiente por 15 minutos. Ao final a placa foi lavada com ácido acético a 1% para retirada do corante em excesso. O corante foi solubilizado em solução Tris base 10 mmol/L (pH 10,5) e a placa foi lida em espectrofotômetro a 515nm (VICHAI, KIRTIKARA, 2006).

3.5. Teste de oxidação de DCFH-DA em placa

A produção intracelular de espécies reativas foi determinada pela quantificação da oxidação da 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), conforme descrito previamente (GELAIN, MOREIRA, 2008). Antes das incubações com carvacrol, as células foram tratadas por 1 hora com DCFH-DA 100 μ M (solução estoque em DMSO, 10 mM) dissolvido em meio de cultura contendo 1% de soro fetal bovino em atmosfera de 5% CO₂ e 37 graus Celsius. O DCFH-DA é hidrolisado por esterases extracelulares e oxidado por EROs intracelulares a DCF que é fluorescente e não permeável a membrana plasmática. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e os tratamentos iniciados. O aumento ou diminuição da fluorescência causada pela oxidação do DCFH e formação do produto fluorescente DCF por espécies reativas

intracelulares foi monitorada ao longo de 1, 4 e 24 horas (estresse agudo) ou ao longo de 24, 48 e 72 horas (estresse crônico) em leitor de fluorescência (excitação de 485 nm e emissão de 530 nm).

3.6. Perfil cinético pró ou antioxidante geral – TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*)

O potencial reativo antioxidante total (TRAP) é empregado para avaliar a capacidade antioxidante não-enzimática de uma amostra *in vitro*. Este método é baseado na supressão da quimioluminescência do luminol (CL), derivada da termólise de 2,20-azo-bis(2 amidinopropano)dicloridrato (AAPH) como fonte de radicais livres (DRESCH et al., 2009). Após os tratamentos, as células foram raspadas, lisadas pelo processo de congelamento e descongelamento, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para posterior análise. Foi preparado o sistema com 4 mL AAPH e 10 µL luminol em tampão glicina 0,1 M (pH 8.6) e mantido em repouso por 2 horas para estabilização, e trolox 200 nM foi utilizado como controle positivo. Foi adicionado na placa de 96 poços 10 µL de amostra e 190 µL de sistema e a quimioluminescência foi monitorada por aproximadamente 2 horas.

3.7. Dosagem de Proteína (Lowry)

Após os tratamentos, as células foram raspadas, lisadas por congelamento e descongelamento, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido em um microtubo *epENDORF* para posterior análise. As amostras foram submetidas ao teste de Lowry para

a dosagem de proteínas. Num *ependorf* foram adicionados 10 μL de amostra, 190 μL de tampão PBS pH 7,4 e 1000 μL de Reativo C (Sulfato de cobre 1% na proporção de 1:100, tartarato duplo de sódio e potássio 2% na proporção de 1:100 e reativo A) sendo incubados por 15 minutos. A seguir foi adicionado 100 μL de Folin 2 N e incubado por 30 minutos. Após esse período 200 μL foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura em espectrofotômetro a 700 nm foi realizada em leitor de placa. Para realização do cálculo da quantidade de proteína foi realizada uma curva padrão utilizando albumina bovina purificada (LOWRY et al. 1951).

3.8. Análise morfológica

A análise morfológica das células SH-SY5Y foi realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação com carvacrol nas concentrações de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ associadas ou não ao H_2O_2 na concentração de 100 μM . Foi observada a viabilidade celular (adesão ao substrato, estimativa do número de células), parâmetros morfológicos de funcionalidade celular (tamanho e ramificação de extensões neuríticas) e modificações possivelmente relacionadas à morte celular programada ou necrose, tais como “*blebbing*” celular (formação de vesículas apoptóticas) ou desprendimento do substrato (típico de necrose). As imagens foram visualizadas por microscopia de contraste de fase em microscópio Nikon Eclipse TE300 e capturadas pelo software NIS-Elements F versão 3.2, e os parâmetros descritos acima foram analisados em três amostras independentes.

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0, e os testes estatísticos por ANOVA de uma via com *post-hoc* de Tukey. De acordo com a natureza do experimento e por ANOVA de duas vias, porém os dados feitos por essa análise não foram estatisticamente relevantes para o nosso estudo.

4- RESULTADOS

4.1 Estudos de viabilidade celular

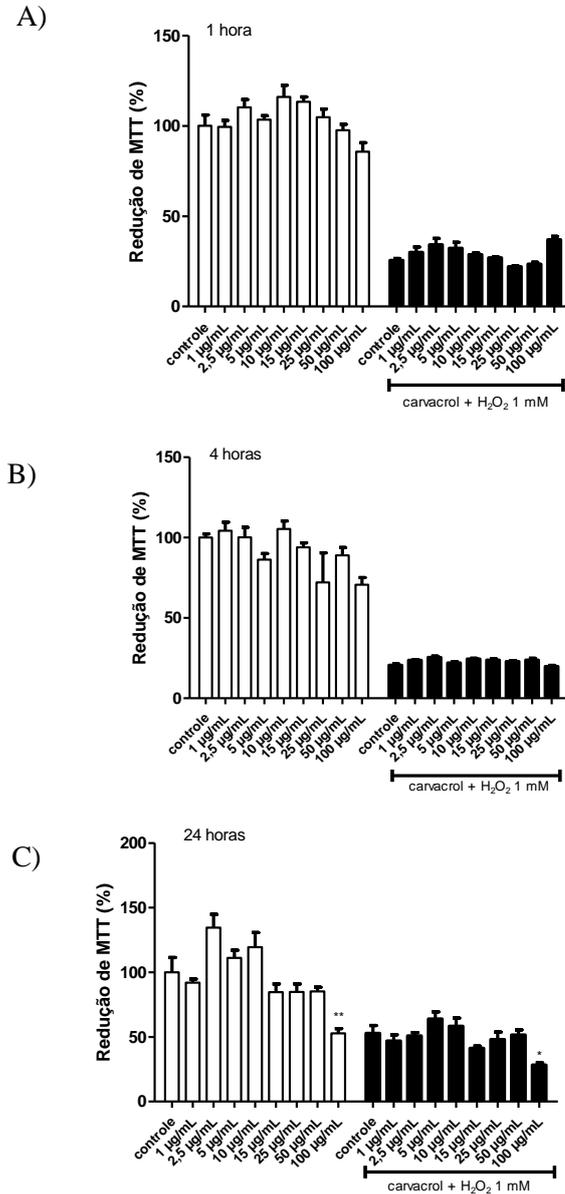


Figura 2: Ensaio de MTT. Células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de carvacrol durante 1 h (A), 4 h (B), e 24 horas (C) a 37 ° C em 5% de CO₂ conforme descrito em materiais e métodos. H₂O₂ 1 mM foi usada como controle positivo para a morte celular. Os dados foram expressos como porcentagem de formação de formazan em relação às células não tratadas (controle). Dados expressos em média ± desvio padrão de três experiências diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido por teste *post hoc* de Tukey. *p < 0,0001.

Inicialmente estudamos a atividade citotóxica do carvacrol em cultura de células SH-SY5Y através do ensaio de redução de MTT, que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, indicando o estado de viabilidade metabólica. Foram avaliados os efeitos de concentrações crescentes de carvacrol no meio de incubação, variando de 1 a 100 µg/mL, nos tempos de 1, 4, 24, 48 e 72 horas. Em tempos mais curtos (1 e 4 horas de incubação), houve uma grande variabilidade de valores de redução de MTT entre os grupos, sendo que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre esses grupos (Figura 2A e 2B). No período de 24 horas de incubação, houve um aumento na redução de MTT causado pelo carvacrol na concentração de 2,5 µg/mL, enquanto que a concentração de 100 µg/mL causou uma diminuição na redução de MTT (Figura 2C). Para investigar o efeito dessas concentrações de carvacrol frente a um insulto pró-oxidante agudo, as células foram coincubadas com H₂O₂ 1 mM (Figuras 2A, 2B e 2C). Nenhuma concentração de carvacrol alterou o efeito do H₂O₂ 1 mM na redução de MTT pelas células SH-SY5Y.

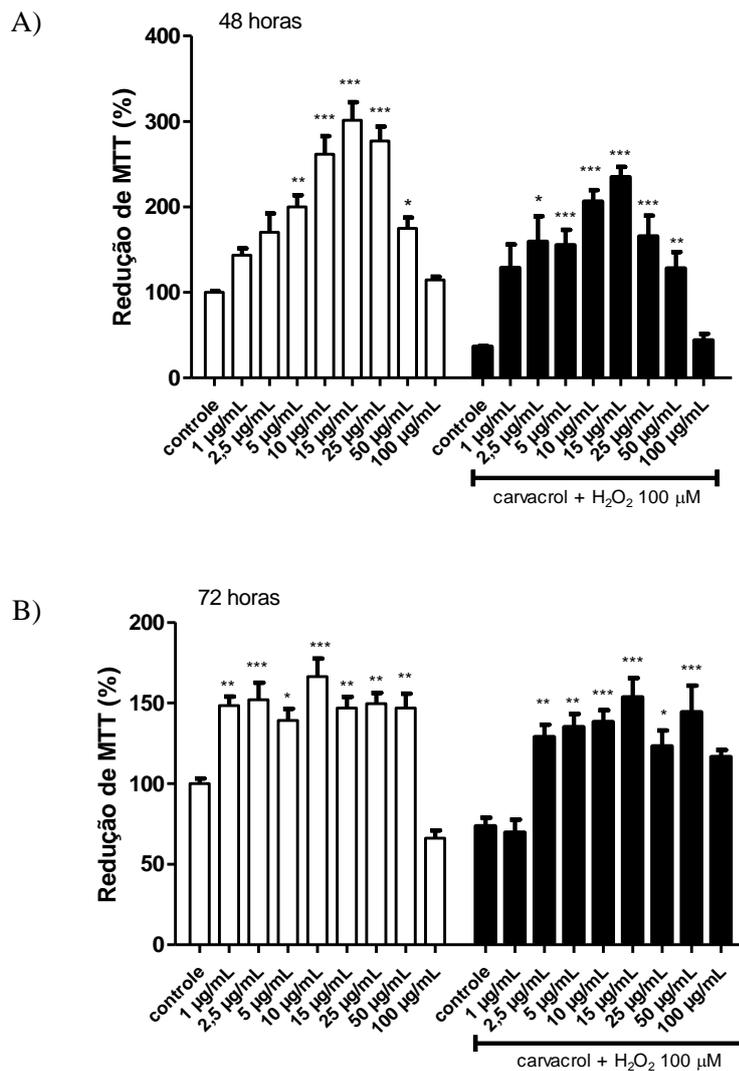


Figura 3: Ensaio de MTT. Células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de carvacrol durante 48 h (A) e 72 h (B) a 37 ° C em CO₂ 5%. Conforme descrito em materiais e métodos. H₂O₂ 100 μM foi usada como controle positivo para a morte celular. Os dados foram expressos como porcentagem de formação de formazan em relação as células não tratadas (controle). Dados expressos em média ± desvio padrão de três experiências diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido por teste *post hoc* de Tukey. ***p < 0,0001, **p < 0,001. *p < 0,01.

A redução de MTT em células tratadas com carvacrol também foi avaliada em tempos mais longos de incubação (48 e 72 horas). Carvacrol nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL e 25 µg/mL apresentou um aumento na redução de MTT quando comparado com o controle no período de 48 horas (Figura 3A), enquanto que em 72 horas de incubação todas as concentrações testadas, exceto a concentração de 100 µg/mL, induziram um aumento na redução de MTT (Figura 3B). Nestes tempos, também avaliamos o efeito do carvacrol contra um estímulo pró-oxidante mais atenuado utilizando H₂O₂ 100 µM, visando um modelo celular de estresse oxidativo crônico, em comparação com o modelo de dano agudo com H₂O₂ 1 mM em tempos curtos. Nessas condições, o carvacrol nas concentrações de 1 a 50 µg/mL reverteu significativamente a diminuição na redução de MTT causada pelo H₂O₂ 100 µM em 48 horas de incubação (Figura 3A), enquanto que em 72 horas apenas a concentração de 1 µg/mL não alterou o efeito do H₂O₂ 100 µM (Figura 3B).

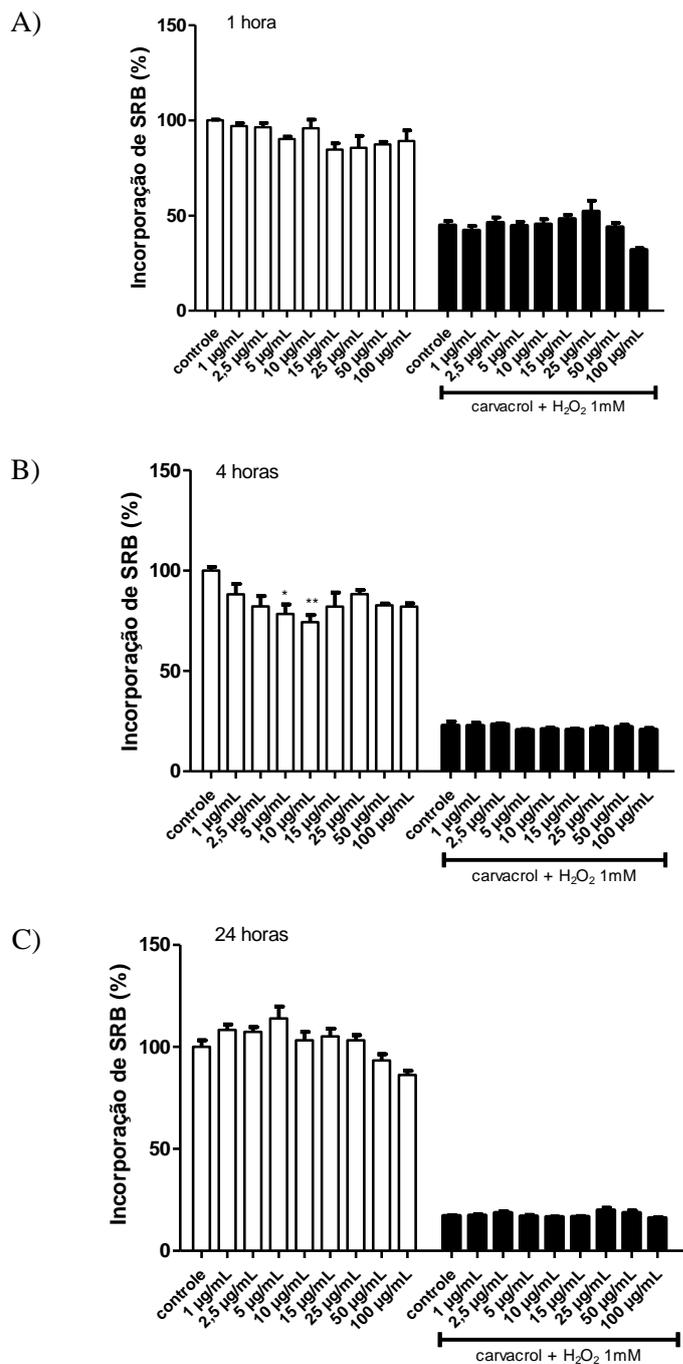


Figura 4: Ensaio de SRB. Células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de carvacrol durante 1 h (A), 4 h (B) e 24 h (B) a 37 ° C em CO₂ a 5% conforme descrito em materiais e métodos. H₂O₂ 1 mM foi usada como controle positivo para a morte celular. Os dados foram expressos como porcentagem de incorporação de SRB em relação às células não tratadas (controle). Dados expressos em média ± desvio padrão de três experiências diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido por teste *post hoc* de Tukey. **p < 0,001. *p < 0,01.

Também avaliamos a citotoxicidade do carvacrol através do teste de incorporação de sulforrodamina B (SRB), o qual é baseado na reação de alta sensibilidade do corante SRB com proteínas celulares previamente fixadas com ácido tricloroacético, refletindo linearmente a quantidade de biomassa celular. Observamos que o carvacrol não induziu uma modificação significativa após 1 hora de tratamento, sendo que também não foi observada nenhuma modificação no efeito causado pelo H₂O₂ 1 mM nesse parâmetro (Figura 4A). Após 4 horas de incubação, o carvacrol causou uma diminuição pequena, porém significativa, na incorporação de SRB (Figura 3B), enquanto que em 24 horas de incubação observamos um modesto aumento da incorporação de SRB induzido pela concentração de 5 µg/mL e uma diminuição desse parâmetro com a concentração de 100 µg/mL (Figura 4C). Nestes tempos de incubação, também não foi observado nenhum efeito do carvacrol sobre a citotoxicidade causada pelo H₂O₂ 1 mM.

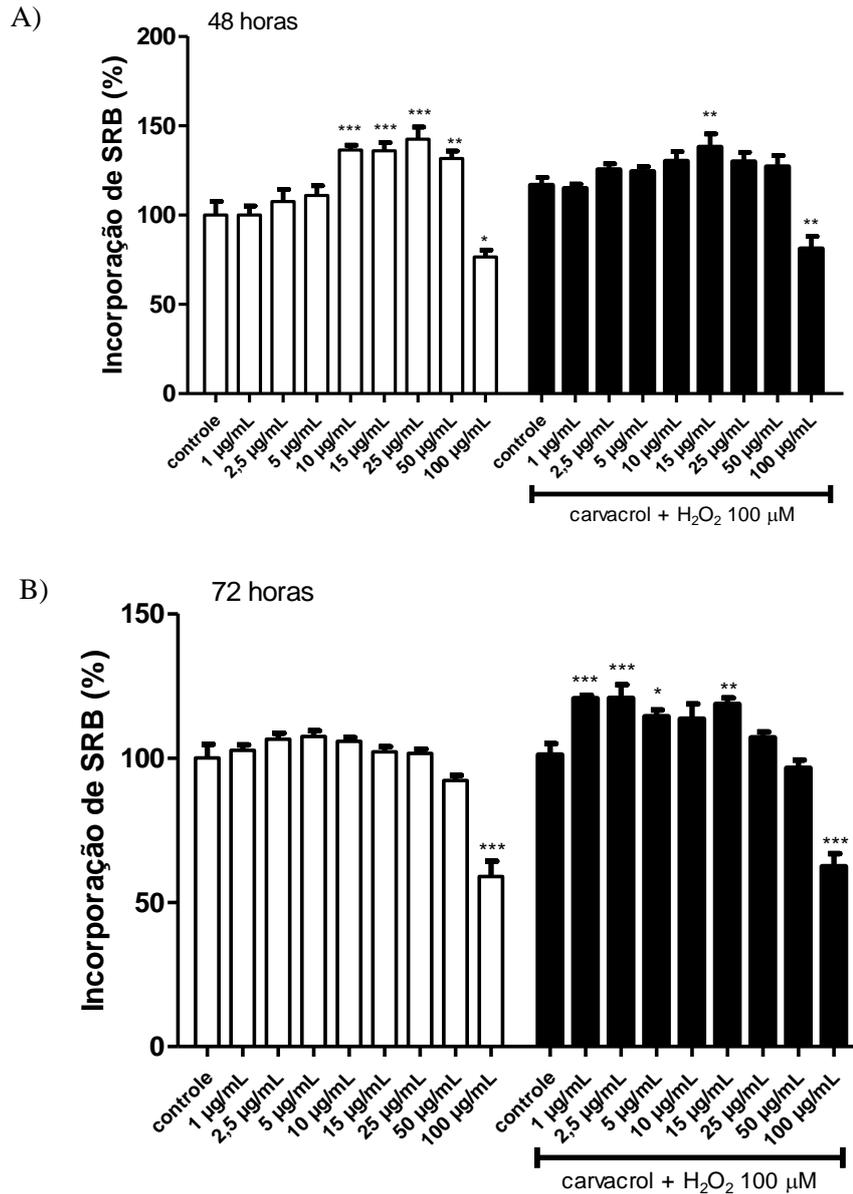


Figura 5: Ensaio de SRB. Células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de carvacrol durante 48 h (A) e 72 h (B) a 37 ° C em CO₂ a 5% conforme descrito em materiais e métodos. H₂O₂ 100 μM foi usada como controle positivo para a morte celular. Os dados foram expressos como porcentagem de incorporação de SRB em relação as células não tratadas (controle). Dados expressos em média ± desvio padrão de três experiências diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido por teste *post hoc* de Tukey. ***p < 0,0001, **p < 0,001, *p < 0,01.

A incorporação de SRB também foi avaliada em tempos mais longos de incubação com o carvacrol, utilizando o modelo de estresse crônico com H_2O_2 100 μM . Em 48 horas de incubação, as concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carvacrol apresentaram um aumento significativo na incorporação de SRB comparado ao controle, enquanto que a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou uma diminuição (Figura 5A). No tempo de 72 horas de incubação, apenas a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi observada ser capaz de diminuir a incorporação de SRB (Figura 5B). A incubação das células SH-SY5Y por 48 e 72 horas com H_2O_2 100 μM não causou uma perda significativa de biomassa proteica em relação ao controle; no entanto, em relação ao grupo tratado somente com H_2O_2 nesses tempos, o carvacrol 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou um aumento na incorporação de SRB em 48 horas e nas concentrações de 1 a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentou a incorporação de SRB em 72 horas (Figuras 5A e 5B). Além disso, o carvacrol na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou a mesma citotoxicidade na presença ou ausência do H_2O_2 nos dois tempos de incubação (Figuras 5A e 5B).

24 horas

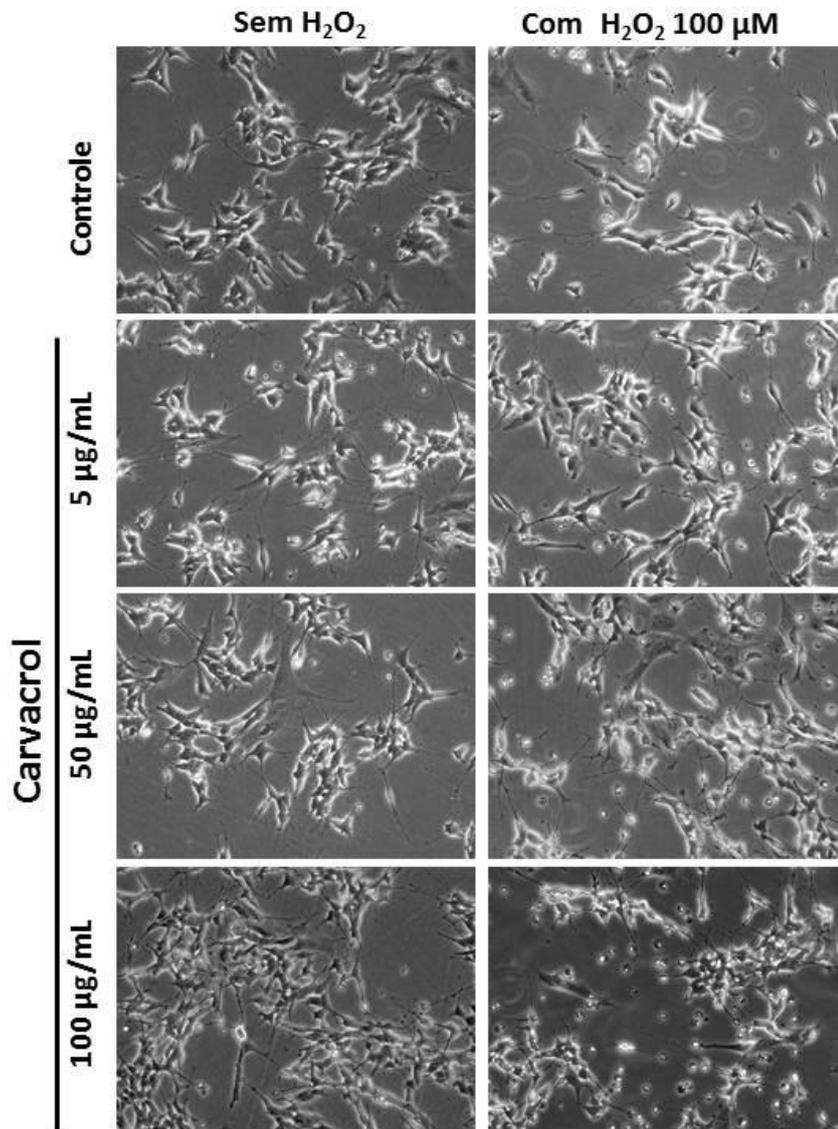


Figura 6: Efeitos morfológicos de médio prazo do tratamento de células SH-SY5Y com carvacrol. A microscopia de contraste de fase de células SH-SY5Y, após 24h de tratamento com diferentes concentrações de carvacrol, na ausência ou na presença de H₂O₂ (100 μM). Fotomicrografias representativas de três experiências independentes, 200X.

48 horas

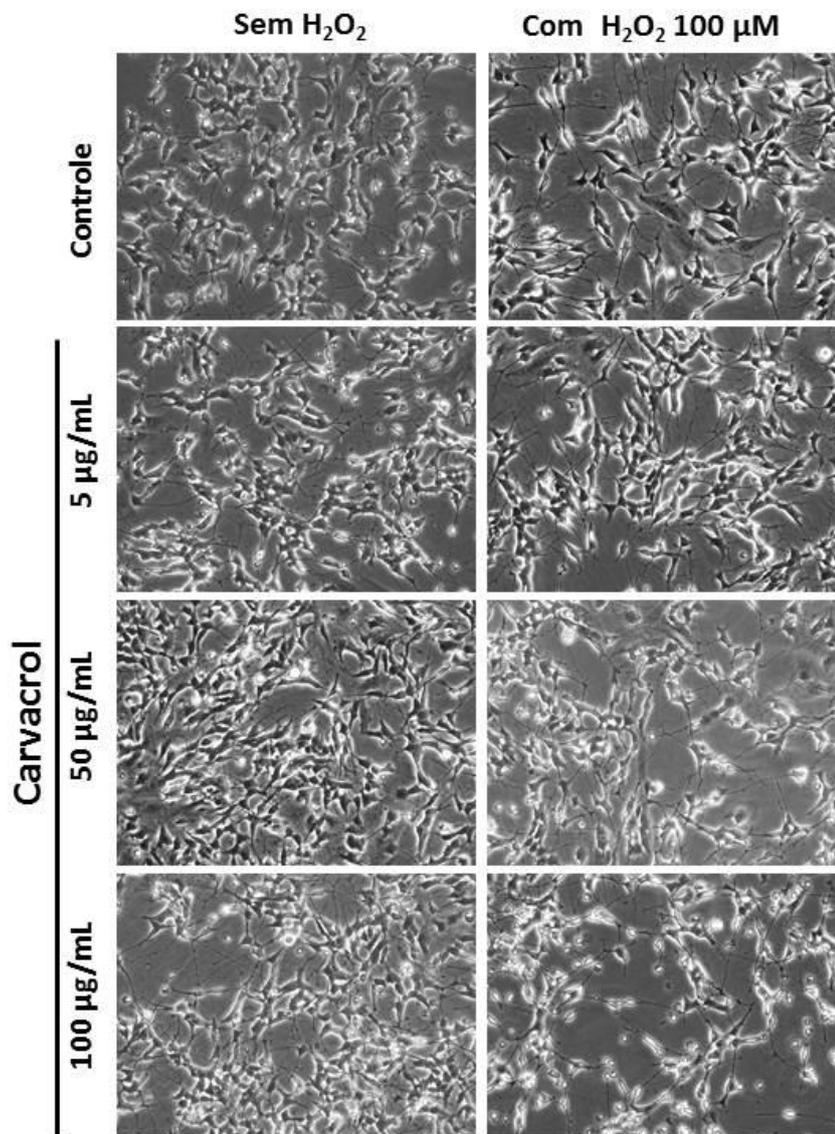


Figura 7: Efeitos morfológicos de longo prazo do tratamento de células SH-SY5Y com carvacrol. A microscopia de contraste de fase de células SH –SY5Y, após 48h de tratamento com diferentes concentrações de carvacrol, na ausência ou na presença de H₂O₂ (100 μM). Fotomicrografias representativos de três experiências independentes, 200X.

72 horas

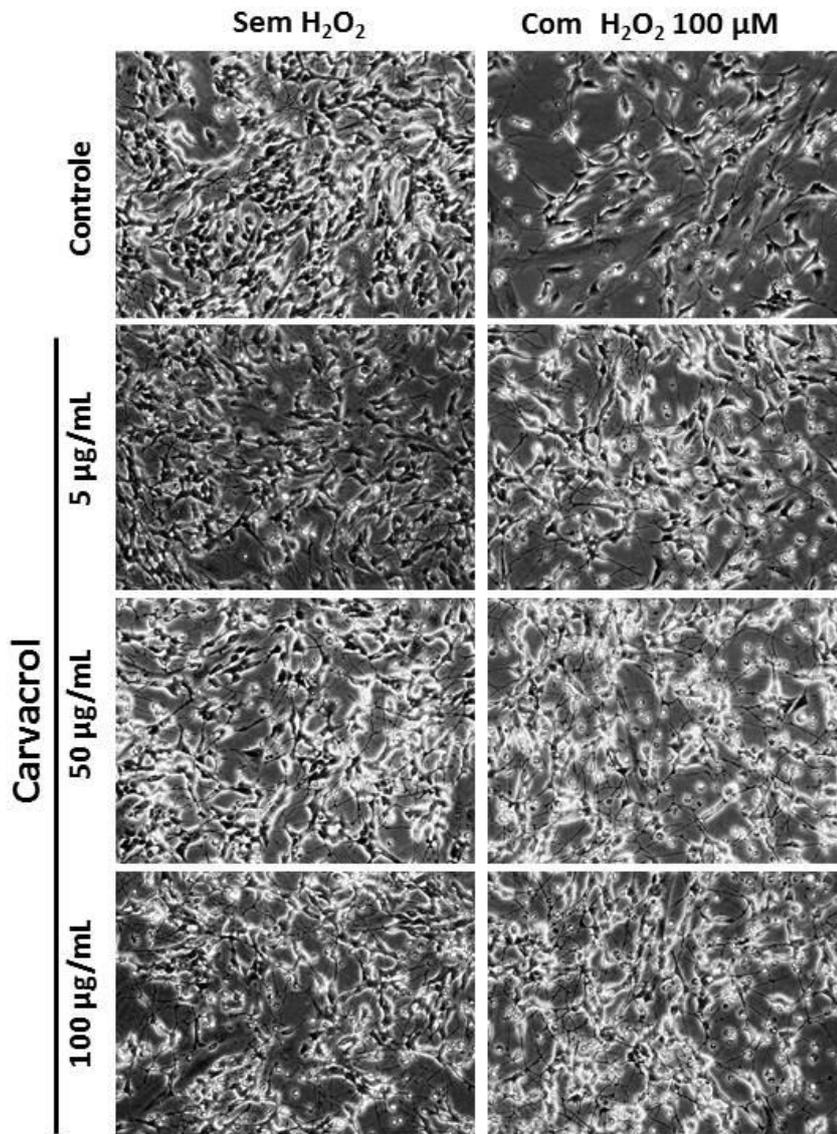


Figura 8: Efeitos morfológicos de médio prazo do tratamento carvacrol em células SH-SY5Y. A microscopia de contraste de fase de células SH –SY5Y, após 72h de tratamento com diferentes concentrações de carvacrol, na ausência ou na presença de H₂O₂ (100 μM). Fotomicrografias representativas de três experiências independentes, 200X.

A morfologia das células SH-SY5Y tratadas com carvacrol em tempos acima de 24 horas também foi avaliada, através de visualização por microscopia de contraste de fase. Não observamos diferenças na quantidade aparente ou na morfologia das células nos tratamentos com carvacrol a 5 µg/mL e 50 µg/mL em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas; Figuras 6, 7 e 8). Porém há uma leve diminuição no número aparente de células por campo nos grupos tratados com carvacrol 100 µg/mL em todos os períodos de incubação. Em 24 horas de incubação, a modificação morfológica mais notável é causada pelo carvacrol a 100 µg/mL, que parece causar uma diminuição no número e no tamanho do corpo celular (Figura 6). Nas células expostas ao H₂O₂ 100 µM por 24 horas, não se observaram modificações significativas na morfologia das células, No entanto o co-tratamento com carvacrol a 50 e 100 µg/mL induziu um notável aumento no número de células desprendidas do substrato (provavelmente resultante morte celular) em relação aos outros grupos (Figura 6). Em 48 horas de tratamento, observamos um padrão similar ao observado em 24 horas, com uma evidente diminuição no número de células no grupo co-tratado com H₂O₂ 100 µM e carvacrol a 50 e 100 µg/mL (Figura 7). Nas células tratadas apenas com carvacrol a 50 µg/mL, houve um aumento modesto, porém, aparente, no número de células por campo (Figura 7). Tanto no grupo tratado apenas com carvacrol 100 µg/mL, como nos grupos co-tratados com H₂O₂ 100 µM e carvacrol a 50 e 100 µg/mL, pode-se notar um aumento na extensão e ramificação neurítica das células que permaneceram viáveis, apesar do aumento do número de células desprendidas do substrato. Esse efeito pode estar relacionado às modificações redox que causam alterações na regulação do ciclo celular.

Após 72 horas de exposição, o carvacrol a 50 e 100 µg/mL parece induzir um pequeno aumento no número de células arredondadas suspensas nos campos de observação; no entanto, nesse tempo de incubação, o co-tratamento com carvacrol

aparentemente reverteu a diminuição no número de células causada pelo H_2O_2 100 μM (Figura 8). Nos grupos com carvacrol a 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, esse efeito foi acompanhado por um aumento do número de células soltas. Já nas células induzidas ao estresse agudo com peróxido 1 mM por até 24 horas, houve uma forte indução de morte celular/desprendimento de células das culturas, sendo que nenhuma concentração de carvacrol reverteu esse efeito (dados não apresentados).

4.2 Estudos das propriedades redox-ativas

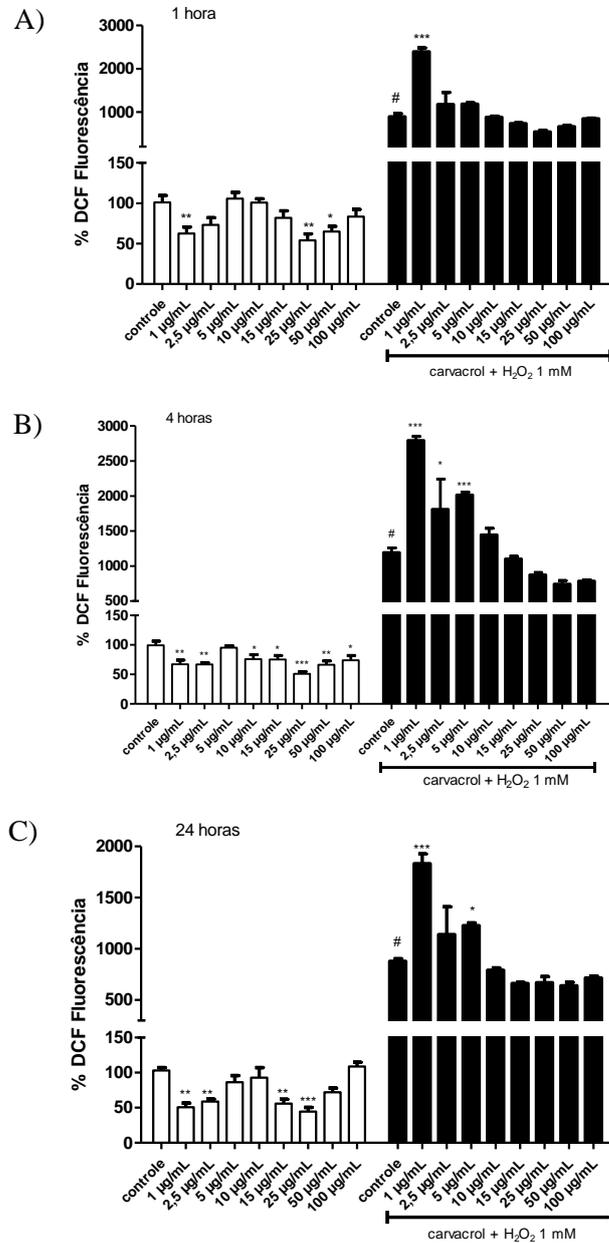


Figura 9: Produção de espécies reativas intracelular (ensaio DCFH) 1h (A), 4h (B) e 24 horas (C). Experimento descrito em materiais e métodos. Dados expressos em média \pm desvio padrão de dados de três experimentos diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente).*** $p < 0,0001$ * $p < 0,01$ (ANOVA de 1 via seguida por teste *post hoc* de Tukey). # ANOVA de 2 vias. Diferente do controle, $p < 0,05$.

O efeito do carvacrol sobre a produção intracelular de ERO por células SH-SY5Y foi avaliado através do ensaio fluorimétrico de oxidação de DCFH-DA em tempo real. Neste ensaio, as células são previamente incubadas com DCFH-DA, o qual é incorporado ao ambiente intracelular; no processo de incorporação, esterases removem o grupamento diacetato (DA), tornando o grupamento restante (DCFH) impermeável à membrana plasmática (WANG, JOSEPH, 1999). Nessas condições, as células foram incubadas com as diferentes concentrações de carvacrol na presença ou ausência de H_2O_2 por diferentes períodos de incubação, e a fluorescência produzida ao final de cada período foi registrada em leitor de placa.

Como apresentado na Figura 9A, o carvacrol nas concentrações de 1, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu significativamente oxidação de DCFH após 1 hora de incubação. Após 4 horas de incubação, somente a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diminuição significativa de produção de ERO em relação ao controle (Figura 9B), e em 24 horas de incubação observamos um efeito de inibição da oxidação de DCFH pelas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9C). Nenhuma concentração de carvacrol aumentou a produção de ERO em relação ao controle nesses períodos.

Assim como nos testes de viabilidade celular, também analisamos o efeito do carvacrol na presença de H_2O_2 1 mM em até 24 horas de incubação pelo ensaio de oxidação de DCFH. Como esperado, o H_2O_2 1 mM induziu um aumento na fluorescência em relação ao controle em 1 hora de incubação (Figura 9A). No entanto, a co-incubação com carvacrol 1 $\mu\text{g/mL}$ aumentou ainda mais a produção de ERO em relação ao grupo tratado somente com H_2O_2 , sendo que as demais concentrações não apresentaram diferenças. Após 4 horas de incubação observou-se um efeito parecido (Figura 9B), sendo que as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ também apresentaram um aumento na oxidação de DCFH na presença de H_2O_2 1 mM. Após 24 horas, esse

aumento permaneceu somente nos grupos de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9C). As demais concentrações não exerceram nenhum efeito sobre o aumento da produção de ERO induzido pelo H_2O_2 1 mM.

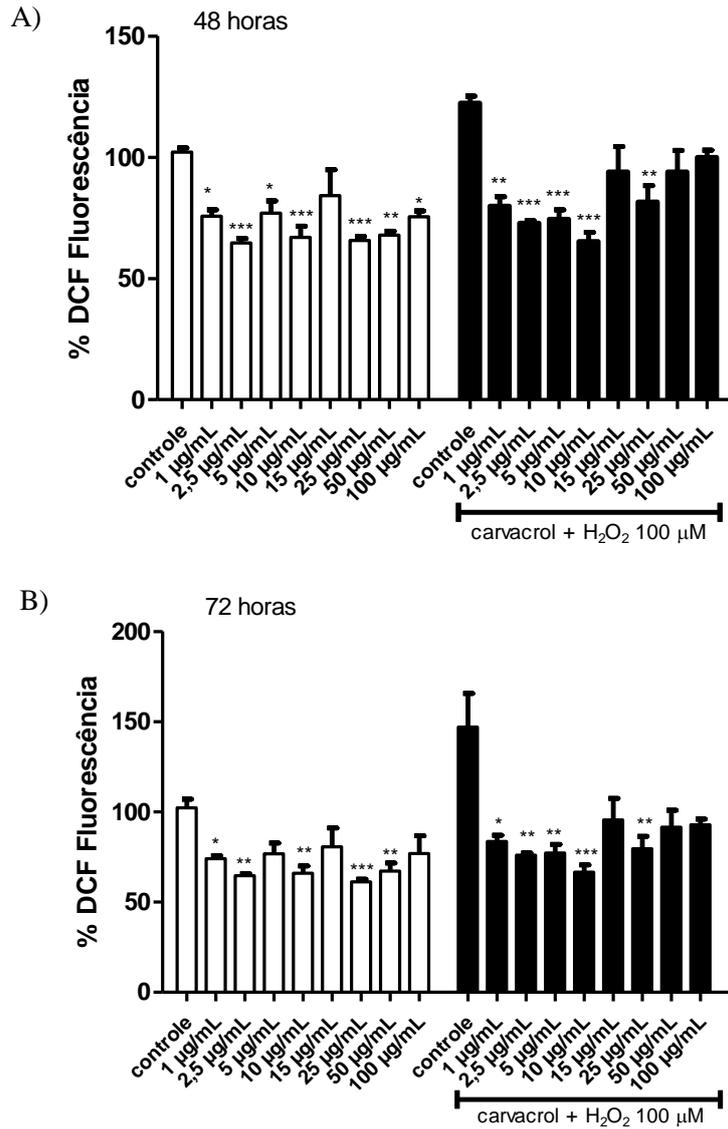


Figura 10: Produção de espécies reativas intracelular (ensaio DCFH). Experimento descrito em materiais e métodos Dados expressos em média \pm desvio padrão de dados de três experimentos diferentes (seis poços por grupo em cada experimento independente).*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ (ANOVA 2 vias seguida por teste *post hoc* de Tukey).

A oxidação de DCFH-DA também foi avaliada em tempos mais longos de incubação com o carvacrol, utilizando o modelo de estresse crônico com H₂O₂ 100 µM. Tanto em 48 horas como em 72 horas de incubação, o carvacrol apresentou um efeito geral antioxidante. Em 48 horas de incubação, somente a concentração de 15 µg/mL não diminuiu a oxidação de DCFH (Figura 10A), enquanto que em 72 horas as concentrações de 15 µg/mL e 100 µg/mL não causaram efeito diferente do controle (Figura 10B). Na presença de H₂O₂ 100 µM, o carvacrol nas concentrações de 1 a 10 µg/mL e na concentração de 25 µg/mL inibiu o aumento de produção de ERO nos dois tempos de incubação (Figuras 10A e 10B).

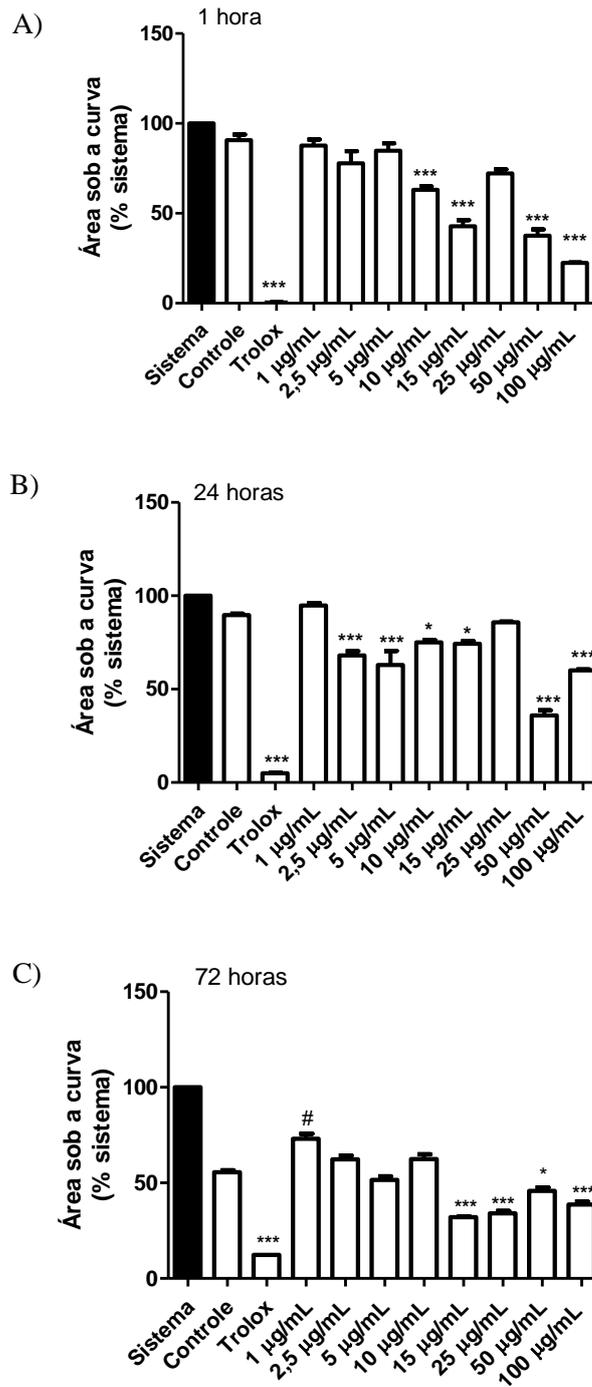


Figura 11: Potencial total antioxidante não-enzimático (TRAP) de células SH-SY5Y tratadas com diferentes concentrações de carvacrol. Experimento descrito em materiais e métodos. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata e estão representados em média \pm desvio padrão de três experimentos diferentes. ***p 0,0001 (ANOVA de 1 via seguido de *post hoc* de Tukey).

ANOVA de 2 vias. Diferente do controle, $p < 0,05$.

As propriedades redox-ativas do carvacrol em cultura de células SH-SY5Y foram avaliadas também usando um método baseado na quantificação da quimiluminescência do luminol induzida por radicais peroxil produzidos pela decomposição de AAPH. Tal método, denominado avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP), é um parâmetro relativo à capacidade não-enzimática das amostras em reduzir a produção de ERO. O antioxidante padrão Trolox 200 nM, um análogo hidrofílico sintético do alfa-tocoferol, é utilizado como referência de atividade antioxidante nesse ensaio. Assim, células SH-SY5Y tratadas com diferentes concentrações de carvacrol por 1, 24 e 72 horas foram homogeneizadas em tampão glicina e o seu potencial antioxidante não-enzimático frente ao sistema contendo AAPH foi avaliado.

Em células tratadas por 1 hora, observamos uma tendência de aumento da capacidade antioxidante não-enzimática com concentrações crescentes de carvacrol, com efeito significativo nas concentrações de 10 µg/mL, 15 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL (Figura 11A). A diminuição da quimiluminescência derivada do AAPH causada pelas amostras de células tratadas com essas concentrações de carvacrol foi significativa em relação ao sistema sem adição de amostra (considerado neste ensaio como 100% de produção de radicais) e também em relação às células não tratadas (controle). Apesar do potencial antioxidante não-enzimático dessas amostras ainda ter sido menor do que o do Trolox, o efeito causado pelo carvacrol nas células foi uma alteração do balanço redox em favor de um estado antioxidante.

Em 24 horas de incubação com carvacrol, o perfil das células mostrou-se semelhante, sendo que as amostras de células tratadas com as concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL diminuíram a produção de radicais induzida pelo AAPH (Figura 11B). Após 72 horas de incubação, as células

tratadas com carvacrol na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um aumento de produção de radicais em relação às células controle (Figura 11C), mas ainda assim menor do que o sistema, sugerindo que nessa concentração o potencial antioxidante não-enzimático é menor do que o controle. No entanto, as células tratadas com carvacrol nas concentrações de 15 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma diminuição na produção de radicais derivada de AAPH, indicando um efeito antioxidante.

Parte 3

5- DISCUSSÃO

Aproximadamente 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional e terapias envolvendo o uso de extratos de plantas na forma de chá de ervas para variados fins (CRISTIANE et al, 2007; TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006). Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos em uso clínico no mundo (GURIB-FAKIM, 2006). O óleo de *Oreganum sp.* tem sido amplamente estudado, assim como o *Thymus sp.*, aos quais tem sido atribuídas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e outras propriedades medicinais (KRUPPA, RUSSOMANNO, 2008; MARIUTTI, BRAGAGNOLO, 2007). Estas propriedades têm sido atribuídas à grande quantidade de compostos monoterpênicos fenólicos presentes nessas plantas, sendo o carvacrol encontrado em maior quantidade (60-70%) (ULTEE, KETS, SMID, 1999).

Já é conhecida a atividade antimicrobiana do carvacrol em vários tipos de bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sp.*, *Candida sp.* e *Listeria monocytogenes* que poderia ser explicada pela interação do carvacrol com a membrana, dissolvendo a bicamada fosfolipídica e provocando alterações drásticas na estrutura. Conseqüentemente, esta distorção causaria expansão e desestabilização da membrana, o que aumentaria a permeabilidade e como consequência o rompimento. Esse aumento de permeabilidade também parece estar associado ao aumento na fuga de ATP e inibição da enzima ATPase (ATP sintase bacteriana) o que levaria a uma redução na produção de energia e conseqüentemente à morte celular (GILL, HOLLEY, 2006; ULTEE, KETS, SMID, 1999; ULTEE et al, 2000). Levando em consideração o efeito produzido em bactérias, torna-se de grande importância analisarmos a potencial toxicidade do carvacrol em células eucarióticas.

A fim de avaliarmos uma possível toxicidade do carvacrol em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), verificamos primeiramente o efeito citotóxico do carvacrol pelo ensaio de redução de MTT. A maior concentração em nosso estudo, 100 µg/mL, mostrou uma redução significativa na viabilidade das células no tratamento de 24 horas. Tais resultados corroboram com resultados de outros autores, que encontraram o mesmo efeito em células de câncer de mama MDA-MB 231 e linfócitos (ARISTATILE et al, 2010, ARUNASREE, 2010). O carvacrol não apresentou efeito na viabilidade das células em concentrações baixas (até 50 µg/mL), embora em concentrações elevadas tenha reduzido a viabilidade.

Também avaliamos a citotoxicidade pelo ensaio de incorporação de SRB, que nos mostra que o carvacrol aumentou a biomassa celular após longo período de incubação, mas apenas nas doses intermediárias, apresentando um efeito protetor contra os danos induzidos por estresse crônico. Esse efeito protetor também foi encontrado em estudo com células gástricas, reduzindo principalmente o dano induzido na mucosa (OLIVEIRA, 2012). O carvacrol parece modificar a morfologia das células, mas de uma maneira muito sutil que não pode ser especificada apenas com o resultado da visualização por microscopia de contraste de fase. No futuro poderiam ser realizados testes baseados em citometria de fluxo para avaliar acuradamente o número real de células existentes, bem como a condição do ciclo celular.

Mesmo que o óleo essencial do orégano apresente efeito antioxidante, em células eucarióticas os óleos essenciais podem agir como pró-oxidantes, afetando as membranas celulares internas e organelas tais como mitocôndrias. Dependendo do tipo de óleo e da concentração, eles também podem exibir efeito citotóxico (BAKKALI et al, 2008). A atividade antioxidante de compostos presentes em plantas e alimentos de origem vegetal, como frutas e hortaliças, vem sendo explorada há muito tempo devido a

grande quantidade de doenças relacionadas com o envelhecimento, como as doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e os variados tipos de câncer (ABE, 2007; ANGELO, JORGE, 2007). Essas doenças podem ser ocasionadas pela formação de ERO que danificam as células por atacarem biomoléculas, mudando assim tanto a estrutura celular como as suas funções. Muitas ERO causam dano de DNA o que pode levar à mutação e produção de células que se reproduzem fora do compasso normal do seu contexto e originam os cânceres. As células se protegem contra esses danos através de processos de reparo, enzimas de defesa e antioxidantes endógenos e exógenos (SMITH, MARKS, LIEBERMAN, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Na primeira, estão as proteínas que atuam na degradação enzimática de ERO, ou seja, as enzimas que removem tais espécies através da catálise de reações que transformam ERO em espécies menos tóxicas ou inertes. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA, MANCINI-FILHO, 2004).

A atividade antioxidante de alguns óleos essenciais tem sido atribuída principalmente a um ou mais compostos fenólicos, ligado ao anel aromático ou insaturação. Alguns estudos demonstraram que monoterpenos oxigenados constituem uma das principais classes de compostos antioxidantes em grande parte devido aos grupos funcionais álcoois. Como o carvacrol tem um caráter ácido fraco quando reage com um radical livre, é provável que doe átomos de hidrogênio com um elétron não emparelhado (H^{\bullet}), produzindo outro radical que é estabilizada por dispersão de elétrons gerados com uma estrutura molecular de ressonância (LIMA, CARDOSO, 2007).

O efeito anticarcinogênico dos monoterpenóides timol e carvacrol foi relatado por He et al. (1997). Seu estudo demonstrou que os isoprenóides suprimiram a proliferação e promoveram o início da apoptose em células do melanoma B16-F10 em camundongos. Além disso, posteriormente foi descrito que o carvacrol possui atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*, bem como atividade antiplaquetária *ex vivo* através da inibição da produção do tromboxano A2 (TXA2) e expressão do receptor GP IIb/IIIa. Essa propriedade poderia estar relacionada à sua atividade antioxidante, haja vista a capacidade de inibição da cicloxigenase plaquetária pelos agentes antioxidantes (KARKABOUNAS et al., 2006).

Muitos óleos essenciais exibem atividade antioxidante e anti-inflamatória (BARATTA et al., 1998; BURT, 2004). Fenóis monoterpenóides, como timol, carvacrol e eugenol pertencem aos antioxidantes naturais mais ativos encontrados nos óleos essenciais (RUBERTO, BARATTA, 2000; YANISHLIEVA, 1999). Com o uso do ensaio do ácido aldeído/carboxílico, essas substâncias mostraram uma forte atividade antioxidante inibindo a oxidação do hexanal em quase 100% por 30 dias na concentração de 5 µg/mL (LEE et al., 2005). Sua atividade antioxidante foi comparável a de antioxidantes conhecidos, α -tocoferol e hidroxitolueno butilado (BHT).

Aristatile et al. (2010) analisaram o efeito protetor do carvacrol contra o estresse oxidativo e o dano de DNA por irradiação ultravioleta em linfócitos, mostrando que o pré-tratamento com carvacrol reduziu significativamente o dano de DNA. Em experimentos com células de hepatoma e de colo humano, células Caco-2 e V79 de fígado de hamster, timol e cavacrol não foram capazes de danificar o DNA. Ao contrário, estes compostos forneceram proteção contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio (SLAMENOVA et al., 2007) . Isto sugere que timol e carvacrol possuem um efeito protetor benéfico para o ácido nucléico das células.

A análise antioxidante mostrou que o carvacrol possui uma elevada atividade captadora do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Estudos anteriores demonstraram que o carvacrol é um potente “*scavenger*” do ânion superóxido (ARISTATILE et al., 2010) e que possui alta capacidade antioxidante contra radicais livres em condições patológicas, podendo agir como inibidor e/ou reagir aos radicais livres como um antioxidante primário, podendo limitar os danos causados por eles nas células humanas (SHAHAT et al, 2002).

A maioria dos estudos avalia a atividade antioxidante pelo ensaio de remoção de DPPH por ser um ensaio simples de ser realizado, porém existem métodos mais eficazes como o método do TRAP, que avalia a capacidade de inibição da produção de radicais peroxil, e o monitoramento da oxidação de DCFH-DA, que avalia a potencialidade de diminuir a produção intracelular de ERO em tempo real. Em nosso estudo, o carvacrol mostrou uma eficaz capacidade antioxidante na maioria das concentrações estudadas, reduzindo a oxidação de DCFH, inclusive quando foi testado em co-incubação com o H_2O_2 . Não houve aumento de ERO intracelular em nenhuma das concentrações estudadas, sugerindo que essas doses são seguras para esse tipo de célula. As concentrações mais baixas apresentaram um aumento na oxidação de DCFH quando houve adição de H_2O_2 a 1 mM, o que sugere que em baixas doses o carvacrol pode ter ação pró-oxidante ou potencializar o efeito do H_2O_2 , e mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo de indução desse aumento. Estudos que avaliaram a oxidação de DCFH em células de glioblastoma humano e em células de câncer bucal humano, quando pré-tratadas com carvacrol, obtiveram um efeito pró-oxidante com aumento da produção de ERO e apoptose celular (LIANG, LU, 2012; LIANG et al, 2013). A razão dessa variabilidade de efeito em relação ao tipo celular estudo pode sugerir que o

mecanismo de ação do carvacrol está relacionado ao metabolismo mitocondrial, que varia com cada tipo celular.

A capacidade de aumentar a atividade de antioxidantes endógenos tem sido uma das propriedades atribuídas ao carvacrol como relatou Aristatile et al. (2010) em seu estudo, onde demonstraram que o pré-tratamento com carvacrol aumentou significativamente a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx em linfócitos, além de aumentar a produção da enzima GSH, de vitamina C e E. Foi observada também redução da peroxidação lipídica induzida por AAPH (ARISTATILE et al, 2010; GUIMARÃES et al, 2010). Isso sugere que o carvacrol poderia ser potencialmente útil na neutralização de ERO mediadas por lesões (YANISHLIEVA et al, 1999). Quando o carvacrol foi incubado com H₂O₂ houve uma redução significativa no dano causado ao DNA (IPEK, TUYLU, ZEYTIK, 2003), esse efeito pode ser explicado pela eliminação dos ERO antes de causarem o dano.

Como foi mencionado anteriormente, o timol e carvacrol apresentam efeitos farmacologicamente interessantes (BASER, 2008). Eles são uns dos agentes naturais mais ativos com atividade antioxidante (RUBERTO, BARATTA, 2000; YANISHLIEVA, 1999). Isso se torna de extrema importância, pois os mecanismos pelos quais as patologias crônicas se desenvolvem, especialmente cânceres e doenças cardiovasculares, envolvem a alteração oxidativa de muitas moléculas. (LAGUERRE, LECOMTE, VILLENEUVE, 2007).

Analizamos a capacidade antioxidante não-enzimática de células SH-SY5Y tratadas com carvacrol através do ensaio de redução de radicais peroxil (ensaio TRAP). Comparando com a atividade do trolox, a redução na formação de radicais foi significativa, mas não tanto quanto a análise realizada por Guimarães et al. (2010), já

que a atividade *per se* do carvacrol isolado foi analisada nesse estudo, diferentemente do presente trabalho que avaliou amostras de células tratadas com carvacrol. Esses resultados demonstram a importância de estudos de avaliação de perfil redox ativo em culturas de células além do estudo de *screening* de atividade antioxidante *in vitro* com a substância isolada.

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular que está envolvido na eliminação de células mutagênicas, infectadas ou simplesmente dispensáveis, mas falhas nesse mecanismo podem resultar em câncer (GLINSKY, 1997). Estudos mostram que o carvacrol suprime o crescimento de células de melanomas de ratos, *in vitro* (HE et al, 1997) e inibe a síntese de DNA em mioblastoma de ratos sugerindo que o carvacrol pode agir como um agente anticâncer (ZEYTINOGLU, INCESU, BASER, 2003). O nível de Ca^{2+} livre citosólico é um sinal intracelular de controle de vários processos celulares, incluindo secreção, contração, proliferação celular e apoptose (ROUZAIRE-DUBOIS, DUBOIS, 2004). Estudos com diversos tipos celulares têm indicado efeitos severos do carvacrol na homeostase do Ca^{2+} , sugerindo que este pode ser um mecanismo de ação e toxicidade do carvacrol (LIANG, LU, 2012; LIANG et al, 2013).

Sárközi et al. (2007) demonstraram que o timol e o carvacrol foram capazes de inibir a atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, bem como de liberar Ca^{2+} através da ativação do receptor de rianodina do músculo esquelético incorporado em uma bicamada lipídica artificial. Alguns estudos mostram que canais da membrana também são afetados por esses terpenóides. Timol e carvacrol suprimiram correntes de cálcio do tipo L em cardiomiócitos de caninos e humanos. Essa supressão foi influenciada pelos substituintes do anel benzeno dos terpenóides e o efeito bloqueador dessas substâncias pode envolver interações com os processos de inativação do canal (MAGYAR et al., 2004).

Têm sido atribuídos ao carvacrol efeitos anti-inflamatórios e seu mecanismo de ação tem sido amplamente estudado. Lima et al (2013) sugerem que o carvacrol provoca efeitos anti-inflamatórios através da redução da produção de mediadores, tais como a interleucina-1 β e prostanoídes, possivelmente por meio da indução de liberação de interleucina-10. O carvacrol também reduziu os níveis de TNF- α e o recrutamento de leucócitos sem alterar o perfil destas células e reduziu a produção de nitrito induzida por lipopolissacarídeo, sugerindo que o carvacrol poderia ser utilizado para o tratamento da dor em condições de inflamação e em estados pró-oxidantes (GUIMARÃES et al, 2012).

Em estudo que avaliou a atividades anti-inflamatórias e anti-úlcero-gênicas do carvacrol houve uma diminuição na formação de edema e melhora na capacidade de cicatrização de lesões gástricas o que sugere que o carvacrol interfere na liberação de mediadores inflamatórios favorecendo esse processo (SILVA et al, 2012). Outro estudo avaliou o efeito do carvacrol num modelo de obesidade com dieta de alto percentual de gordura para investigar os potenciais efeitos na expressão dos genes envolvidos na obesidade bem como o processo inflamatório que ocorre nessa patologia. Houve redução significativa de peso, gordura visceral e dos níveis plasmáticos de lipídeos nos animais que receberam dieta com carvacrol, além disso, a cascata de sinalização que leva a adipogênese e a inflamação também foi significativamente reduzida, sugerindo que o carvacrol inibe a adipogênese visceral provavelmente por suprimir o fator-1 de crescimento de fibroblasto e a sinalização mediada pela galanina e também por atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo visceral por inibir o *toll-like receptor 2* (TLR2) e a sinalização mediada por *toll-like receptor 4* (TLR4) (CHO et al, 2012).

6- CONCLUSÃO

Em conclusão nossos resultados demonstram que o carvacrol apresenta baixa citotoxicidade na maioria das concentrações utilizadas (1 a 50 $\mu\text{g/mL}$), parecendo ser tóxico conforme sua dosagem aumenta, modificando sutilmente a morfologia e o estado metabólico das células sem reduzir significativamente sua biomassa.

O carvacrol se mostrou um potencial antioxidante quando avaliada a produção de ERO intracelular em concentrações elevadas, assim como a redução de radicais peroxil. Esses dados são preliminares sendo necessário mais estudos para verificar o real efeito do carvacrol em cultura de células SH-SY5Y, bem como o mecanismo de ação deste composto.

7- PERSPECTIVAS

- Estudar a modulação do ciclo celular pelo carvacrol em células SH-SY5Y proliferativas e também diferenciadas em neurônios adultos por tratamento com ácido retinóico através de técnicas de citometria de fluxo associadas ao uso de marcadores fluorescentes, a fim de caracterizar detalhadamente sua ação em células de origem neuronal;
- Verificar o potencial de proteção do carvacrol contra a morte celular causada por 6-hidroxi dopamina nesse modelo celular, a fim de iniciar o estudo de possíveis propriedades anti-parkinsonianas desse composto, uma vez que o carvacrol tem sido sugerido na literatura como potencial neuroprotetor e o estresse oxidativo é um componente importante na doença de Parkinson;
- Investigar o potencial do carvacrol de modular a ativação de proteínas cinases associadas à resposta celular a diferentes estressores, tais como MAP cinases (MAPK).

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARISTATILE, B.; AL-NUMAIR, K. S.; AL-ASSAF, A. H.; 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**, Article first published online: 21 MAY 2010.
- ARUNSREE, 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.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. de L. D.; ALVIM, N. A. T.; ZANETTI, G. D.; HEISLERET, E. V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto e Contexto - Enfermagem**, Florianópolis, v. 21, n. 2, jun. 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils –a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235–244, 1998.
- BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3106–3119, 2008.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- CHEN, H.; LIN Y.; HSIEH, C. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1418–24, 2007.

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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 192–201, 2012.

COSGE, B.; KIRALAN, M.; IPEK, A.; BAYRAK, A.; GURBUZ, B. Comparison of antiradical activities and compositions of essential oils of two *Origanum spp.* from Turkey. **Advances in Environmental Biology**, v. 5. n. 2, p. 248-253, 2011.

CRISTIANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300–6308, 2007.

CSÁNYI, G.; TAYLOR, W. R.; PAGANO, P. J. NOX and inflammation in the vascular adventitia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1254–1266, 2009.

CUPPETT, S. L.; HALL III, C. A. Antioxidant activity of the *Labiatae*. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 42, p. 245-271, 1998.

DORTA, E. J. Introdução. In: **Escala Rural: especial de plantas medicinais**, v. 1, n. 4, p. 1-62, São Paulo, Escala Rural; 1998.

DRESCH, M. T.; ROSSATO, S. B.; KAPPEL, V. D.; BIEGELMEYER, R.; HOFF, M. L.; MAYORGA, P. et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 107–114, 2009.

GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 553-558, 2008.

GELAIN, D. P.; SOUZA, L. F.; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. Extracellular inosine is modulated by H₂O₂ and protects Sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. **Free Radical Research**, v. 38, n. 1, p. 37-47, 2004.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 9, p. 1807-1819, 2007.

GHASEMI, Y.; MOHAGHEGHZADEH, A.; MOSHAVASH, M.; OSTOVAN, Z.; RASOUL-AMINI, S.; MOROVVAT, M. H.; GHOSHON, M. B.; RAEE, M. J.; MOSAVI-AZAM, S. B. Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1301–1304, 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *escherichia coli*, *listeria monocytogenes* and *lactobacillus sakei* cellular membranes by plant essential oils aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1–9, 2006.

GLINSKY, G. V. Apoptosis in metastatic cancer cells. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 25, n. 3, p. 175–86, 1997.

GOMES, H. H. S.; DANTAS, I. C.; CATÃO, M. H. C. V. Plantas Medicinais: sua utilização nos terreiros de Umbanda e candomblé na zona leste da Cidade de Campina Grande-Pb. **Bio Far**, vol. 3, n. 1, p. 110-129. 2008.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A. S.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidante and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and clinical pharmacology and toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

GUIMARÃES, A. G.; XAVIER, M. A.; SANTANA, M. T. de; CAMARGO, E. A.; SANTOS, C. A.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; OLIVEIRA, R. C. M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Carvacrol attenutes mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, p.253-263, 2012.

GURIB-FAKIM, A. M. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Measurement of reactive species. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, Oxford, 4 ed; p. 268-337, 2007.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 107-12, 2008.

HE, L.; MO, H.; HADISUSILO, H.; QURESHI, A. A.; ELSON, C. E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 668-74, 1997.

IPEK, E.; TUYLU, B.A.; ZEYTIÑOGLU, H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. **Cytotechnology**, v. 43, p. 145–148, 2003.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P.; DONOGHUE, M.; Plant systematics: a phylogenetic approach. 2ª edição. Sinauer Associates, Inc. Sunderland., pp. 466-468, 470-473, 2002.

KAPLAN, M.; MUTLU, E. A.; BENSON, M.; FIELDS, J. Z.; BANAN, A.; KESHAVARZIAN, A. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 15(3), p. 207-216, 2007.

KARKABOUNAS, S.; KOSTOULA, O. K.; DASKALOU, T.; VELTSISTAS, P.; KARAMOUZIS, M.; ZELOVITIS, I.; METSIOS, A.; LEKKAS, P.; EVANGELOU, A.M.; KOTSIS, N.; SKOUFOS, I. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Experimental Oncology**, v. 28, n. 2, p. 121-5, 2006.

KIELLAND, A.; BLOM, T.; NANDAKUMAR, K. S.; HOLMDAHL, R.; BLOMHOF, R.; CARLSEN, H. In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 760-766, 2009.

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(2), p. 797-803, 2005.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O. M. R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família *Lamiaceae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 072-075, 2008.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEE, S.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.

LEITE, S. N. Além da medicação: a contribuição da fitoterapia para a saúde pública [dissertação]. **Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública/USP**, São Paulo - SP, 2000.

LIANG, W. Z.; CHOU, C. T.; LU, T.; CHI, C. C.; TSENG, L. L.; PAN, C. C.; LIN, K. L.; KUO, C. C.; JAN, C. R.. The mechanism of carvacrol-evoked $[Ca^{2+}]_i$ rises and non- Ca^{2+} -triggered cell death in OC2 human oral cancer cells. **Toxicology**, v. 303, p. 152–161, 2013.

LIANG, W. Z.; LU, C. H. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. **Life Sciences**, v. 90, p. 703–711, 2012.

LIMA, M. da S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A. de; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p. 112–117, 2013.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família *Lamiaceae*: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Fitos**, v. 3, p. 14–24, 2007.

LIOLIOS, C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOU, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v.112, p. 77–83, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FALL A. L.; RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biologic chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, May, 2002.

MAGYAR, J.; SZENTANDRÁSSY, N.; BÁNYÁSZ, T.; FÜLÖP, L.; VARRÓ, A.; NÁNÁSI, P. P. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, n. 1-3, p. 29-36, 2004.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família *Lamiaceae*. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, Abr-Jun. 2007.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J.M.; BAILEN, G.; ZAPATA, P.; SERRANO, M.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p.144–148 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas medicinais. **Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa**, 2000.

MAU, J. L.; HUANG, P. N.; HUANG, S. J.; CHEN, C. C. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorate* mycelia. **Food Chemistry**, v. 86, p. 25-31, 2004.

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

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-24, 2004.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 469-484, 2009.

NOSTRO, A.; SCAFFARO, R.; D'ARRIGO, M.; BOTTA, L.; FILOCAMO, A.; MARINO, A.; BISIGNANO, G. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 1029-38, 2012.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; SANTOS, M. R. V. dos; 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 lesion in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385 (9), p. 899-908, sep., 2012.

PRINS, C. L.; FREITAS, S. de P.; CAMPOSTRINI, E.; GRAVINA, G. A.; REIS, F. de O. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciencia Agronomica**, v. 39, n. 3, p. 416-421, 2008.

ROUZAIRE-DUBOIS, B.; DUBOIS, J. M. Calcium-dependent proliferation of NG108-15 neuroblastoma cells. **General Physiology and Biophysics**, v. 23, n. 2, p. 231-9, 2004.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.

SANTOS, C. S.; RIBEIRO, A. S.; GOMES, L. J.; MARCAL, R. M. Biodiversity and the search for new medicines - medicinal plants popularly used in *Caueira village*, a

coast location in the Sergipe state, Brazil. In: 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008, Athens. **Planta Medica**. Stuttgart: Thiemi-connect, v. 74. p. 1144-1144, 2008.

SÁRKÖZI, S.; ALMÁSSY, J.; LUKÁCS, B.; DOBROSI, N.; NAGY, G.; JÓNA I. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, p. 167-74, 2007.

SERRANO, C.; MATOS, O.; TEIXEIRA, B.; RAMOS, C.; NENG, N.; NOGUEIRA, J.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1554-60, jul, 2011.

SHAHAT, A. A.; COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HAMMOUDA, F. M.; ISMAIL, S. I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PIETERS, L.; VANDEN-BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Planta Medica**, v. 68, p. 539-541, 2002.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants - chemistry, health effects and applications. Champaign, Illinois: AOCS Press, 414 p., 1997.

SILVA, F. V.; GUIMARÃES, A. G.; SILVA, E. R. S.; SOUZA-NETO, B. P.; MACHADO, F. D. F.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene presente in the essencial oil of orégano. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 11, p. 984-991, 2012.

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, p. 108-12, 2007.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Toxicidade do Oxigênio e Danos por Radicais Livres. In: **Bioquímica Médica Básica de Marks**, 2^a ed., Artmed, Porto Alegre, 2007.

SOUZA, C. F.; FERNANDEZ, L. C.; CYRINO, E. S. Produção de espécies reativas de oxigênio durante o exercício aeróbio e anaeróbio. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 8 (2), p. 102-109, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 639 p., 2005.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto - Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, mar. 2006.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, Abr-Jun, 2006.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174(4), p. 233–238, 2000.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 4606–4610, 1999.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112–1116, 2006.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 47, n. 3–4, p. 95–106, 2003.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biololy and Medicine**, v. 27, p. 612–6, 1999.

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

YILDIRM, A.; MAVI, A.; OKTAY, M.; KARA, A. A.; ALGUR, O. F.; BILALOGU, V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea Desf*

Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5030-5034, 2000.

ZEYTINOGLU, H.; INCESU, Z.; BASER, K. H. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human NRAS oncogene. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 292–9, 2003.