



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE USO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
NEROLIDOL**

DANIELLE FEIJÓ DE MOURA

RECIFE
2020

DANIELLE FEIJÓ DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE USO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
NEROLIDOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

ORIENTADORA: Profª. Dra.. Marcia Vanusa da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. René Duarte Martins

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Moura, Danielle Feijó de
Avaliação da segurança de uso e atividades biológicas do nerolidol / Danielle Feijó de
Moura – 2020.

132 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Marcia Vanusa da Silva
Coorientador: René Duarte Martins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.
Inclui referências e apêndices

1. Plantas medicinais 2. Óleos essenciais 3. Sesquiterpeno I. Silva, Marcia
Vanusa (orient.) II. Martins, René Duarte (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021- 008

DANIELLE FEIJÓ DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE USO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
NEROLIDOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 17/02/2020

Profª. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Presidente)

Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (Membro Interno).

Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (Membro Externo)

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Membro Externo)

Profª. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Membro Externo)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, a minha mãe **Edijane**, avó **Carminha**, irmã **Dayane** e meu esposo **Clebson**, que com muito carinho e apoio demonstraram que eu não estava sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho me dando forças para seguir em frente, e por todas as bênçãos alcançadas durante esta trajetória acadêmica. Obrigada pela oportunidade de viver e construir conhecimento.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada em especial, a minha família, minha mãe Edijane, irmã Dayane, avó Carminha e esposo Clebson, que sempre estiveram presentes, nos momentos mais importantes, com orações, carinho, amor e incentivo.

Aos meus professores, Márcia Vanusa e René Duarte pela oportunidade de tê-los como orientadores, agradeço pela confiança, amizade, conselhos e paciência o que contribuiu de forma relevante para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha professora e amiga Vitorina Rehn, pelo carinho e paciência, dedicados em toda minha formação acadêmica desde a graduação, por me ajudar com palavras de incentivo, perseverança, amor e carinho.

A professora Maria Carolina Accioly pela amizade, ensinamentos, conselhos e sua inestimável confiança que foram essenciais para a concretização desse estudo.

A Professora Isabella Macário por sua amizade e carinho, disponibilidade e apoio, na transmissão dos seus conhecimentos que foram de fundamental importância.

A professora Noêmia Pereira pelo apoio e colaboração para realização do estudo.

Ao Professor Cristiano Chagas pelo apoio e valiosa contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Francisco Amanajás, pelas oportunidades e ensinamentos primordiais para o meu crescimento científico.

Ao professor Rafael Ximenes, um exemplo de simplicidade, compreensão e competência.

A professora Maria Betânia Melo expresso minha gratidão por ter aceitado participar deste momento de valiosa troca de saberes.

Ao Veterinário Vinícius Vasconcelos, pela manutenção do biotério, apoio disponibilidade e confiança.

Agradeço as minhas amigas, Tamires, Marllyn e Maria Aparecida pelo apoio, incentivo e amizade estando ao meu lado durante o doutorado.

Aos amigos e companheiros de bancada, que se dispuseram a ajudar-me na realização deste estudo, Luan, Cleiton, Marton, Beatriz, Silvio, Vanessa e Talita Giselly pela colaboração nos experimentos e pelos momentos de descontração.

A todos os estudantes que constituem a equipe do Laboratório de Parasitologia, do Centro acadêmico de Vitória, principais responsáveis pelo ambiente acolhedor e fraterno.

Ao Corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, pelos ensinamentos ao longo do curso que contribuíram para minha formação científica e aprendizado durante o doutorado.

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFPE, em especial a secretária Adenilda Lima pela paciência e ajuda.

Agradeço a todos os professores, funcionários e amigos do Centro Acadêmico da Vitória - CAV que sempre me acolheram para o desenvolvimento dos estudos.

A CAPES pelo apoio financeiro durante toda a pesquisa.

Aos camundongos que doaram e doam as suas vidas para que nós possamos caminhar em direção ao progresso.

Finalizo agradecendo a todos os amigos companheiros que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Meu muito obrigada!

Pefiram a minha instrução à prata,
e o conhecimento ao ouro puro, pois a sabedoria é mais preciosa
do que rubis;
nada do que vocês possam desejar
compara-se a ela.

Provérbios 8:10-11

RESUMO

O nerolidol é um sesquiterpeno de origem natural presente em óleos essenciais de diversas plantas medicinais do Nordeste brasileiro e tem sido amplamente utilizado na indústria cosmética e alimentícia. Devido a sua ampla aplicabilidade em vários produtos, o nerolidol tem despertado cada vez o mais o interesse da comunidade científica principalmente no que se refere a exploração de suas potenciais propriedades medicinais as quais, podem promover efeitos benéficos à saúde humana. Logo, o objetivo desse estudo foi avaliar o nerolidol quanto ao perfil de citotoxicidade, atividade hemolítica, toxicidade aguda, mutagenicidade, genotoxicidade, atividade antioxidante, antibacteriano, antibiofilme e os efeitos antiproliferativos frente à cultura do *Trypanosoma cruzi*. A viabilidade celular foi avaliada através do método MTT, também foram realizados ensaios de atividade hemolítica, toxicidade oral aguda, genotoxicidade e mutagenicidade. Para a determinação da atividade antioxidante do nerolidol foram realizados os métodos DPPH•, ABTS•+ e atividade antioxidante total. A atividade antibacteriana e antibiofilme foram realizadas através do método de microdiluição utilizando sete cepas padrões e quatro isolados clínicos bacterianos e método do cristal violeta, respectivamente e realizou-se a atividade antiproliferativa *in vitro* frente à cultura de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. A avaliação do efeito citotóxico demonstrou que o nerolidol foi atóxico para as células S-180 (uma linhagem maligna, heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica), J774A.1 (macrófagos) e HEK (células embrionárias renais) na concentração de 100 µg/mL. A atividade hemolítica do nerolidol foi confirmada em todas as concentrações analisadas (19, 39, 78, 156, 312, 625, 1250 µg/mL). Quanto ao ensaio de toxicidade aguda, não foram encontrados sinais clínicos de toxicidade nos animais tratados com nerolidol na dose de 2000 mg/kg. O nerolidol também não foi considerado mutagênico tampouco genotóxico sob a maior concentração testada (2000 mg/kg). Os resultados do ensaio antioxidante revelaram baixa atividade por meio dos métodos DPPH• (38.25%) e ABTS•+ (5.11%) enquanto que, através do método ATT a porcentagem foi de 93,94%. A atividade antibacteriano revelou que o nerolidol apresentou inibição do crescimento bacteriano frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Quanto aos isolados clínicos bacterianos Gram-negativos, o nerolidol apresentou potencial inibitório frente a *P. aeruginosa* multidrogarresistente (MDR) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) com CIM de 500 µg/mL. Quanto aos isolados clínicos bacterianos Gram-positivos, o nerolidol apresentou atividade antibacteriana com CIM de 2000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) (LMB 403) e MRSA (LMB 409). Sobre a inibição da formação de biofilme, o nerolidol obteve efeito dose dependente e nas concentrações de 500 µg/mL a 4000 µg/mL inibiu os biofilmes das bactérias ATCC variando de 51 a 98% e frente a isolados clínicos bacterianos a inibição do biofilme variou de 6% a 60%. O nerolidol induziu a morte dos parasitos (*T. cruzi*), no entanto se mostrou mais tóxico e menos efetivo que o benzonidazol. Logo, pode-se inferir que o nerolidol é um composto promissor para aplicações terapêuticas, uma vez que, os resultados indicam que existe uma margem de segurança relativa para sua utilização, além disso, foi possível verificar um importante potencial antioxidante, antimicrobiano, antibiofilme e antiproliferativo.

Palavras-chave: Antibiofilme. Nerolidol. Óleos essenciais. Sesquiterpeno. Testes de segurança.

ABSTRACT

Nerolidol is a naturally occurring sesquiterpene found in essential oils from several medicinal plants in Northeastern Brazil and has been widely used in the cosmetic and food industries. Due to its wide applicability in various products, nerolidol has increasingly aroused the interest of the scientific community, especially with regard to the exploration of its potential medicinal properties, which can promote beneficial effects on human health. Therefore, the objective of this study was to evaluate nerolidol in terms of cytotoxicity profile, hemolytic activity, acute toxicity, mutagenicity, genotoxicity, antioxidant, antimicrobial, antibiofilm and antiproliferative effects in the face of *Trypanosoma cruzi*. Cell viability was assessed using the MTT method, assays for hemolytic activity, acute oral toxicity, genotoxicity and mutagenicity were also performed. DPPH •, ABTS •+ and total antioxidant activity were used to determine the antioxidant activity of nerolidol. The antimicrobial and antibiofilm activity was performed using the microdilution method using 7 standard strains and 4 bacterial clinical isolates and the violet crystal method, respectively, and the antiproliferative activity was performed in vitro against the culture of *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. The evaluation of the cytotoxic effect demonstrated that nerolidol was non-toxic to S-180 cells (a malignant, heterogeneous line of tumor cells from mice of mesodermal origin), J774A.1 (macrophages) and HEK (renal embryonic cells) in the concentration of 100 µg/mL. The hemolytic activity of nerolidol was confirmed at all concentrations analyzed (19, 39, 78, 156, 312, 625, 1250 µg/mL). As for the acute toxicity test, no clinical signs of toxicity were found in animals treated with nerolidol at a dose of 2000 mg / kg. Nerolidol was also not considered mutagenic or genotoxic under the highest concentration tested (2000 mg/kg). The results of the antioxidant test revealed low activity using the DPPH • (38.25%) and ABTS •+ (5.11%) methods, whereas, through the AAT method, the percentage was 93.94%. Antimicrobial activity revealed that nerolidol showed inhibition of bacterial growth against standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. As for the Gram-negative bacterial clinical isolates, nerolidol showed an inhibitory potential against multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDR) (LMB 303) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (LMB 309) with 500 µg / mL MIC. As for Gram-positive bacterial clinical isolates, nerolidol showed antibacterial activity with MIC of 2000 µg / mL against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA) (LMB 403) and MRSA (LMB 409). Regarding the inhibition of biofilm formation, nerolidol had a dose dependent effect and at concentrations of 500 µg/mL to 4000 µg/mL it inhibited the biofilms of ATCC bacteria ranging from 51 to 98% and compared to bacterial clinical isolates, the biofilm inhibition varied from 6% to 60%. Nerolidol induced the death of the parasites (*T. cruzi*), however it was more toxic and less effective than benznidazole. Therefore, it can be inferred that nerolidol is a promising compound for therapeutic applications, since, the results indicate that there is a relative safety margin for its use, in addition, it was possible to verify an important antioxidant, antimicrobial, antibiofilm and antiproliferative.

Keywords: Antibiofilm. Nerolidol. Essential oils. Sesquiterpene. Safety tests.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1-	Mapa do Brasil indicando a localização do bioma caatinga	22
Figura 2-	Compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas e suas principais funções adaptativas.....	24
Figura 3-	Principais vias do metabolismo secundário.....	25
Figura 4-	Estrutura química do nerolidol: cis (Z) e/ou trans (E), respectivamente.....	28
Figura 5-	Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	30
Figura 6-	Etapas dos eventos de genotoxicidade e mutagenicidade.....	32
Figura 7-	Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa...	33
Figura 8-	Microscopia de fluorescência, eritrócitos micronucleados.....	34

Artigo 1

Figura 1-	Cell viability of nerolidol in S-180, HEK 293 and J774.A1, within 24h and 48h.....	48
Figura 2-	The hemolytic degree of nerolidol. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments.....	50
Figura 3-	Photomicrographs of different tissues submitted to acute toxicity studies...	54

Artigo 2

Figura 1-	Antioxidant activity of nerolidol assayed by the sequestration (SRL) of the free radical DPPH •. BHT: Butylated hydroxytoluene	69
Figura 2-	Antioxidant activity of nerolidol assayed by the ABTS • + radical inhibition method. BHT: Butylated hydroxytoluene.....	70
Figura 3-	Inhibition of biofilm formation produced by bacterial strains after treatment with nerolidol.....	73
Figura 4-	Inhibition of biofilm formation produced by clinical isolates of <i>K. pneumoniae</i> carbapenemase, <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. aureus</i> following nerolidol treatment.....	74

Artigo 3

Figura 1-	Ensaio de apoptose e necrose do nerolidol por citometria de fluxo. Gráficos de pontos citométricos de fluxo de controle das células tratadas com BNZ e o nerolidol nas concentrações de 1X a IC50 e 2X a IC50.....	90
Figura 2-	Efeitos do nerolidol no potencial da membrana mitocondrial. Sobreposição de histogramas obtidos por citometro de fluxo das células de controle e tratadas com nerolidol marcadas com Rho 123 (FL1-H).....	91
Figura 3-	Efeitos do nerolidol na formação de compartimentos ácidos. Sobreposição de histogramas obtidos por citometro de fluxo das células de controle e tratadas com nerolidol marcadas com laranja de acridina.....	91

Apêndice A

Figura 1-	Rotas metabólicas da síntese de terpenos/terpenoides: via do mevalonato e via do 1desoxixilulose-5-fosfato (DXP)	111
Figura 2-	Exemplos de constituintes terpênicos	112
Figura 3-	Estrutura química do nerolidol: cis (Z) e/ou trans (E), respectivamente	112
Figura 4-	Folha de <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill	113

Apêndice B

Figura 1-	Avaliação ponderal do peso dos camundongos tratados com nerolidol	127
-----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1-	Classificação dos Terpenos.....	27
-----------	---------------------------------	----

Artigo 1

Tabela 1-	Mean values obtained in water consumption, feed intake, and weight gain, evaluated for 14 days in male mouse control groups and mice treated with nerolidol.....	51
Tabela 2-	Blood biochemical parameters of mice orally administered nerolidol for	

	14 days.....	52
Tabela 3-	Blood hematological parameters of mice treated orally with nerolidol for 14 days.....	52
Tabela 4-	Relative organ mass after euthanasia of male nerolidol-treated mice	53
Tabela 5-	Histomorphometric analysis of the livers, kidneys, and spleens of mice exposed to nerolidol.....	54
Tabela 6-	Evaluation of nerolidol mutagenicity.....	55

Artigo 2

Tabela 1-	Antibacterial activity of nerolidol against standard bacterial strains.....	72
Tabela 2-	Antibacterial activity of nerolidol against resistant bacterial clinical isolates.....	72

Artigo 3

Tabela 1-	Antibacterial activity of nerolidol against standard bacterial strains.....	90
-----------	---	----

Apêndice A

Tabela 1-	Fontes vegetais de nerolidol presentes em OE.....	114
-----------	---	-----

Apêndice B

Tabela 1-	Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNC.....	128
Tabela 2-	Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNA.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitros
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
7-AAD	7-aminoactinomicina D
AAPH	2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
Abs	Absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ALT/TGP	Alanina Aminotransferase /Transaminase Glutâmico Pirúvica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Acridine Orange
ASTM	American Society for Testing and Materials
AST/TGO	Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico Oxalacética
ATCC	American Type Culture Collection
ATT	Atividade Antioxidante Total
AV	Anexina V
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidrotolueno
BZN	Benznidazol
°C	Grau
CBDC	Consenso Brasileiro de Doença de Chagas
CBM/MBC	Concentração Bactericida Mínima
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CI ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular
CIM/MIC	Concentração Inibitória Mínima
CFU	Colony Forming Unit
CL ₅₀	Concentração que mata 50% dos animais exposto ao produto testado
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Dióxido de Carbono
DF	Damage factor

DI	Damage Index
DL ₅₀ / LD ₅₀	Dose letal média
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.P.	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil1-picrilhidrazil
DXP	1desoxixilulose-5-fosfato
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EPA	Environmental Protection Agency
EPS	Substancia extracelular polimetrica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FD	Frequência de dano
FSC	Dispersão Frontal
g	Grama
HC	Hospital das Clínicas
HE	hematoxylin-eosin
HEK-293	Células embrionárias do rim humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ID	Índice de dano
ISe	Índice de Seletividade
IV	Índice de variação
JJ74.A1	Macrófagos murinho
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular
MCV	Mean Corpuscular Volume
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma de peso
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MN	Microcúcleo
MNT	Teste do Microcúcleo
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NCE	Eritrócitos normocromáticos
Nm	Nanômetro
O	Oxigênio
OECD	Organisation for economic cooperation and development
OE/EO	Óleo essencial
OMS/ WHO	Organização Mundial de Saúde/
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBCs	Red Blood Cells
RDW	Largura de distribuição de células vermelhas
Rho	Rhodamina 123
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Desvio Padrão
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SSC	Dispersão Lateral
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo Triptona Soja
UFPE/ CAV	Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	CAATINGA	21
3.2	PLANTAS MEDICINAIS	22
3.3	MOLÉCULAS BIOATIVAS: METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	23
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)	26
3.5	TERPENOS	26
3.6	NEROLIDOL	28
3.7	TESTES DE SEGURANÇA.....	29
3.7.1	Citotoxicidade	30
3.7.2	Ensaio hemolítico	30
3.7.3	Toxicidade Aguda	31
3.7.4	Genotoxicidade e Mutagenicidade	31
3.7.4.1	Ensaio Cometa	32
3.7.4.2	Teste de Micronúcleo (MN)	34
3.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS	35
3.8.1	Antioxidantes	35
3.8.2	Antimicrobianos	36
3.8.3	Antibiofilme	38
3.8.4	Atividade antiparasitária frente à <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
4	ARTIGO I- Assessment of Cytotoxicity, Oral Toxicity, Genotoxicity, and Mutagenicity of Nerolidol	41
5	ARTIGO II- Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Antibiofilm Activity of the Sesquiterpene Nerolidol	63
6	ARTIGO III- Avaliação do Efeito Antiproliferativo do Nerolidol Frente à Cultura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE A - Nerolidol: Fitoconstituente de Óleos Essenciais de Plantas da Caatinga	109
APÊNDICE B - Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados com Nerolidol	122

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais na terapêutica é empregada desde os tempos remotos e ao longo do tempo, estudos vêm admitindo a presença de diversos compostos químicos com propriedades medicinais em espécies vegetais, levando conseqüentemente a um aumento significativo no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. O uso de fitoterápicos tende a alcançar um status importante no processo terapêutico contemporâneo, pois, a utilização de medicamentos de origem vegetal tem se expandido significativamente a

A planta é considerada medicinal por conter substâncias com ação farmacológica, conhecidas como princípio ativo. A utilização dessas plantas como terapia alternativa ou complementar no tratamento de diversas doenças está em crescente desenvolvimento, devido à facilidade de obtenção, utilização e o elevado interesse das indústrias farmacêuticas investirem em metabólitos secundários de atividade biológica (CARDOSO et al., 2019; nível mundial. (HALBERSTEIN, 2005; EDDOUKS; AJEBLI, 2017; AYE, 2019; PAULA; LIMA, 2019).

Os componentes químicos oriundos do metabolismo secundário são os responsáveis pelo potencial farmacológico atribuído as espécies vegetais, onde se destacam as classes dos flavonoides, taninos e terpenos. Dentre o amplo espectro de moléculas provenientes do metabolismo secundário das plantas, os terpenos são frequentemente identificados em óleos essenciais de plantas (cerca de 90%). Os terpenos são compostos de odor característico, presentes em diversos órgãos das plantas tais como raízes, caules (casca e entrecasca), folhas, flores e sementes (BONIFÁCIO et al., 2014; FELIPE; BICAS, 2017).

Os terpenos também são conhecidos como terpenoides ou isoprenoides, suas moléculas são de tamanho relativamente pequeno e constituem a maior classe de produtos naturais, com número superior a 55.000 compostos conhecidos (CHANG et al., 2010). Essas moléculas apresentam em sua constituição seguimentos de unidades isoprênicas com átomos de carbono geralmente múltiplos de cinco ligados entre si (MATICH et al., 2007). As estruturas características dos terpenos contêm um esqueleto carbônico representado por $(C_5)_n$ e são classificadas como hemiterpenos (C_5), monoterpênicos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (DEWICK, 2009).

O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico natural encontrado em diversos óleos voláteis de planta tais como, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (capim-limão), *Lavandula officinalis* Chaix (alfazema) e *Jasminum* sp. (jasmim). Quanto a suas propriedades biológicas são

atribuídas atividades: antiúlcera, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória e ainda atividade biocida para diferentes patógenos, inclusive protozoários. Essa substância vem sendo comumente utilizada na produção de cosméticos incluindo perfumes, xampus e sabonetes (DEWICK, 2009; KLOPELL, et al., 2007; MCGINTY; LETIZIA; API; 2010; CHAN et al., 2016).

Em suma, o crescente interesse por essas moléculas na terapêutica, tem sido atribuído principalmente a gama de propriedades biológicas dos terpenos, contudo é primordial o desenvolvimento de novos estudos que visem atestar as atividades funcionais para que, com base nisso, sejam propostos novos recursos terapêuticos, favorecendo um conhecimento efetivo de tratamentos alternativos associados à utilização dos diferentes tipos de terpenos (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO et al., 2010; BASTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2011; ALVES et al., 2019).

Considerando a importância dos terpenos frente à identificação de novas atividades biológicas, o presente estudo objetivou avaliar o nerolidol quanto ao seu perfil de citotoxicidade, atividade hemolítica, toxicidade aguda, mutagenicidade, genotoxicidade, atividade antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e os efeitos antiproliferativos frente à cultura do *Trypanosoma cruzi*.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o perfil de segurança (citotoxicidade, atividade hemolítica, toxicidade aguda, mutagenicidade, genotoxicidade) e as atividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e antiproliferativa do nerolidol.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar citotoxicidade do nerolidol;
- ✓ Analisar a atividade hemolítica do nerolidol;
- ✓ Verificar a toxicidade aguda nerolidol;
- ✓ Verificar a genotoxicidade do nerolidol;
- ✓ Verificar a mutagenicidade do nerolidol;
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante do nerolidol;
- ✓ Analisar a atividade antimicrobiana do nerolidol;
- ✓ Analisar a atividade antibiofilme do nerolidol;
- ✓ Avaliar os efeitos antiproliferativos do nerolidol frente à cultura do *Trypanosoma cruzi*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CAATINGA

A caatinga é um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro, ocupando, uma área com cerca de 844.453 km², o que equivale a aproximadamente 70% da região Nordeste (Figura 1) e 9,92% do território nacional, isso significa que grande parte do patrimônio biológico desse bioma não pode ser encontrado em outro lugar do planeta, além disso é caracterizado por sua heterogeneidade, apresentando um número expressivo de táxons raros e/ou endêmicos. Entretanto, dentre os biomas pertencentes ao Brasil, é considerado o mais desvalorizado e menos explorado botanicamente (IBGE, 2004; BRASIL, 2005; GARIGLIO et al., 2010; HAUFF, 2010; ANDRADE; DANTAS, 2020).

Quanto a sua distribuição na região Nordeste do Brasil, o bioma caatinga abrange os estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Maranhão, Alagoas, Pernambuco, Sergipe e Bahia. Também apresenta-se em algumas faixas da região Sudeste que situam-se ao norte do estado de Minas Gerais. O clima que envolve a região da caatinga é o tropical semiárido, o qual é caracterizado por longos períodos de estiagem. Os principais atributos da vegetação são árvores baixas, troncos tortuosos e presença de espinhos e folhas que caem no período da seca (PRADO, 2003; TABARELLI et al., 2018).

De acordo com Ganem (2017) a caatinga apresenta uma ampla diversidade de plantas que vem sendo utilizadas pelo homem na produção de resina, borrachas, óleos essenciais, fármacos e cosméticos, dentre as espécies comumente conhecidas destacam-se, castanha de caju (*Anacardium occidentale*), fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), óleo de oiticica (*Licania rigida*), borracha de maniçoba (*Manihot glaziovvi*) e fibra caroá (*Neoglasiovia variegata*). As plantas da caatinga também são bastante utilizadas com finalidade terapêutica, principalmente, aroeira, joazeiro, mororó, catingueira, angico, faveleira e jurema preta para processos inflamatórios, doenças intestinais e cicatrização de ferimentos (PEREIRA JÚNIOR et al., 2014; ALVES et al., 2019).

As espécies próprias da caatinga possuem em sua composição química várias substâncias, tais como, taninos, flavonoides, esteroides e terpenos, nesta perspectiva, o número de estudos acerca das plantas medicinais da região semiárida do Nordeste do Brasil tem aumentado de forma progressiva (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; RIBEIRO et al., 2014).

Figural. Mapa do Brasil indicando a localização do bioma caatinga

Fonte: IBGE (2004).

3.2 PLANTAS MEDICINAIS

Entende-se por planta medicinal: “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”, essas plantas são comumente utilizadas para prevenção, tratamento, e cura de doenças e representam a forma mais antiga de prática medicinal realizada pela humanidade (OMS, 1998; BRIZZOLLA et al., 2018). No Brasil, o uso de plantas medicinais iniciou no século XVI com os povos indígenas que empregavam suas próprias experiências para diferenciar as plantas com propriedades terapêuticas daquelas com efeitos nocivos e em meados do século XX se expandiu e consolidou-se devido à chegada dos europeus, africanos e holandeses (OMS, 1998; OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006; BRANDÃO et al., 2009).

Entre a década de 50 e 70, a indústria química marginalizou a utilização de plantas medicinais devido ao incentivo que a química orgânica produziu na medicina alopática. No entanto, a partir da década de 80, as plantas medicinais foram revalorizadas como fonte eficaz de propriedades terapêuticas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; LAMEIRA; PINTO, 2008; TEIXEIRA et al., 2014). Nos dias atuais, as plantas medicinais representam uma relevante alternativa de tratamento e/ou prevenção de doenças, não apenas por sua

eficácia terapêutica, mas por envolver terapias de origem natural e com menor potencial de toxicidade (ARNOUS et al., 2005; CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

Segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento fazem uso de práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde e 85% utilizam plantas medicinais ou preparações destas, como recurso terapêutico (BRASIL, 2006; ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Salienta-se que, o uso de plantas medicinais no Brasil tem crescido ao longo do tempo, devido a vários fatores como: elevada diversidade da flora brasileira, eficácia frente ao uso terapêutico e baixo custo à aquisição, o que gera interesse de pesquisadores na busca por novas moléculas bioativas e dos programas de assistência como o Sistema Único de Saúde - SUS (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Embora, represente a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, no Brasil, apenas 8% destas, foram avaliadas para estudos de compostos bioativos e somente 1.100 tiveram suas propriedades medicinais exploradas (BRASIL, 2006; CARVALHO, PEREIRA; ARAÚJO, 2015). À vista disso, a produção de um maior número de estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos pode proporcionar diversos avanços para a ciência farmacêutica no que se refere a identificação de novos fármacos, pois, a presença de moléculas bioativas em plantas de interesse medicinal tem sido amplamente estudada nos últimos anos, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos, além disso, podem contribuir para a preservação da biodiversidade (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

3.3 MOLÉCULAS BIOATIVAS: METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo das plantas está associado à sua fisiologia, e ocorre mediante as transformações das moléculas orgânicas catalisadas por enzimas, essas modificações ocorrem em células vivas, suprimindo o organismo de energia, e contribuindo para a renovação de suas moléculas, assegurando consequentemente, a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). As reações de transformação das moléculas orgânicas apresentam determinadas direções devido à presença de enzimas específicas, constituindo dessa forma, as rotas metabólicas, que são estruturadas levando em consideração o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências essenciais da célula, estes componentes orgânicos são divididos em: metabólitos primários e secundários (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, os quais são essenciais para a biossíntese de moléculas de carboidratos, lipídeos, proteínas, enzimas, clorofila, ácidos nucleicos e outras substâncias responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das funções vitais das células vegetais (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários (Figura 2) estão relacionados com a manutenção e desenvolvimento das plantas que os sintetizam, incluindo defesa contra patógenos e herbívoros, atração de polinizadores, permissão da tolerância de temperaturas extremas e processos de adaptação a estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 2. Compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas e suas principais funções adaptativas.



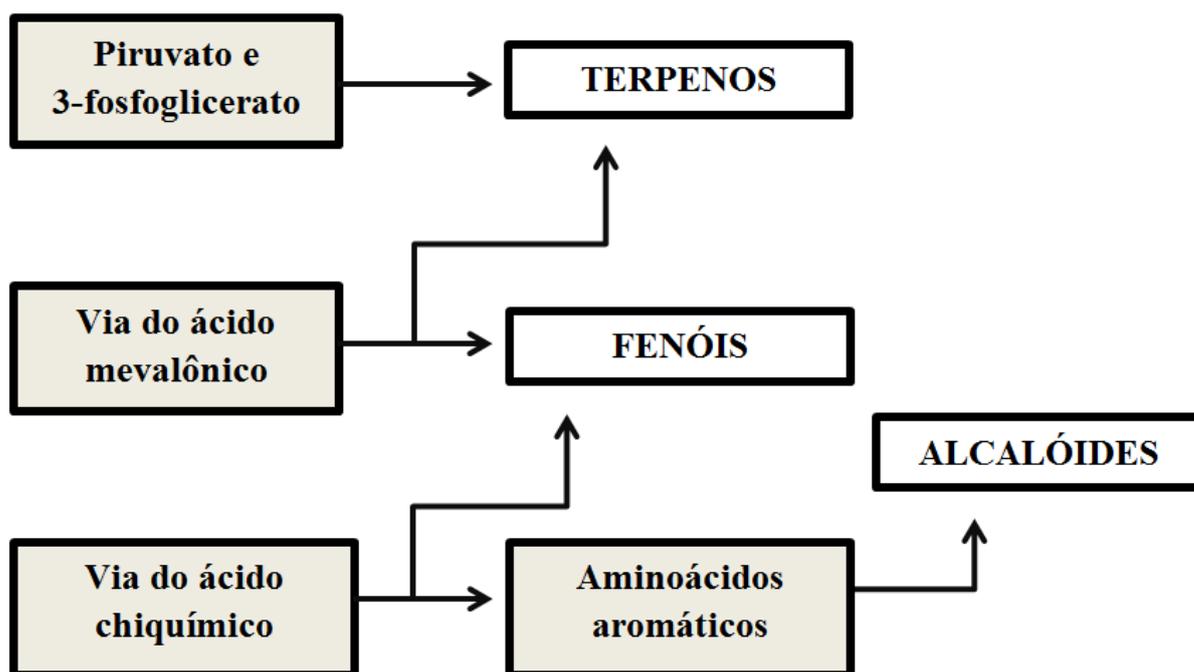
Fonte: Hartmann (1996).

Geralmente, os metabólitos secundários têm uma estrutura complexa e de baixo peso molecular, além disso, possuem importantes atividades biológicas, o que os difere dos metabólitos primários. Os metabólitos secundários despertam um elevado interesse da comunidade científica, devido a sua potencial ação frente ao desenvolvimento de novos fármacos e os benefícios que podem conferir a saúde humana e ao meio ambiente. Os

metabólitos secundários das plantas podem ser subdivididos em três grupos quimicamente diferentes, alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (BERG; LUBERT, 2008).

A biossíntese desses compostos (Figura 3) dá-se da seguinte forma: os alcaloides, cerca de 12000, são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, os compostos fenólicos (em torno de 8000) podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico ou via do ácido mevalônico e os terpenóides, aproximadamente 55000, são produzidos através do metabolismo secundário a partir da via do ácido mevalônico e ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (CROTEAU; KUTCHAN; LEWISSET, 2000; KITAOKA et al., 2015). Particularmente, os terpenos desempenham diversas atividades biológicas e são componentes majoritários de substâncias voláteis, denominados óleos essenciais ou essências (SIMÕES et al., 2007; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Figura 3. Principais vias do metabolismo secundário



Fonte: Adaptado de Felipe e Bicas (2017).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)

Os Óleos Essenciais (OE) são compostos voláteis ou etéreos constituídos por uma ampla variedade de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas que podem variar entre as espécies e partes de um mesmo vegetal. Além de desempenharem um papel importante na planta como agentes protetores (devido a condições de estresse biótico e abiótico) os OE também têm sido referidos com efeitos benéficos para saúde humana (OUSSALAH et al., 2007; MIGUEL, 2010; ZUZARTE et al., 2011).

Quanto aos aspectos, os OE são compostos insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, sua obtenção ocorre a partir da extração de diferentes partes das plantas mediante técnicas simples tal como, arraste de vapor. Os constituintes químicos presentes nos OE são principalmente derivados terpênicos, como os monoterpenos e sesquiterpenos (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA- NOVALES, 2012).

3.5 TERPENOS

Os terpenos são compostos derivados de unidades de isopreno (fórmula molecular C_5H_8) e constituem a maior classe de produtos naturais obtida majoritariamente dos OE das plantas, além disso, possuem uma ampla variedade estrutural e funcional. Alguns desses compostos estão relacionados aos processos de respiração e desenvolvimento celular, revelando importância tanto para o metabolismo primário quanto para o secundário (PHILLIPS et al., 2008).

Os terpenos classificam-se (Tabela 1), de acordo com a quantidade de unidades isopreno, hemiterpenos (C_5H_8), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), sesterpenos ($C_{25}H_{40}$), triterpenos ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$) e politerpenos com número superior a 8 unidades isopreno (SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Tabela 1. Classificação dos Terpenos

Unidade de isopreno	Número de átomos de carbono	Classificação
1	5	Hemiterpeno
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
5	25	Sesterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
> 8	>40	Politerpeno

Fonte: Adaptado de Filipe e Bicas (2017).

Quanto às classes de terpenos, os monoterpenos e sesquiterpenos são competentes abundantes encontrados em OE e a demais classes, são constituintes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas (ADAMS, 2007). Os monoterpenos abrangem cerca de 90% dos componentes presentes na essência volátil de flores e OE extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas. Existem mais de 1.000 monoterpenos, e estes por sua vez, oferece uma grande variedade estrutural, essas substâncias possuem estruturas variadas tais como: ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos, cada um possui característico perfil aromático e efeito bioquímico (OLIVEIRA; GODOY; COSTA, 2003; PERES, 2004; BAKALLI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2014).

Dentre os monoterpenos comumente conhecidos encontrados nos OE estão, canfenos, limoneno, β -pineno, α -terpineol, sabineno, decanal, linalol, citrionelol, neral, mirceno, gerania e α -pinene (MARGETTS, 2005; PAVARINI; LOPES, 2016; FELIPE; BICAS, 2017).

De acordo com Bohlmann e colaboradores (1998) existe um número superior a 7.000 sesquiterpenos conhecidos, muitos destes desempenham ação de defesa nas plantas e demonstram uma extensa variedade de propriedades biológicas. Compreendem estruturas de baixo peso molecular e devido a sua volatilidade proporcionam o aroma característico dos OE de frutas cítricas, ervas especiarias e condimentos (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014).

Os sesquiterpenos de interesse científico presentes nos OE são AR-diidrotermerona, AR-curcumeno, AR-turmerol, bisabolol, cadinol, *orto* acetoxi bisabolol, sesquicineol, valenceno, zingibereno, AR-curcumeno, β -sesquifelandreno, bisaboleno, óxido cariofileno e nerolidol (MARGETTS, 2005; PAVARINI; LOPES, 2016; FELIPE; BICAS, 2017).

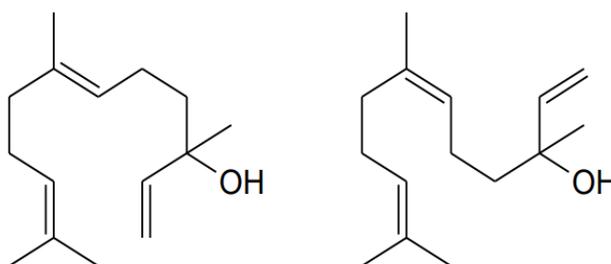
De forma geral, os monoterpenos e sesquiterpenos têm despertado grande interesse por parte da comunidade científica, devido a seu amplo espectro de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasitária, analgésica

e antioxidante (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995; BEZERRA et al., 2009; MORALES-YUSTE et al., 2010; COLOMA et al., 2011).

3.6 NEROLIDOL

O nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) é um sesquiterpeno acíclico oxigenado, quimicamente definido como [3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrieno-3-ol]. Este composto é encontrado na natureza sendo facilmente obtido através de síntese orgânica sob duas formas isoméricas, cis e trans (Figura 4), que se diferenciam na isomeria geométrica da dupla ligação dos carbonos 6 e 7. É um constituinte comum de vários OE de plantas tais como: *Croton argyrophylloides* Muell. Arg., *Piper aduncum* L., *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. e *Zornia brasiliensis* Vogel (KATTA et al., 2001; MOURA; MARTINS; SILVA, 2019).

Figura 4. Estrutura química do nerolidol: cis (Z) e/ou trans (E), respectivamente



Fonte: Diniz et al. (2016).

Vale destacar que, a utilização do nerolidol na indústria cosmética e sua aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América viabilizou o uso do nerolidol como flavorizante de alimentos. Tratando-se de um constituinte encontrado em várias espécies vegetais, a comunidade científica vem explorando cada vez mais as propriedades medicinais do nerolidol e os potenciais benefícios que podem trazer para a saúde humana e o meio ambiente (LAPCZYNSKI et al., 2008; MCGINTY, LETIZIA; API, 2010; CHAN et al., 2016).

Estes estudos vêm atestando ao nerolidol, uma grande variedade de propriedades biológicas, tais como: antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antinociceptiva, antiúlcera, anti-inflamatória, inseticida, neuroprotetora, antineoplásica, leishmanicida, ansiolítica e (ARRUDA et al., 2005; MARQUES et al., 2010; NOGUEIRA NETO et al., 2013; YAMANE; WILLIAMS; BARRY, 2013; CHAN et al., 2016). Embora apresente potenciais

propriedades bioativas, são escassas as informações sobre a utilização efetiva do nerolidol, logo, são necessários testes de segurança que garantam sua aplicabilidade comercial.

3.7 TESTES DE SEGURANÇA

A busca por substâncias precursoras de novos fármacos tem aumentado o interesse da indústria farmacêutica e das instituições de pesquisa por produtos naturais, uma vez que, inúmeras espécies vegetais fornecem diversas moléculas bioativas. Logo, faz-se necessário, garantir a inocuidade de tais moléculas através da avaliação do perfil de segurança o que resultara em informações adequadas quanto ao uso de extratos vegetais e seus fitocosntituintes (BEDNARCZUK et al., 2010).

De acordo com o conhecimento empírico a planta e seus componentes, por serem de origem natural, não conferem riscos á saúde, o que fortalece ainda mais a necessidade de conhecimento acerca do modo de utilização, posto que, algumas plantas possuem substâncias potencialmente nocivas. Dentre os exemplos de substâncias que causam efeitos tóxicos destacam-se o apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos os quais provocam toxidez para as células do fígado (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Efeitos de toxicidade renal são ocasionadas por alguns terpenos e saponinas, substâncias comumente presentes em espécies vegetais. Ademais, várias substâncias isoladas de plantas medicinais apresentam atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, evidenciando uma relação com a incidência de tumores (AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGUER, 2000).

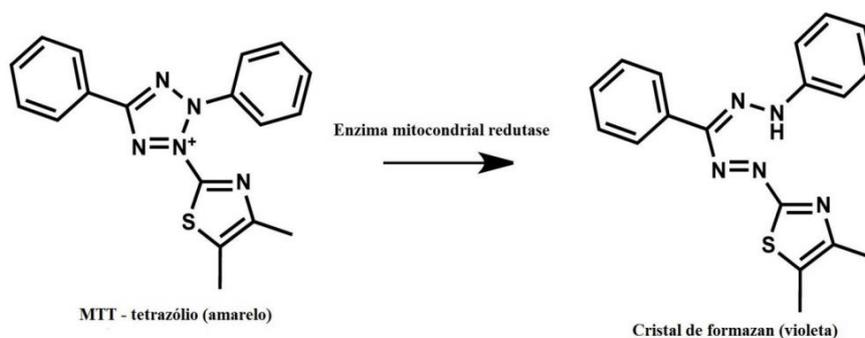
À vista disso, os testes de segurança são importantes para avaliar a toxicidade das plantas medicinais e de seus fitoconstituintes, o que permite com que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade. Esses testes têm como finalidade, caracterizar potenciais efeitos tóxicos dos constituintes ativos, estimar o grau de perigo e elucidar o mecanismo de toxicidade induzido pelas espécies vegetais. Os testes de toxicidade são realizados de acordo com protocolos reconhecidos internacionalmente. Vale destacar que, os ensaios toxicológicos são utilizados como dados complementares para os ensaios biológicos (LAPA et al., 2003). Em geral, os testes de toxicidade considerados mais relevantes para avaliação do perfil de segurança das plantas e de seus componentes químicos são os de, citotoxicidade, hemolítico, toxicidade aguda, genotoxicidade e mutagenicidade.

3.7.1 Citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular tem como finalidade avaliar a capacidade de uma substância em provocar efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. O ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é um teste colorimétrico frequentemente utilizado para determinar a viabilidade celular induzida por algum composto ou toxina no metabolismo celular de carboidratos, comumente por meio da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase) e do seu respectivo potencial redox (Figura 5). A viabilidade é estabelecida pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) em cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Esses cristais são extraídos mediante adição de um solvente. A variável resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Esse tipo de ensaio apresenta várias vantagens tais como, rapidez, segurança e alto grau de precisão quando comparado a outros métodos colorimétricos ou outras técnicas como as radioativas (MOSER, 2011).

Figura 5. Redução do MTT por enzimas mitocondriais



Fonte: Bochnie, Gregório; Maciel (2016).

3.7.2 Ensaio hemolítico

A hemólise é caracterizada pela ruptura de eritrócitos com liberação de hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma pode provocar sérios danos em alguns órgãos vitais como, fígado, rins e coração (CARVALHO et al., 2007). Diante dessa perspectiva, a triagem de

atividades biológicas e toxicológicas de compostos de origem vegetal requer e realização do ensaio hemolítico de espécies vegetais.

As metodologias disponíveis para a avaliação da atividade hemolítica de espécies vegetais são bastante diversificadas. A OMS recomenda avaliação qualitativa através da análise visual da coloração vermelha resultante da liberação de hemoglobina (WHO, 1998). Outra alternativa é a técnica de observação de formação de halos de hemólise em placas de ágar sangue (EFING, 2008). A técnica preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fundamenta-se na observação da absorvância (BRASIL, 2003).

3.7.3 Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade oral aguda analisam os efeitos nocivos que acontecem em um curto período de tempo após a administração de substâncias com elevadas doses (única ou múltipla) durante 24 h, o que conseqüentemente irá fornecer subsídios acerca dos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (BRITO, 1994; DIPASQUALE; HAYES, 2001).

Esse teste é realizado com o intuito de estimar a Dose Letal Média - DL50 ou Concentração Letal Média - CL50 (AMENI, 2011) da substância avaliada. Desse modo, os efeitos verificados nos animais são associados, a quantidade de produto administrado e a morte do animal, que é considerada a principal evidência de toxicidade.

Os resultados obtidos por meio do teste de toxicidade aguda caracteriza a relação dose-resposta em tecidos e órgãos alvo mediante avaliações macro e microscópicas, além de outros parâmetros (bioquímicos e hematológicos). Além disso, esses testes têm a possibilidade de identificar os agravos relacionados às vias de exposição, gênero e idades dos animais (CORREA; BOFF; 2009).

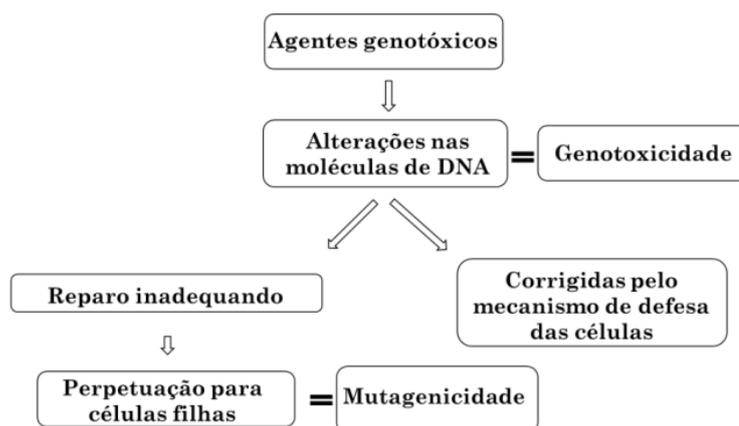
3.7.4 Genotoxicidade e Mutagenicidade

A atividade genotóxica (Figura 6) consiste na sua capacidade de induzir alterações do material genético do organismo exposto a uma determinada substância. Essas substâncias interagem com o material genético gerando modificações oxidativas ou até mesmo lise da molécula de DNA. Geralmente, o dano é reparado através do próprio organismo enquanto que, quando a lesão é fixada, as modificações podem inclusive atingir as células filhas durante o processo de replicação (WHITE; RASMUSSEN, 1998; SASAKI et al. 2000; OBE et al., 2002; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008). A genotoxicidade de um

composto pode ser determinada mediante ensaios que avaliem o dano cromossômico como por exemplo a eletroforese em gel (ensaio cometa).

Entretanto, a mutagenicidade (Figura 6) caracteriza-se por modificações permanentes na sequência do DNA que podem resultar em alterações hereditárias nas características dos sistemas vivos (SŁOCZYŃSKA et al., 2014). A maioria das mutações é decorrente de agentes físicos, químicos ou biológicos (GAMEIRO, 2005; CALVIELLO et al., 2006). O efeito mutagênico pode ser verificado por meio de ensaio *in vitro* ou *in vivo*. Um dos ensaios de mutagenicidade mais utilizados é o teste do micronúcleo (MN), um bioindicador do efeito clastogênico (quebra de cromossomos) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal) os quais evidenciam instabilidade genômica (LINDBERG et al 2007; IARMARCOVAI et al. 2008; THIERENS; VRAL, 2009; MUGHAL et al. 2010; TERRADAS et al. 2010).

Figura 6. Etapas dos eventos de genotoxicidade e mutagenicidade



Fonte: Bernardes (2016).

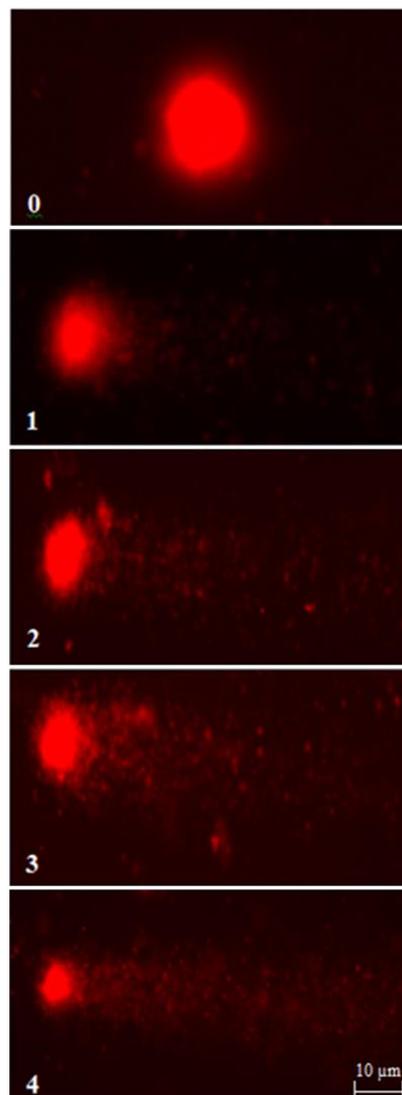
3.7.4.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi proposto inicialmente em 1984 com a finalidade de inferir a eficiência da radioterapia e quimioterapia em células de tumores humanos *in vivo*, sem a necessidade de utilizar marcadores radioativos além de empregar um número reduzido de células para a realização do ensaio (ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

Este tipo de teste baseia-se na observação de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico. Inicialmente, as células são homogeneizadas em gel e dispersas em uma lâmina, em seguida, são submetidas a uma corrente elétrica que atua como uma força contribuindo para a migração dos fragmentos livres (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

Após a eletroforese, as células que possuem um núcleo íntegro são definidas como normais (sem lesão detectável no DNA). Enquanto que, as células danificadas apresentam-se como um tipo de cauda, semelhante a um cometa (composto por fragmentos de DNA). Esses fragmentos podem possuir diferentes tamanhos, os quais, são classificados de acordo com uma escala visual (Figura 7) que vai de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) através de microscopia (DA SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003; GONÇALVES; CONCEIÇÃO; RESGALL-JUNIOR, 2003; COLLINS, 2008; SPIVAK; COX; HANAWALT, 2009). O ensaio cometa apresenta inúmeras vantagens tais como: simplicidade, rapidez, flexibilidade, baixo custo, utilização de pouco material, confiabilidade e sensibilidade (TICE et al., 2000; DUSINSKA; COLLINS et al., 2008).

Figura 7. Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).



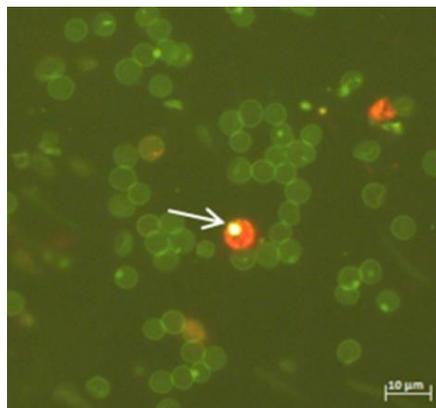
Fonte: Moura (2020).

3.7.4.2 Teste de Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo (MN) é utilizado para identificar algumas formas de mutações cromossômicas. Micronúcleo (Figura 8) é conhecido como uma reduzida massa nuclear delimitada por uma membrana e separada do núcleo principal. O MN é constituído no decorrer do processo de divisão celular, quando, na etapa de telófase, o envelope nuclear reconstitui-se em torno dos cromossomos das células filhas, podendo ser formado por fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que por serem geralmente pequenos, permanecem no citoplasma durante a divisão celular e conseqüentemente não são incluídos no núcleo principal das células filhas. Em vista disso, a identificação de MN representa perda de cromatina como resultado de dano cromossômico estrutural (SCHMID, 1975; CARRARD et al., 2007; FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

O teste de MN tem sido proposto para estudos de monitoramento ambiental, danos citogenéticos induzidos por radiações, estilo de vida, deficiências em nutrientes e doenças, sobretudo, pela capacidade de identificar fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou cromossomos inteiros (efeito aneugênico) originados de um determinado agente químico, físico ou biológico. (SCHMID, 1976; STICH et al., 1998; FENECH, 2000; RIBEIRO; MARQUES, 2003; PASTOR et al., 2003). Vale destacar que, segundo Garajvrhovac e Zeljezic (2001), o teste de MN tem sido largamente utilizado *in vitro*, *in vivo* e *in situ* devido a diversas vantagens (simples, eficaz e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos).

Figura 8. Microscopia de fluorescência, eritrócitos micronucleados. eritrócitos normocromáticos corados em verde; Glóbulos vermelhos policromáticos corados em vermelho; Eritrócitos policromáticos micronucleados apontados pela seta branca.



Fonte: Moura (2020).

3.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.8.1 Antioxidantes

Antioxidantes são moléculas tanto de origem natural (originadas principalmente de plantas na forma de compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides) quanto sintética, como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidrotolueno (BHT), amplamente utilizados pela indústria de alimentos (KITTS, 1994; REDDY et al., 2012). Essas substâncias possuem a capacidade de agir contra os danos normais provocados pelos efeitos do processo fisiológico de oxidação no tecido animal. O estresse oxidativo acontece quando a produção de moléculas prejudiciais, denominadas radicais livres, encontra-se de forma superior a capacidade protetora das defesas antioxidantes (FIB, 2015).

Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétrons não pareados modifica a reatividade química do átomo ou molécula, tornando-os altamente reativos e instáveis. Geralmente, devido a sua instabilidade, os radicais livres possuem uma vida curta e reagem rapidamente com vários compostos e podem acometer alvos celulares (TIRAPEGUI, 2006).

Os radicais livres são produzidos através de processos aeróbicos (como a respiração celular), processos infecciosos (abrangendo ativação fagocítica), durante o exercício físico intenso ou decorrente da ação de poluentes e toxinas, como fumaça de cigarro, álcool, radiação ultravioleta, agrotóxicos e ozônio (LOBO et al., 2010).

O aumento dessas moléculas no organismo resulta em alterações a nível molecular que estão relacionados com danos das macromoléculas biológicas (como lipídeos, proteínas e DNA), causando modificações em vários tecidos que estão envolvidos em uma ampla variedade de processos patológicos, tais como: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes e artrite reumatoide (BARBOSA et al., 2010).

Entretanto, o excesso de radicais livres pode ser equilibrado nos seres vivos mediante vários compostos antioxidantes, os quais podem ser de origem endógena (como a superóxido dismutase) ou exógena (dieta alimentar e outras fontes), destas, recebem notoriedade os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. Esses antioxidantes têm a capacidade de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que os mesmos acometam os alvos biológicos nas células (SOUSA et al. 2007).

Embora diversas substâncias sejam consideradas radicais livres, as de maior interesse são as espécies reativas ao oxigênio (ERO) que incluem todos os radicais derivados do

oxigênio. O elemento oxigênio (O) é fundamental para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular, contudo, uma quantidade diminuta do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, gerando uma ampla variedade de moléculas químicas altamente reativas, ou seja, as ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002; SLESAK et al., 2007).

As ERO em baixos níveis e sob condições normais apresentam um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune frente a infecções. Os fagócitos (componentes celulares da imunidade) geralmente têm um mecanismo de defesa capaz de englobar e digerir corpos estranhos, neste processo ocorre um elevado consumo de oxigênio, conhecido como queima ou explosão respiratória. Todavia, devido a sua elevada reatividade, o acúmulo de ERO além das necessidades imediatas da célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao causar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como o DNA, proteínas e lipídios (CUI et al., 2004).

3.8.2 Antimicrobianos

A utilização de antimicrobianos obtidos a partir de produtos naturais, como os extratos vegetais tem sido considerada uma alternativa promissora para a redução ou eliminação microrganismos patogênicos, resultando em um aumento significativo da busca por esses novos recursos terapêuticos (BURT, 2004; SILVA et al., 2010). Além disso, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, há um aumento considerável de estudos sobre a atividade antibacteriana de extrato de plantas (ELOFF, 1998). Dimitrova et al. (2017) por exemplo, avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a isolados de *Staphylococcus* spp. e evidenciaram que extratos metanólicos e frações de plantas apresentaram inibição ou inativação do microrganismo avaliado.

A estrutura química de antibióticos vegetais se diferencia daquelas derivadas de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou até mesmo modificando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). As plantas tem a capacidade de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, possivelmente para sua própria defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas propriedades medicinais e aromáticas que conferem o que, desperta o interesse da comunidade científica, indústria farmacêutica e de alimentos (LAPA et al., 2002).

Esses compostos são produzidos por meio do metabolismo secundário das plantas, e possui uma constituição química diversificada. Tendo em vista, os compostos com potencial atividade antimicrobiana pode-se mencionar: terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonoides), compostos nitrogenados (alcaloides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora (SIMÕES et al., 2003; RESCHKE, MARQUES; MAYWORM, 2007).

O possível mecanismo responsável pela ação antimicrobiana dos princípios ativos extraídos das plantas está associado a fatores envolvidos com o metabolismo intermediário da bactéria como: bloqueio de reações químicas, ação direta sobre a atividade enzimática ou alterações nas estruturas de membrana (SINGH; SHUKLA, 1984; COWAN, 1999; BURT, 2004). A técnica comumente utilizada para a identificação da atividade antimicrobiana das plantas e seus fitoconstituintes frente a bactérias é a diluição (SILVEIRA et al., 2009).

O método de diluição *in vitro* identifica potenciais atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico (SARTORI, 2005). O ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou Minimum Inhibitory Concentration (MIC) é obtido por meio da macro ou microdiluição de compostos que se baseia na preparação de sucessivas diluições do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos (PFALLER; BARRY, 1994; BAKER; TENOVER, 1996; DUARTE et al., 2005; CLSI, 2003; CLSI, 2019).

A CIM corresponde a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que evita o crescimento visível de um microrganismo (CLSI, 2019). As vantagens desse método é proporcionar um maior número de informações e poder ser aplicado a uma ampla variedade de isolados (KONEMAN et al., 2001).

Vale ressaltar que, o agente antimicrobiano requer algumas propriedades principalmente a toxicidade seletiva, quer dizer, o fármaco deve ser ativo ao microrganismo e não ao hospedeiro, dessa forma, as doses administradas devem gerar tolerância ao hospedeiro e ao mesmo tempo serem capazes de acometer o organismo alvo (JAWETZ; MELNICK; ADALBERG, 1998; BLACK, 2002). Além disso, os antimicrobianos devem atuar sobre as bactérias susceptíveis afetando seu crescimento e reprodução (FERREIRA, 2007).

As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência frente a antimicrobianos, que podem tanto intrínseca (natural) como extrínseca (adquirida). A resistência intrínseca é aquela que constitui as características naturais e fenotípicas do microrganismo, ou seja, faz parte da herança genética do microrganismo. Enquanto que a resistência extrínseca ocorre quando há o surgimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à

droga em questão. É conhecida como uma "nova" característica revelada pela espécie bacteriana, característica essa ausente nas células genitoras. Essa nova propriedade é proveniente de mudanças estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, produzida por alterações genéticas cromossômicas ou extra cromossômica (plasmídeos). Em vista disso, estudos que visam avaliar o potencial antimicrobiano de recursos naturais como novos agentes terapêuticos devem ser ampliados com a finalidade de propor novas alternativas de antibióticos que podem ser eficazes contra bactérias resistentes (COUTINHO et al., 2003/2004; TENFEN, 2019; REMPEL et al., 2019).

3.8.3 Antibiofilme

Uma das estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para sua sobrevivência em ambientes com condições adversas é a formação de biofilme (TRACHOO, 2003). Biofilme microbiano consiste em uma agregação de células bacterianas, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (LUCCHESI, 2006), podendo causar uma alteração fenotípica das células planctônicas (vida livre) para a forma sésil. Células que crescem em biofilme demonstram características distintas das células planctônicas, uma destas é o aumento da resistência a agentes antimicrobianos e biocidas (RAMOS; ALONSO, 2011; SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Essa resistência é, em parte, conferida à matriz polimérica, a qual possivelmente funciona como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, como os biocidas (PEREIRA, 2001). A elevada resistência de biofilmes bacterianos pode ser elucidada devido à, difusão limitada de agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, adaptação genética, níveis de atividade metabólica no interior do biofilme e outros fatores inter-relacionados (CAIXETA, 2008).

A formação do biofilme ocorre quando células planctônicas (células de vida livre) são ativadas por alterações na expressão gênica (sistema “quorum sensing”) e tornam-se geralmente capazes de se fixar a qualquer superfície. As bactérias aderidas proliferam-se e encapsulam as colônias com uma matriz de substância extracelular polimérica (EPS). Entre essas células, há a formação de canais que facilitam a difusão dos nutrientes na matriz. A proximidade dessas células contribui com a troca de sinais moleculares que regulam o comportamento, a estrutura e a dinâmica dessa comunidade sésil microbiana. Além disso,

existem gradientes químicos que produzem microambientes para diferentes espécies microbianas ou níveis de atividade. Vale destacar que, em determinadas condições, como falta de nutrientes ou uso de biocidas, ocorre a cisão de um agregado celular ou a migração de células planctônicas, a fim de colonizar outros ambientes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Uma vez que, o biofilme confere maior proteção aos microrganismos, à utilização de antimicrobianos se torna menos eficiente, gerando uma pressão seletiva que pode causar no desenvolvimento de resistência a esses fármacos (TENOVER, 2006).

Infecções resistentes a antibióticos aumentam o tempo de permanência hospitalar e o número de mortes quando comparadas com infecções susceptíveis a antibióticos. Dessa maneira, é de considerável importância tanto no âmbito sanitário quanto econômico a identificação de moléculas capazes de inibir a formação ou desagregar biofilmes já formados, visto que, reduz de forma expressiva o potencial de virulência dos microrganismos patogênicos (DONELLI et al., 2007; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

3.8.4 Atividade antiparasitária frente à *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, é o agente etiológico da doença de Chagas, considerado um dos patógenos infecciosos mais graves para seres humanos. Quanto à incidência a nível mundial, esta doença acometeu cerca de 10 milhões de pessoas, principalmente na América Latina, e aproximadamente 100 milhões de indivíduos apresentam risco de contraí-la. Atualmente, o único tratamento disponível para esta doença é através dos medicamentos nifurtimox e benznidazol (BZN), os quais possuem elevado potencial de toxicidade. Embora esses medicamentos sejam eficazes contra infecções agudas, sua eficácia na fase crônica da doença ainda permanece controversa e não há consenso sobre o alcance da cura parasitológica com esta intervenção terapêutica (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2019; KAWAGUCHI et al., 2019).

Nessa perspectiva, faz-se necessário o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes, com baixo custo e reduzido potencial de toxicidade para o tratamento da doença de Chagas. Um dos enfoques dos estudos em relação à doença de Chagas tem sido o desenvolvimento de medidas eficazes para seu controle (BONNEY, 2014). Uma dessas medidas é a busca por novos fármacos para o tratamento da doença, que tem evoluído significativamente nos últimos anos (BUCKNER; NAVABI, 2010).

Várias substâncias isoladas de plantas têm sido avaliadas como promissores agentes anti-*T. cruzi*, inclusive moléculas naturais de diversas classes, tais como, quinonas, flavonoides e terpenos. Neste sentido, as plantas têm se revelado como uma importante fonte de substâncias com atividade contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, e se apresentam como uma das alternativas viáveis na prevenção e tratamento da doença de Chagas (GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Embora a literatura possua uma ampla lista de estudos envolvendo moléculas naturais e sintéticas com potencial atividade tripanocida, a existência de um fármaco aprovado em todos os testes clínicos necessários para sua efetivação ainda não é uma realidade (SOEIRO et al., 2009). Uma das limitações para avaliar a de eficácia produtos naturais e seus constituintes é o fato destes compostos serem, geralmente, metabólitos secundários de baixo rendimento, o que dificulta o processo de isolamento e purificação (PINTO et al., 2002; BADKE, 2019).

4 ARTIGO 1**Artigo a ser submetido à revista: Food and Chemical Toxicology****(ISSN: 0278-6915)****Assessment of cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of nerolidol**

Danielle Feijó de Moura^{a,*}, Dayane de Melo Barros^b, Tamiris Alves Rocha^a, Marlllyn Marques da Silva^c, Maria Aparecida da Conceição de Lira^d, Talita Giselly dos Santos Souza^e, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^e, Cristiano Aparecido Chagas^e, Noemia Pereira da Silva Santos^c, Rafael Matos Ximenes^f, René Duarte Martins^h, Márcia Vanusa da Silva^{a,g}

a Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

b Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

c Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NANOBIOCEL), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

d Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular (SIM). Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

e Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

g Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brazil.

h Espaço Farmácia Viva, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

*Corresponding author. E-mail address: danielle.feijo@hotmail.com

Abstract

Nerolidol is a sesquiterpene of natural origin that is present in the essential oils of various medicinal plants from Northeastern Brazil and has been used in the cosmetic and food industries. Because nerolidol is commonly used in many products, research has been conducted to explore the medicinal properties of this phytoconstituent and further promote its potential benefits to human health. Therefore, the objective of this study was to evaluate nerolidol for its cytotoxicity profile, hemolytic activity, acute toxicity, mutagenicity, and genotoxicity. Therefore, cell viability was assayed using the MTT method. Hemolytic activity, acute oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity assays were also performed. Evaluation of cytotoxic effects showed that nerolidol was nontoxic to S-180 (cells as a malignant, heterogeneous strain of mouse tumor cells of mesodermal origin), J774A.1 (macrophages), and HEK (renal embryonic cells) cells at a concentration of 100 µg/mL. The hemolytic activity of nerolidol was confirmed at all concentrations analyzed (0.03, 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/mL). As for the acute toxicity test, no clinical signs of toxicity were found in animals treated with nerolidol at a dose of 2,000 mg/kg. Also, nerolidol was not considered mutagenic or genotoxic under the highest concentration tested (2,000 mg/kg). Therefore, it can be inferred that nerolidol is a promising compound for therapeutic applications since the results indicate there is a relative safety margin for its use.

Keywords: essential oils, food additive, safety tests, phytoconstituent, nerolidol.

1. Introduction

For thousands of years, medicinal plants have been used as a therapeutic resource. The use of these herbs persists to the present day mainly due to cultural factors (Santana et al., 2018). Plants represent an important source of bioactive compounds, being used by the world population *in natura* as well as in the production of herbal medicines (Horn and Vargas, 2008; Brazil, 2015).

Nevertheless, most individuals use the plants empirically, that is, without the legitimate assurance of therapeutic efficiency and potential adverse effects (Badke et al., 2016; de Jesus et al., 2019). Given this, the scientific community has intensified studies based on the characterization, safety testing, and biological activities of medicinal plants and their phytoconstituents.

Various naturally occurring compounds of plant origin have been investigated for their promising biological potential, including nerolidol, a major constituent of essential oils from various plants such as *Baccharis dracunculifolia* DC, *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel, *Piper clausenianum*, and *Melaleuca leucadendron* L. (Gelinski et al., 2007; Mattana et al., 2010; Marques et al., 2011; Padalia et al., 2015).

Considered the most abundant acyclic sesquiterpene in nature, nerolidol has several bioactive properties, including leishmanicidal and larvicidal activities, and acts as a potentiator for the permeation of transdermal, antiulcer, and anti-inflammatory drugs (Arruda et al., 2005 and Nogueira Neto et al., 2013).

It is noteworthy that at the regional level, nerolidol is a component of the essential oil of different medicinal plants from Northeastern Brazil, which is used in folk medicine, cosmetics, and in the food industry (Nogueira neto et al., 2012). Thus, nerolidol can promote important benefits for human health and the environment. Therefore, this study aimed to evaluate cytotoxicity, hemolytic activity, acute toxicity, mutagenicity, and genotoxicity to ensure the use of this phytoconstituent.

2 Materials and methods

2.1 Compound

Kosher commercial nerolidol (CAS n° 7212-44-4), consisting of *cis*- and *trans*-isomers with $\geq 97.0\%$ purity, with a molecular weight 222.372 g/mol and density 0.8700 g/mL, was purchased from Sigma-Aldrich® (Catalogue n° W277207, St. Louis, USA).

2.2 Cells and culture conditions

Renal embryonic (HEK-293), macrophages (J774.A1), and murine sarcoma 180 cells (S-180) were used. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

supplemented with fetal bovine serum (10%) and penicillin-streptomycin (1%) at 37 °C and 5% CO₂. The ascitic form of S-180 cells from mice peritoneum were harvested for the assays.

2.3 Cytotoxicity Assay

The MTT assay was used to determine the cell viability following nerolidol treatment (Mosmann, 1983). Cells were plated into 96-well plates at a density of 1×10^5 to 1×10^6 cells/mL and incubated for 24 h. Then, the cells were exposed to nerolidol (12.5, 25, 50, and 100 µg/mL) for up to 24 h and 48 h. Nerolidol was solubilized in PBS and DMSO (10%). After this period, 25 µl of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, and the plates were incubated for 3 h. Then, the supernatant was removed and 200 µL of DMSO was added. The absorbance at 630 nm was measured using a Elx808 microplate reader (Biotek[®], USA).

2.4 Hemolytic Activity

The nerolidol blood compatibility test was performed according to Rajendran et al. (2017). Shortly, 2 mL of mouse whole blood was added to 4 mL of PBS and centrifuged at 5000 rpm for 5 min to isolate red blood cells (RBCs). RBCs were washed twice with 10 mL PBS and resuspended with 20 mL PBS. From the final suspension, 0.4 mL was diluted in 1.6 mL of nerolidol at final concentrations of 19-1250 µg/mL. In the negative control group, RBC were resuspended in PBS, while in the positive control, 1% Triton[™] X-100 was used. The tubes were kept at 37° C for 1 h and centrifuged for 5 minutes at 12,000 rpm at 20° C. The absorbance was measured at 540 nm. The hemolytic activity (%) was expressed using the formula: $(\text{Abs test} - \text{Abs negative})/(\text{Abs positive} - \text{Abs negative}) \times 100$.

2.5 Animals

Male Swiss albino (Swiss albino) mice, approximately eight weeks old, weighing between 30 and 50 g, from the Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) were used. During the experiment, the animals were acclimatized in polypropylene boxes under appropriate conditions (five mice per box) in an air-conditioned room with a temperature of $22^\circ \pm 2^\circ$, relative humidity of $50 \pm 5\%$, and a 12-hour light/dark cycle. The animals received drinking water and food *ad libitum*. All

experimental procedures were performed in accordance with national animal experimentation legislation and approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (process N°. 0001/2018).

2.6 Acute Toxicity

The acute oral toxicity of nerolidol was assessed according to OECD Guideline 423 (OECD 2001). Three animals per group were used. One group was orally administered 2,000 mg/kg of nerolidol diluted in PBS and 10% DMSO, while the other group received the dilution vehicle (PBS and 10% DMSO). The animals were fasted with water and food for 3 h prior to the administration of the treatments. Soon after the administration of the treatments, food access was suspended for another 1h. Animals were observed during the first hour after treatment administration and every 24h for 14 consecutive days. During this period, the parameters of food intake, water intake, and animal weight were evaluated. Subsequently, the animals were anesthetized, and blood was collected by cardiac puncture. The blood was transferred to two types of tubes, one with anticoagulant to determine hematological parameters, and the other without anticoagulant to obtain serum for the evaluation of biochemical parameters. Next, the animals were euthanized, and the organs were harvested, weighted, and processed for histopathological analysis.

2.6.1 Histopathological Analysis

The livers, kidneys, and spleens of the mice were cutted into small fragments and fixed in buffered formaldehyde (10% v/v) for 48h. The fragments were dehydrated in ethanol in increasing concentrations, diaphanized in xylene, and impregnated and embedded in paraffin. The blocks were cut into 4 μ m slides, which were kept at 60°C for 24h and stained with hematoxylin-eosin (HE). The photomicrographs were captured using a digital camera (Moticam 3000) coupled to the optical microscope (Nikon E-200), under fixed focus and field clarity, capturing 20 fields per slide at 100X magnification for spleen, and 400X for liver and kidneys. The photomicrographs were analyzed using ImageJ software version 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7 Genotoxicity and mutagenicity

The mice were subdivided into three groups (n=5). The test group received a 2,000 mg/kg dose of nerolidol. The negative control group was administered the vehicle solution (10% DMSO and PBS) by gavage, and the positive control group received the mutagenic cyclophosphamide agent (25 mg/kg) intraperitoneally (Oliveira et al., 2016). The animals were anesthetized, and peripheral blood samples from each animal were collected 48 h after treatment for the micronucleus test and the comet assay (Collins et al., 2008). The experiments were performed in duplicate. Soon after blood collection, the animals were euthanized by cervical dislocation following the parameters of the Animal Use Ethics Committee, Federal University of Pernambuco (CEUA/UFPE).

2.7.1 Micronucleus Test (MNT)

The micronucleus test was performed according to the protocol of Hayashi et al. (1994), in which 5 μ L of blood was dispensed into the center of a glass slide prepared with acridine orange. Four slides were prepared from each animal. With the aid of the Zeiss-imager M2 fluorescence microscope and Alexa-fluor-488 nm filter, 2000 polychromatic erythrocytes were analyzed for the presence of micronuclei (OECD, 2016).

2.7.2 Comet Test

The comet assay was performed, according to Rocha et al. (2019). A 15 μ L blood sample collected from each animal was homogenized with 100 μ L Eppendorf low-melting agarose. Subsequently, the mixture was added to a slide previously coated with standard agarose. Subsequently, the slides were immersed in a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) for 1 h. After lysis, slides were incubated for 20 min in buffer solution (1 M NaOH and 200 mM EDTA, pH 13) and electrophoresed for 20 min. Thereafter, the slides were neutralized (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min and dehydrated in absolute alcohol for 5 min. Ethidium bromide (20 μ L in 950 μ L distilled water) was used for staining, and analyses were performed under a Zeiss-imager M2 fluorescence microscope with the Alexa fluor-546 nm filter. Two slides were prepared for each animal, and 100 nucleoids (per animal) were analyzed to simultaneously observe the relationship between tail length and comet head size (Collins et al., 2008; Coelho et al., 2018).

The analyzed nucleoids were visually classified into one of the following classes: 0 (undamaged), 1 (with little apparent damage), 2 (average damage), 3 (medium damage with a longer tail), and 4 (maximum damage). Thus, the values obtained for each individual ranged from 0 (no damage: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) and were considered to define the damage index (DI) for each animal. The damage frequency (DF) was also calculated as the percentage of all nuclei with some damage (class 1 to class 4) in relation to the total number of quantified nuclei from class 0 to class 4 (total number) (Collins et al., 2008).

2.8 Statistical Analysis

The results of the cytotoxic analysis are presented as mean \pm SD ($p < 0.05$) and subjected to ANOVA followed by the Bonferroni test. For the histomorphometric analysis, the normality test was performed using the Smirnov-Kolmogorov program, and the non-normal distribution of the data was verified. Based on this, a nonparametric test (Mann-Whitney U) was used. In addition, SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences) was used, and data were expressed as the mean \pm SD, $P < 0.05$, comparing them with the control. Regarding genotoxic analysis, the Kruskal-Wallis test was used, which was calculated using the software -R. In both tests, $p < 0.05$ were considered statistically significant. The other results were expressed as the mean \pm SD, $p < 0.05$, and analyzed by ANOVA follow by Dunnett's test, using GraphPad Prisma 5.0 software.

3. Results and Discussion

3.1 Cytotoxicity Assays

The evaluation of cytotoxic effects showed that nerolidol was nontoxic to S-180 cells (Sarcoma-180), with cell viability averaging $58.06\% \pm 6.28\%$ at 100 $\mu\text{g/mL}$, both within 24 h. For the other concentrations and time intervals, cell viability averaged above 70% (Figure 1).

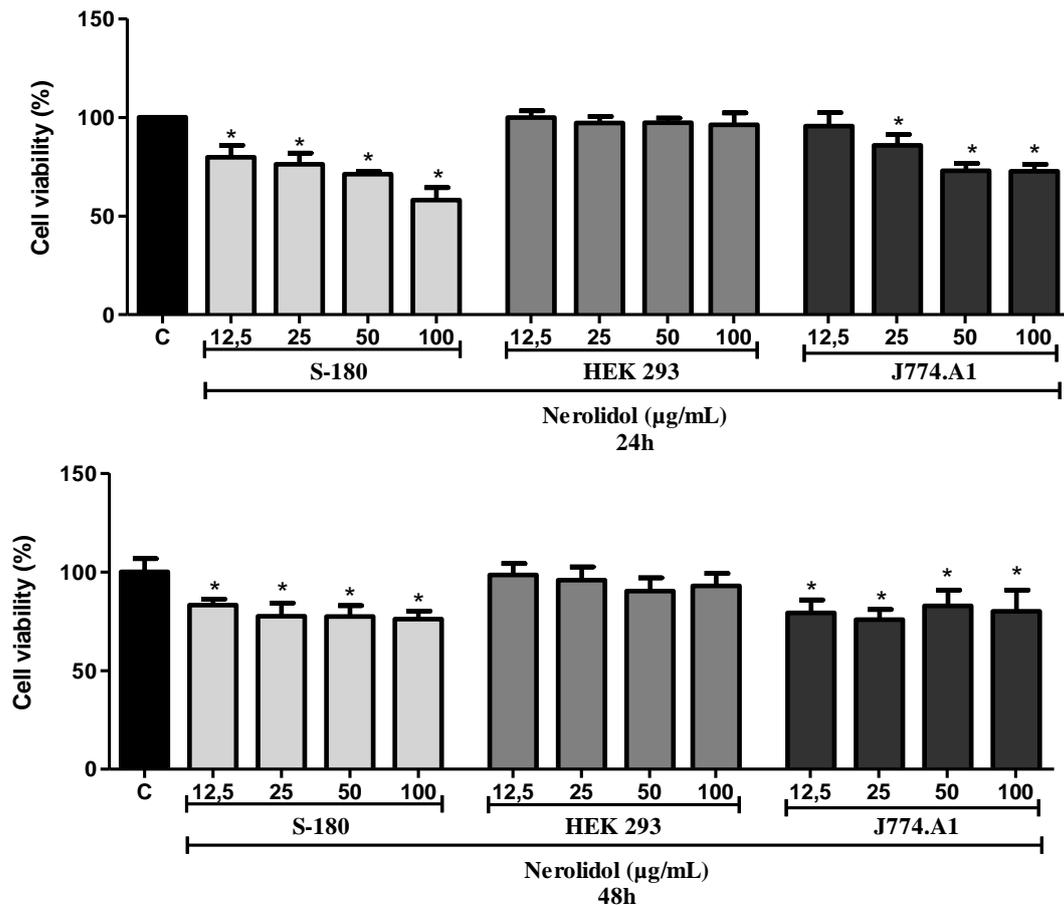


Figure 1. Cell viability of nerolidol in S-180, HEK 293 and J774.A1, within 24 h and 48 h. Statistical differences from control values were determined by ANOVA, followed by the Bonferroni test. * $p > 0.05$ vs. Control. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments.

Tatman and Mo (2002) reported that *cis*-nerolidol suppressed cell proliferation in two cell models, B16F10 (a melanoma cell line) and HL-60 (acute promyelocytic leukemia cells), with IC₅₀ values of less than 14.45 $\mu\text{g/mL}$.

Another study revealed that nerolidol at the lowest concentration tested (2.22 $\mu\text{g/mL}$) significantly reduced the cellular viability of HepG2 (human hepatocarcinoma). Also, it was observed that nerolidol reduced mitochondrial membrane potential and phosphorylation activity through ATPase inhibition. Both are essential for cell cycle progression, which, if inhibited by nerolidol, reduces cell proliferation (Ferreira et al., 2012).

Vinholes et al. (2014), when assessing the cytotoxicity of *cis*-nerolidol at 222.37 $\mu\text{g/mL}$ against lineage, Caco-2 (heterogeneous human colorectal epithelial adenocarcinoma cells), verified via the cell MTT assay at different time intervals, 0.5, 6, 24, and 48 h that *cis*-

nerolidol did not influence cell viability up to the 24 h interval. However, after 48 h of exposure (chronic effect) generated a considerable decrease in cell viability.

However, for HEK cells, nerolidol showed cell viability above 90% at the concentrations used (12.5, 25, 50, and 100 µg/mL) when treated for 24 or 48 h. In the cell viability assay of the J774A.1 strain, the data obtained showed cell viability above 70% at all concentrations over the 24 h and 48 h time intervals (Figure1).

In assessing the cytotoxicity profile of nerolidol in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures, Baldissera et al. (2016) found that this terpene did not exert a toxic effect on treated cells after 24, 48, or 72 h post-incubation in concentrations of 0.5, 1.0, and 2.0%.

Alonso et al. (2019), when evaluating the cell viability of nerolidol based on the MTT test, showed that the 125 µM compound reduced cell viability (by 50%) of J774.A1 strains.

3.2 Hemolytic activity

The results showed that nerolidol is hemolytic at all concentrations analyzed (Figure 2), with 7.56% hemolysis at the lowest concentration (0.01 mg/mL), and a hemolytic grade above 40% at the other concentrations (19, 39, 78, 156, 312, 625, 1250 µg/mL). According to the American Society for Testing and Materials (ASTM), a drug or substance is hemolytic when the degree of hemolysis is >5%. ASTM also states that the interaction of hemolytic material with blood can lead to loss of or damage to RBCs and increase plasma free hemoglobin levels, both of which can trigger further toxic effects to eventually generate stress in kidneys or other organs. The destruction of RBCs *in vivo* can trigger anemia, jaundice, and other pathological conditions. Therefore, the hemolytic potential of all drugs administered requires evaluation (Dobrovolskaia et al., 2008).

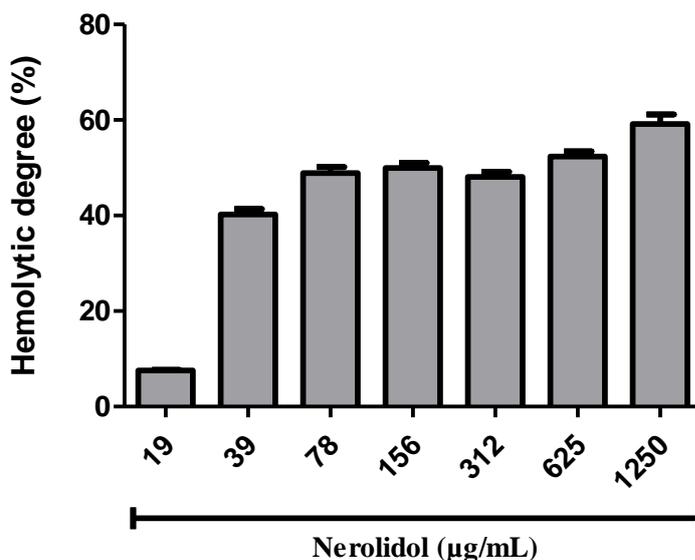


Figure 2. The hemolytic degree of nerolidol. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments.

Corroborating the present study, Mendanha et al. (2013) reported that nerolidol caused 50% hemolysis at low concentrations (511.45 $\mu\text{g/mL}$) and induced an increase in erythrocyte membrane fluidity by 2.5×10^9 molecules/cell. Alonso et al. (2019) also showed that nerolidol at 533.69 $\mu\text{g/mL}$ caused 50% hemolysis. Thus, we can infer the hemolytic effect of nerolidol on erythrocytes.

3.3 Acute Toxicity and Histomorphometric Analysis

Evaluation of oral toxicity in mice exposed to nerolidol makes it possible to investigate the systemic toxicity of the tested compound. Acute toxicity testing revealed no clinical signs of toxicity in animals treated at the 2,000 mg/kg dose of nerolidol, and no death was reported. There were no significant differences in the water or food intake between the control and treated groups, and there were no significant increases or reductions in weights $p < 0.05$ (Table 1) of treated animals (Bonomini et al., 2017).

Table 1. Mean values obtained in water consumption, feed intake, and weight gain, evaluated for 14 days in male mouse control groups and mice treated with nerolidol.

Parameters	Control (DMSO 10%+PBS)	Nerolidol (2000 mg/Kg)
Food consumed (g)	21.78 ±4.63	22.98± 4.56
Water consumed (mL)	33.93±3.84	35.93± 4.32
Δ Weight (g)	1.77±1.25	1.70± 1.20

Results are expressed as the mean ± SD (three animals per group). Statistical differences were determined by ANOVA with post hoc Tukey test. There were no statistical differences ($p > 0.05$).

Biochemical and hematological studies were performed to analyze the influence of treatment on the induction of toxicity in blood cells. Some of the biochemical parameters evaluated demonstrated statistically significant differences between the 2,000 mg/kg body weight-treated groups and the control group (Table 2).

The data obtained showed a decrease in AST (TGO) levels and an increase in ALT (TGP) in the treated group. These findings may be associated with possible liver damage caused by nerolidol when administered in high concentrations in the body.

In some situations, some compounds may cause liver or kidney damage. In these cases, the analysis of biochemical parameters makes it possible to determine the injury as well as its severity. The enzyme aspartate aminotransferase, AST (TGO) is found in high concentrations in the cytoplasm and mitochondria of the liver, skeletal and cardiac muscles, kidneys, pancreas, and erythrocytes (RBCs). When one of these tissues is damaged, AST is released into the blood. Alanine aminotransferase (ALT; also termed TGP), is found in high concentrations only in the liver cytoplasm, and high levels of this enzyme may indicate liver damage (Bertolami, 2005; Barbosa et al., 2010).

Furthermore, according to these findings, decreased glycemia was observed in the nerolidol-treated mice. This decrease may indicate a possible hypoglycemic effect of nerolidol. Although poorly elucidated, it is suggested that the mechanism of action of terpenoids involves the stimulation of β -pancreatic cells with subsequent insulin secretion (Ojewole, 2002).

Table 2. Blood biochemical parameters of mice orally administered nerolidol for 14 days.

Parameters	Control (DMSO 10%+PBS)	Nerolidol (2000 mg/Kg)
glucose (mg/dL)	116.27±5.90	86.63±10.74*
ALT-TGP U/L	47.62±6.75	67.96±5.27*
AST-TGO U/L	98.35±1.47	78.13±4.26*
total protein (g/dL)	4.73±0.30	4.97±0.47
albumin (g/L)	3.07±0.21	3.10±0.12
cholesterol (g/dL)	123.26±13.10	131.35±2.06
triglycerides (mg/dL)	135.14±4.13	148.08±3.39
uric acid (mg/dL)	5.67±0.32	5.09±0.35

* Significantly different from control (p <0.05).

The analysis of hematological parameters showed significant changes in the number of platelets and lymphocytes (Table 3). Although the hematological analysis showed significant alterations, such results showed no physiological changes, since there was no impairment of the general health of the animals, thus indicating low toxicity for the compound.

Table 3. Blood hematological parameters of mice treated orally with nerolidol for 14 days.

Parameters	Control (DMSO 10%+PBS)	Nerolidol (2000 mg/Kg)
erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	7.56 ±0.69	6.43±0.98
hematocrit (HCT) (%)	40.44 ±1.28	37.83±1.98
hemoglobin (g/dL ⁻¹)	10.53 ±0.14	12.86±1.01
MCV (fL)	53.33 ±3.21	65.15±5.22*
MCH (pg)	13.33 ± 1.17	19.43±2.50
MCHC (g/dL)	25.26 ± 0.62	32.76±4.22
leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	2.04 ±0.38	3.25±0.81
lymphocytes (%)	75.77 ±5.42	91.93±3.75*
platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	727.93 ±6.81	885.30±6.09*
RDW	27.15±3.54	31.73±5.49

MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW: red cells distribution width. Data are expressed as the mean ± standard deviation. Statistically significant differences by t-test *p <0.05 of the control.

The macroscopic analysis did not show significant changes in vital organs, since no signs of ischemia, bleeding, fibrosis or degenerative proliferation were detected in the treated mice. Regarding organ weight, a significant increase in stomach weight was observed compared with the control group. In addition, nerolidol also induced a change in the relative size of the right kidney (Table 4).

Table 4. Relative organ mass after euthanasia of nerolidol-treated mice

Parameters	Control (DMSO 10%+PBS)	Nerolidol (2000 mg/Kg)
Lungs (g)	0.124±0.07	0.116±0.05
Heart (g)	0.205±0.01	0.199±0.01
Stomach (g)	0.303±0.05	0.392±0.06
Liver (g)	2.198±0.20	2.025±0.16
Spleen (g)	0.150±0.01	0.154±0.01
Kidneys (g)	0.295±0.01	0.263±0.01

Data are expressed as the mean ± SD. (n = three animals in each group). Statistically significant differences are indicated by t-tests *p <0.05 vs. control.

The liver, kidney, and spleen histomorphometric analyses (Figure 3) of mice exposed to nerolidol were evaluated. The data obtained (Table 5) demonstrated a significant increase in the total number of hepatocytes and Kupffer cells in nerolidol-treated animals compared with the control group. This abnormal liver cell proliferation is possibly due to liver tissue regeneration to overcome adverse conditions (De Jesus, Waitzberg and Campos, 2000; Fausto et al., 2006).

The liver is considered an organ that has high sensitivity to lesions by xenobiotics or any substance that is not produced by the body, because it performs several vital functions, including the biotransformation of toxic substances to minimize possible damage to the body (Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008; Perandin et al., 2015). According to De Aguiar Wiederkehr (2017), Increased Kupffer cell numbers may indicate inflammatory processes and tissue damage, as these cells play an essential role in phagocytosis of foreign particles and act to maintain liver function under physiological and pathological conditions.

Regarding the corpuscular and glomerular area of the kidneys of mice exposed to nerolidol, no morphological alterations in the evaluated organs were observed, although the kidney is sensitive to toxicity caused by foreign substances (Moraes and Colicigno, 2007).

No changes in the area of the red and white pulp of the splenic tissue were identified. However, there was a decrease in stroma. The spleen is considered a secondary lymphoid organ that acts both on the interaction between cells composed of antigens and T and B lymphocytes, and on the elimination of antigens from lymphatic vessels and the blood. Besides causing changes in some organs, several chemicals, when misused, can also influence the immune system, so it is of fundamental importance to evaluate their effects not only in detoxifying but also on the immune system (Torres et al. 2000; Christopher 2003; Aguiar et al. 2008).

Table 5. Histomorphometric analysis of the livers, kidneys, and spleens of mice exposed to nerolidol.

Groups	Liver (N° of cells/ μm^2)		Kidney (areas/ μm^2)		Spleen (areas/%)		
	Hepatocyte (%)	Kupffer cell (%)	Corpuscle (μm^2)	Glomerulus (μm^2)	Stroma (%)	Red pulp (%)	White pulp (%)
Control	26.32±6.37	21.58±8.70	3137.6±900.2	2711.7±1076.9	3.19±2.41	56.83±9.45	39.98±9.3
Nerolidol	32.05±8.28*	27.15±8.96*	3359.2±1236.1	2534.9±884.2	2.27±1.76*	53.96±12.49	43.76±12.9

Statistically significant differences by the Mann-Whitney test at 5%; $p < 0.05$ compared to the negative control.

Data are expressed as the mean \pm SD of $n =$ three animals per group.

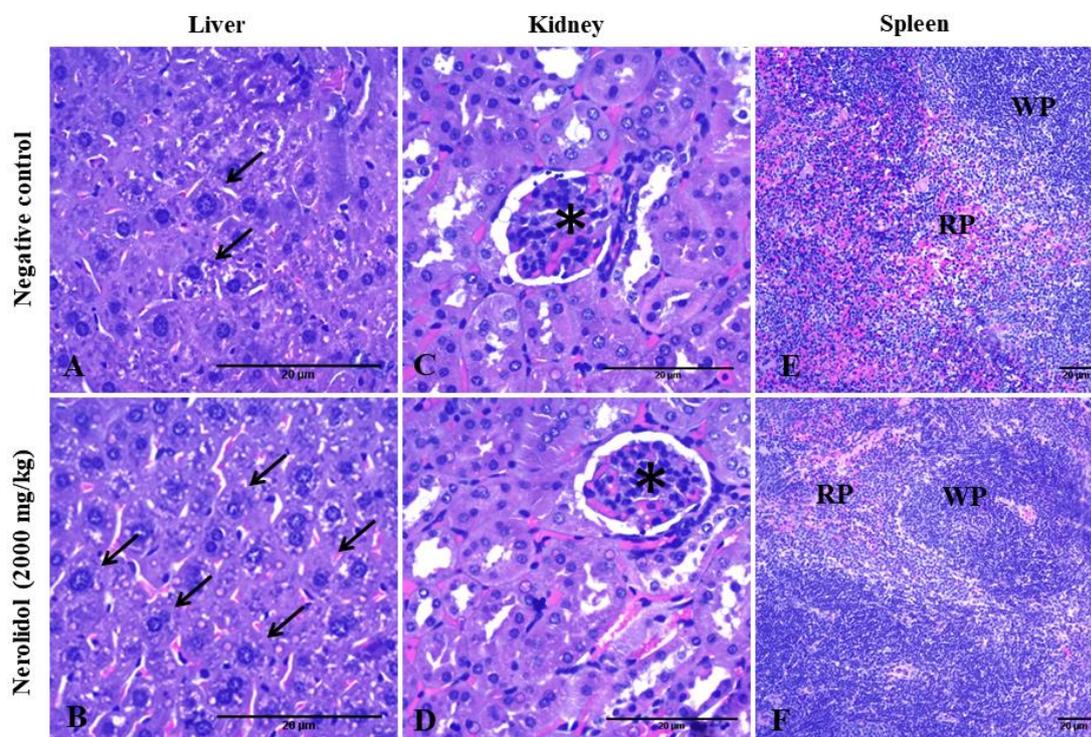


Figure 3. Photomicrographs of different tissues submitted to acute toxicity studies. A (control) and B (treated) – Note an increase in the number of hepatocytes in the liver of animals treated with nerolidol; Hepatocyte (arrow). C (Control) and D (Treated) – have no visible changes compared with the control group. Glomerulus (asterisk). E (Control) and F (Treated) – have no visible changes compared with the control group, RP (Red Pulp), WP (white pulp). Hematoxylin and eosin staining was used for the visualization of images. The spleen images were taken under 10X and the others with 400X magnification.

In assessing the acute toxicity of nerolidol, Nogueira Neto et al. (2012) utilized concentrations from 1,000 to 5,000 mg/kg of the compound and reported that the hematological and biochemical analyses showed no significant changes. Nerolidol did not significantly change the body masses of treated animals, nor produced changes in water

consumption, or feeding and excreta production. In addition, there were no macroscopic morphological changes in the major organs (liver, spleen, and kidneys). Therefore, these findings suggest that nerolidol has a high LD50 value and is moderately toxic, corroborating the findings of the present study. Notably, despite the impossibility of calculating the single dose responsible for causing death in 50% of nerolidol-treated animals (LD50) (since it is above 2,000 mg/kg), it cannot be said that nerolidol exhibits no toxicity, as any chemical can be toxic if the dose or exposure becomes high enough to cause harm (Vasconcelos et al., 2007; Campos et al., 2016).

Saito et al. (2016) stated that nerolidol did not cause changes in animal weight, nor did it influence serum ALT, AST, or creatinine levels after oral or inhalation treatment with nerolidol, indicating that nerolidol is not toxic. It is noteworthy that the level of toxicity of nerolidol depends on the route in which it is administered. According to the Environmental Protection Agency (EPA), this compound is classified as follows: toxicity category IV for acute oral toxicity; toxicity category III, acute dermal toxicity, primary eye irritation, primary skin irritation, and toxicity category II for acute inhalation toxicity (Hollis and Jones, 2009).

3.4 Micronucleus Test (MNT)

The evaluation of mutagenic activity (Table 6) of nerolidol showed no statistical differences between the negative control group and the treated group, revealing an absence of compound mutagenicity in the micronucleus test.

Table 6. Evaluation of nerolidol mutagenicity.

Groups	Tests		
	MN Mean±SD	DI Mean±SD	DF Mean±SD
Control	0.8± 0.84	5.0± 2.12	4.8± 2.39
Cyclophosphamide	25.4± 12.32*	150.0± 46.52*	71.0± 12.37*
Nerolidol	1.6± 1.67	8.2± 3.27	5.2± 1.64

SD: Standard Deviation; MN: micronucleus; DI: Damage Index by comet assay; DF: Damage factor by comet assay; * Significant difference compared with the negative control, by the Mann-Whitney test.

3.4 Comet Test

The genotoxicity test (Table 6) revealed no significant difference between the negative control group and the nerolidol-treated group, indicating an absence of nerolidol genotoxicity in the comet assay. The comet assay is an indispensable instrument for the analysis of DNA damage with high sensitivity. It is used in a broad spectrum of cells as a standard test for the evaluation of the safety of new drugs (Tice et al., 2000; Piperakis, 2009).

Piccolo et al. (2010), after evaluating the genotoxicity and mutagenicity of nerolidol (at 250, 500 and 2,000 mg/kg) in the comet assay and the micronucleus test, observed that nerolidol caused clastogenicity and weak genotoxicity in mouse cells when administered in high doses, and it is developed as a therapeutic agent or a flavoring agent for food. It is relevant to emphasize that for the development of unknown products and chemicals, it is necessary to determine their potential mutagenic effects. A balance between the therapeutic aspects and toxicological effects of a compound is essential in the process of defining its applicability as a pharmacological agent.

Sperotto et al. (2013) evaluated the mutagenic effect of nerolidol (a racemic mixture of *cis* and *trans* isomers) at 100 µg/mL and found that it did not induce mutagenicity. While Saito et al. (2016) performed an *in vitro* comet assay of nerolidol and identified the genotoxicity of the same compound but at a high concentration (2.89 mg/mL).

4. Conclusions

Nerolidol (a racemic mixture of *cis*- and *trans*- isomers) induced slight unspecific cytotoxic effects in different cell lines and was hemolytic to mice red blood cells. After a single oral dose, nerolidol showed low toxicity and mild hepatic changes, and was not considered genotoxic nor mutagenic. Under this experimental conditions, nerolidol is orally safe in lower doses.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the higher Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support.

References

Aguiar, G.L.M., Barreto, J.H.P.M., Morais, L.R., Da Silva Filho, A.R., 2008. Anatomic Study of the Splenic Artery Segmentation. Rev. Col. Bras. Cir. 35, 311- 314. DOI: 10.1590/S0100-69912008000500007.

- Alonso, L., Fernandes, KS, Mendanha, SA, Gonçalves, PJ, Gomes, RS, Dorta, ML, Alonso, A, 2019. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1861, 1049-1056. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.03.006
- Arruda, D. C., D'alexandri, F. L., Katzin, A. M. D.; Uliana, S. R, 2005. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother*. 49, 1679-1687. DOI: 10.1128 / AAC.49.5.1679-1687.2005.
- Badke, M.R., Somavilla, C.A., Heisler, E.V., De Andrade, A., Budó, M.L.D.; Garlet, T.M.B, 2016. Saber popular: uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde. *Revista de Enfermagem da UFSM*. 6, 225- 234. DOI: 10.5902/2179769217945
- Baldissera, M.D., Grando, T.H., Souza, C.F., Cossetin, L.F., Sagrillo, M.R., Nascimento, K., da Silva, A.P., Dalla Lana, D.F., Da Silva, A.S., Stefani, L.M., Monteiro, S.G., 2016. Nerolidol nanospheres increases its trypanocidal efficacy against *Trypanosoma evansi*: New approach against diminazene aceturate resistance and toxicity. *Parasitologia experimental*. 166, 144-149. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.04.015.
- Barbosa, F.C.P., Ferreira, F. G., Ribeiro, M. A., Szutan, L. A., 2010. Cuidados pré-operatórios em hepatopatas. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 56, 222-226. DOI: 10.1590/S0104-42302010000200023.
- Bertolami, M. C., 2005. Mechanisms of hepatotoxicity. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 85, 25-27. DOI: 10.1590/S0066-782X2005002400007.
- Bonomini, T. J., Holzmann, I., Thiesen, L. C., Fratoni, E., Muller, A. F. F., Lucinda-Silva, R. M., Yunes, R. A., Malheiros, A.m., Gonçalves, A., Dalmagro, A.P., Silva, K. A. B. S., Souza, M. M. J. R. S., 2017. Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. *Regul Toxicol and Pharmacol*. 91, 9–19. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.10.005.
- Brasil. Ministério da Saúde., 2015. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS, atitude de ampliação de acesso. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde. 96.
- Campos, S. C., Silva, C. G., Campana, P. R. V., Almeida, V. L., 2016. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 18, 373-382. DOI: 10.1590/1983-084X/15_057.
- Christopher, M.M., 2003. Cytology of the Spleen. *Vet. Clin. Small Anim. Pract*. 33, 135-152. DOI: 10.1016/S0195-5616(02)00082-7.

- Coelho, I. D. D. S., C. J. C. L. Neto, T. G. S. Souza, M. A. Silva, C. A. Chagas, and K. R. P. Santos, 2018. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 18, 52–60. DOI:10.1016/j.mrgentox.2018.06.018.
- Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, and R. Štětina, 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagen.* 23, 143–51. DOI:10.1093/mutage/gem051.
- De Aguiar Wiederkehr, H., Wiederkehr, J. C., Collaço, L. M., de Sousa, E. L., Salvalaggio, P., de Carvalho, C. A., Wiederkehr, B. A., Marques, C.A. M., Rosa, F. F., Nanni, F. N., Fuchs, T., 2017. Efeito da transecção do parênquima hepático associada ou não à ligadura contralateral da veia porta na regeneração hepática. *Einstein.* 5, 178-85. DOI: 10.1590/S1679-45082017AO3831.
- De Jesus, J. F. V., de Medeiros, M. B., Pereira, J. A., da Costa, N. S., de Lucena, C. É. A., 2019. Plantas medicinais: Uma experiência no assentamento São Francisco III-Solânea–PB. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental.* 13, 01-09.
- De Jesus, R. P., Waitzberg, D. L., Campos, F. G., 2000. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 46, 242-254. DOI: 10.1590/S0104-42302000000300010.
- Dobrovolskaia, M. A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., McNeil, S. E., 2008. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano letters.* 8, 2180-2187. DOI: 10.1021 / nl0805615.
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006. Regeneração hepática. *Hepatology.* 43, 45-53. DOI: 10.1002/hep.20969.
- Ferreira, F.M., Palmeira, C.M., Oliveira, M.M., Santos, D., Simões, A.M., Rocha, S.M., Coimbra, M.A., Peixoto, F., 2012. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro.* 26, 189-196. DOI: 10.1016 / j.tiv.2011.11.009.
- Gelinski, J. M. L. N., Dalla Rosa, J. C., Paravisi, E. D. F. A., Baratto, C. M., 2007. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. *Evidência-Ciência e Biotecnologia.* 7, 131-144.

- Guillouzo, A.; Guguen-Guillouzo, C., 2008. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 4, 1279-1294. DOI: 10.1517/17425255.4.10.1279.
- Hayashi, M., R. R., Tice, J. T., MacGregor, D., Anderson, D. H., Blakey, M., Kirsh-Volders, F. B., Oleson, F., Pacchierotti, F., Romagna, H. Shimada., 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res. Environ. Mutagen. Relat. Subj.* 312, 293-304. DOI:10.1016/0165-1161(94)90039-6.
- Hollis, J., 2009. Biopesticides registration action document, Farnesol and Nerolidol.
- Horn, R.C., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the Salmonella/microsome assay. *Toxicology In Vitro*. 22, 1043-1049. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.12.014.
- Marukami, T., Kishi, A., & Yoshikawa, M., 2001. Medicinal flowers. IV. Marigold.(2): Structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 49, 974-978. DOI: 10.1248/cpb.49.974.
- Mendanha, S. A., Marquezin, C. A., Ito, A. S., Alonso, A., 2017. Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study. *International journal of pharmaceutics*, 532, 547-554. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.046.
- Moraes, C. A., COLICIGNO, P. R. C., 2007. Estudo morfofuncional do sistema renal. *Anuário da Produção Acadêmica Docente*. 1, 161-167.
- Marques, A.M., Barreto, A.L.S., Curvelo, J.A.R., Romanos, M.T.V., Soares, R.M.A., Kaplan, M.A.C., 2011. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper claussonianum*. *Rev Bras Farmacogn*. 5, 908-14. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000157.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mattana, R. S., Vieira, M. A. R., Marchese, J. A., Ming, L. C., Marques, M. O. M., 2010. Shade level effects on yield and chemical composition of the leaf essential oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel. *Scientia Agricola*. 67, 414-418. DOI: 10.1590/S0103-90162010000400006.

- Nogueira Neto, J.D., Almeida, A.A.C., Silva, O.A., Carvalho, R.B.F., Sousa, D.P., Freitas, R.M., 2012. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. *Biofar – Revista de Biologia e Farmácia*. 8, 42-56.
- Nogueira Neto, J.D., Almeida, A. A. C., Oliveira, J. S., Santos, P.S., Sousa, D.P., Freitas, R.M., 2013. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochemical Research*. 38, 1861-1870. DOI: 10.1007/s11064-013-1092-2.
- Ojewole, J. A. O., 2002. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (willd) Hook methanolic root extract in rats. *J. Ethnopharmacol*. 81, 231-237. DOI: 10.1016 / s0378-8741 (02) 00085-5.
- Oliveira, A. M., Nascimento, M. F., Ferreira, M. R. A., Moura, D. F., Santos Souza, T. G., Silva, G. C., Ramos, E. H. S., Paiva, P.M.G., Medeiros, P.L., Silva, T.G., Soares, L.A.L., Chagas, C.A., Souza, I.A., Napoleão, T.H., 2016. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. *J Ethnopharmacol*. 194, 162- 168. DOI: 10.1016/j.jep.2016.09.004.
- Organisation for economic cooperation and development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423., 2001. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Organisation for economic cooperation and development (OECD)., 2016. Test no. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 4. Paris: OECD Publishing.
- Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A., Chanotiya, C. S., 2015. The essential oil composition of *Melaleuca leucadendra* L. grown in India: A novel source of (E)-nerolidol. *Industrial Crops and Products*. 69, 224-227. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.019.
- Perandin, D., Maioli, M., Santos, P., Pereira, F., Mingatto, F., 2015. Proteção do dano oxidativo hepático induzido por ferro pelo extrato aquoso da plantas *Plectranthus barbatus*. *Rev. Bras. Pl. Med*. 17, 9-17. DOI: 10.1590/1983-084X/12_019.
- Pículo, F., Guiraldeli Macedo, C., de Andrade, S. F., Luis Maistro, E., 2011. In vivo genotoxicity assessment of nerolidol. *Journal of Applied Toxicology*. 31, 633-639. DOI: 10.1002 / jat.1607.

Piperakis, S.M., 2009. Comet assay: a brief history. *Cell Biology and Toxicology*. 25, 1-3. DOI: 10.1007 / s10565-008-9081-y.

Rajendran, K., Sen, S., Suja, G., Senthil, S. L., Kumar, T. V., 2017. Evaluation of cytotoxicity of hematite nanoparticles in bacteria and human cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 157, 101-109. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.052.

HA, Cocco MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Rev Esc Enferm USP* 2002; 36(3): 282-8. DOI: 10.1590/S0080-62342002000300011

Rocha, T. A., Moura, D. F. D., Silva, M. M. D., dos Santos Souza, T. G., Lira, M. A. D. C. D., Barros, D. D. M., Silva A. G., Ximenes, R. M., Falcão, E. P.S., Chagas, C. A., Aguiar Júnior, F. C. A., Santos, N. P. S., Silva, M. V., Correia, M. T.S., 2019. Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. *J Toxicol Environ Health. Part A*. 82, 1–16. DOI: 10.1080/15287394.2019.1576563.

Saito, A. Y., Rodriguez, A. A. M., Vega, D. S. M., Sussmann, R. A., Kimura, E. A., Katzin, A. M., 2016. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. *International journal of antimicrobial agents*. 48, 641-646. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.017.

Santana, M. D. O., de Sá, J. S., Neves, A. F., Figueredo, P. G. J., Viana, J. A., 2018. O poder das plantas medicinais: uma análise histórica e contemporânea sobre a fitoterapia na visão de idosas. *Multidebates*. 2, 10-27.

Santos, N. P., Nascimento, S. C., Silva, J. F., Pereira, E.C.G., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães., N.S., 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of drug delivery science and technology*. 15, 355-361. DOI: 10.1016/S1773-2247(05)50065-0.

Sperotto, A.R.M., Moura, D.J., Péres, V.F., Damasceno, F.C., Caramão, E.B., Henriques, J.A.P., Saffi, J., 2013. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem Toxicol*. 57, 57-68. DOI: 10.1016 / j.fct.2013.03.013.

Tatman, D., Mo, H., 2002. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters*. 175, 129-139. DOI: 10.1016 / s0304-3835 (01) 00723-6.

- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Molec Mut.* 35, 206-221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:33.0.CO;2-J.
- Torres, O.J.M., Macedo, E.L., Picciani, E.R.G., Nunes, P.M.S., Costa, J.V.G., Carvalho, A.B., Lobato Júnior, P.S., 2000. Estudo Histológico da Regeneração Esplênica de Ratos Submetidos a Esplenectomia Subtotal. *Acta Cir. Bras.* 15, 1-12. DOI: 10.1590/S0102-86502000000200006.
- Vasconcelos, T. H. C. D., Modesto-Filho, J., Diniz, M. F. F. M., Santos, H. B., Aguiar, F. B. D., Moreira, P. V. L., 2007. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 17, 583-91. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000400018.
- Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., 2014. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food Chem.* 156, 204-211. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2014.01.106.

5 ARTIGO 2**Artigo a ser submetido na revista: Applied Microbiology and Biotechnology****(ISSN: 1432-0614)****Evaluation of antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activity of the sesquiterpene nerolidol**

Danielle Feijó de Moura^{a*}, Tamiris Alves Rocha^a, Dayane de Melo Barros^b, Marllyn Marques da Silva^b, Marcielle dos Santos Santana^b, Beatriz Mendes Neta^b, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{b,c}, René Duarte Martins^b, Márcia Vanusa da Silva^{a,d}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^b Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^d Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brazil.

*Corresponding authors: danielle.feijo@hotmail.com

Abstract

Aim This study aimed to evaluate the antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm potentials of nerolidol. **Materials & Methods** Antioxidant activity was estimated using DPPH•, ABTS•+, and total antioxidant activity (ATT) assays. Antimicrobial and antibiofilm activity against 7 bacterial strains and 4 clinical isolates was evaluated by microdilution and crystal violet methods, respectively. **Results** Antioxidant assays revealed low nerolidol activity by DPPH• (38.25%) and ABTS•+ (5.11%) methods, whereas ATT showed 93.94% activity. Nerolidol inhibited growth of standard gram-positive and gram-negative bacterial strains and clinical isolates. Moreover, nerolidol inhibited biofilm formation in the strains and isolates by 51–98

and 6–60 %, respectively, in a dose-dependent manner. **Conclusions** These results establish the antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm potential of nerolidol.

Keywords: Nerolidol, sesquiterpene, essential oils, phytoconstituents, free radical, bacterial resistance, biofilm

1 Introduction

Medicinal plants, from the earliest days to the present, have played a key role in the prevention, treatment, and cure of diseases. In view of this, man turned to nature as the first medicine and first pharmacy to treat his ailments [1, 2]. Medicinal plants contain bioactive compounds that have been explored in traditional medicine for therapeutic purposes. Among plant metabolites, Essential Oils (EO) have been considered the most promising and easily accessible to the scientific community [3, 4].

EO are complex mixtures of volatile, lipophilic, low molecular weight, generally odorous, liquids that are most often composed of terpene-like molecules [5]. Terpenes are considered to be the largest group of secondary metabolites. With respect to their classification, sesquiterpenoids correspond to the class of terpenes with the largest number of representatives, with about 5000 compounds already reported in literature [6]. Some sesquiterpenes, such as nerolidol, are of scientific interest because of their potential biological activities [7].

Nerolidol ($C_{15}H_{26}O$), molecular weight 222.372 g/mol and density of 0.8700 g/mL, is an acyclic sesquiterpene present in EO extracted from various plant species, such as *Myrocarpus frondosus* (cabreúva oil), *Myroxylon pereirae* (Peru balm), *Myrospermum erythroxylon* (red oil), and *Fokienia hodginsii* (wood oil). Nerolidol occurs as two geometric isomers, *trans* (nerolidol "a" or (E)-nerolidol) and *cis* (nerolidol "b" or (Z)-nerolidol). It is noteworthy that the predominant form in vegetables is (E) -nerolidol [7, 8]. This sesquiterpene is a compound of considerable interest to the cosmetic and food industries due to its uses as a natural fixative essential in the preparation of perfumes and a preservative agent, respectively [7, 9].

A wide range of pharmacological and biological activities have been attributed to nerolidol, including transdermal, antineoplastic, leishmanicidal, larvicidal, antinociceptive, and anti-inflammatory action, along with its involvement in enhancement of drug permeation [7].

The antioxidant and antimicrobial properties of various plant products are being evaluated at present. Antioxidants are substances that slow down oxidative degradation reactions, preventing free radicals from damaging cells and tissues, and thereby preventing the onset of various cardiovascular, chronic (cancer and atherosclerosis), and neurodegenerative diseases [10-14].

The antimicrobial activity of certain substances of plant origin has been drawing considerable attention because infections are responsible for about half of human diseases. Plant components have shown promising potential for the development of new drugs, which may be more effective against bacterial infections and show less toxicity to the human body [15-17]. In addition, often due to the indiscriminate use of antimicrobial drugs, various pathogenic bacteria have acquired resistance, making these drugs ineffective in the therapeutic process [18-20].

In addition to the problem of resistant bacteria, virulence factors such as biofilm formation also concern the medical field, as biofilms are considered as a form of bacterial resistance. Biofilms are biological communities, where some microorganisms are deposited on and adhere to a contact surface, forming a matrix consisting mainly of polysaccharides produced by themselves. Biofilms confer protection to the microorganisms against various types of external factors, such as lack of nutrients and use of antibiotics (or some other chemical agents), that may be utilized to combat their growth [21, 22].

In this backdrop, the present study aimed to evaluate the antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activity of nerolidol, a phytoconstituent commonly found in different plants of north-eastern Brazil and with a potential to benefit human health. In particular, the action of nerolidol against bacteria with known profiles of drug resistance was explored.

2 Materials & methods

2.1 Antioxidant Activities of Nerolidol

2.1.1 DPPH[•] free radical sequestration

The free radical scavenging activity of the mixture of cis and trans isomers of nerolidol (Sigma-Aldrich®; St. Louis, USA) was evaluated in terms of hydrogen donation using the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) [23]. 0.25 mL of the 1 mM stock solution of DPPH[•] was added to in 0.04 ml of different concentrations of nerolidol

(31,25, 62,5, 125, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$). The absorbance at a wavelength of 517 nm was measured after 25 min. Trolox (a water soluble vitamin E analog), gallic acid, and BHT (butylated hydroxytoluene) were used as reference compounds and DPPH• in 0.04 mL of methanol (solvent used to dilute samples) was used as a control. The sequestration of radicals from DPPH• was determined by the formula: $\text{SRL [DPPH}\cdot\text{]} (\%) = [(Sa-Ca)/Ac] \times 100$, where Sa and Ca are the absorbance of samples and control, respectively.

2.1.2 Inhibition by the ABTS^{•+} radical

The ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) assay was performed as described in in Re *et al.* with minor modifications [24]. A stock solution of the ABTS^{•+} radical was prepared by dissolving 7 nM of ABTS^{•+} in 2.45 mM potassium persulfate, and allowed to stand for 16 h before use. The working solution was prepared by diluting 1 mL of the stock solution in ethyl alcohol to an absorbance of $0,70 \text{ nm} \pm 0.02 \text{ nm}$ at 734 nm. 0.01 mL of nerolidol at a concentration of 1 mg/mL was added to 1 mL of the working solution and the absorbance at 734 nm was measured in a spectrophotometer after 6 min of reaction. Trolox was used at different concentrations (0 – 2000 μM) to obtain the calibration curve. Results were expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), based on the equation for the trolox calibration curve ($Y = -0,0003x - 0,6367$, $R^2 = 0,9886$). The inhibition percentage was calculated using the equation: $\text{Inhibition of ABTS}\cdot\text{+} (\%) = [(Ca-Sa)/Ca] \times 100$, where Ca and Sa are the absorbance for control and sample, respectively.

2.1.3 Total Antioxidant Activity (TAA)

Nerolidol was diluted to 1 mg/mL in methanol. 0.1 mL of the sample was solubilized in 1 mL of phosphomolybdate solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate), and incubated in a water bath at 95 °C for 90 min. Subsequently, the absorbance of the samples were measured at 695 nm at room temperature against a blank (1 mL of solution and 0.1 mL of methanol) [25]. TAA was expressed relative to ascorbic acid and calculated using the formula $\text{TAA} (\%) = [(Sa - Ca)/(Aaa - Ca)] \times 100$, where: Ca, Sa and Aaa are the absorbances of control, sample, and ascorbic acid.

2.2 Evaluation of Antibacterial and Antibiotic Activity of Nerolidol

2.2.1 Obtaining bacterial clinical isolates and ATCC strains

The clinical isolates were obtained from the clinical analysis laboratory of the Pernambuco Hospital das Clínicas (HC/UFPE) and identified as LMB 303 (clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant, moderate biofilm producer), LMB 309 (clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, weak biofilm producer), LMB 403 (clinical isolate of *Staphylococcus aureus* sensitive to methicillin, poor biofilm producer), and LMB 409 (clinical isolate of *S. aureus* resistant to methicillin, moderate biofilm producer). The resistance profile of these isolates were performed according to the standards of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* [26]. Biofilm production capacity was estimated according to the crystal violet method, as described by Stepanovic *et al.* [27].

The samples were transported to the Microbiology Laboratory of Immunopathology Laboratory Keizo Asami (LIKA, UFPE) and incubated at 35 ± 2 ° C for 24 h for evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities of nerolidol. We also used standard strains from the American Type Culture Collection (ATCC), including *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Escherichia coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 29665, *P. aeruginosa* ATCC 9029, *S. aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *S. mutans* ATCC 10449.

2.2.2 Microdilution method

Müller-Hinton broth was distributed in 96-well microdilution plates. Then, nerolidol was distributed by means of serial dilution to obtain a concentration range of 500 to 4000 µg / mL. The bacterial clinical isolates and ATCC strains were adjusted in saline medium and standardized according to the McFarland scale of 0.5 tube turbidity. The cell count was confirmed by optical density measured at 630 nm by spectrophotometry and the cells distributed to the plates to obtain a final concentration of 10^5 CFU / mL. The plates were incubated at 35 ± 2 ° C for 24 h. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth by spectrophotometric analysis at a wavelength of 630 nm [26]. Negative control (culture medium) and growth control (culture medium and microorganisms) were added. The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined by transferring one heave from each well to Petri dishes containing

Mueller-Hinton agar medium and then incubated in a greenhouse for 24 h to verify the growth of colony forming units (CFU). MBC was defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed in the Petri dishes. Three independent experiments with duplicate samples were performed.

2.2.3 Evaluation of antibiofilm activity of nerolidol

Initially, TSB (Tryptic Soy Broth) + glucose was added in the wells of the microdilution plates. Then, nerolidol was added at concentrations of 500, 1000, 2000, and 4000 µg/mL. Subsequently, the bacterial clinical isolates and standard strains were adjusted to the McFarland scale of 0.5 tube turbidity, cell count estimated by spectrophotometry with the optical density at 630 nm, and added to flat-bottomed microdilution plates. The final concentration of cells was 10^5 CFU / mL. The plates were incubated at 35 ± 2 ° C for 24 h. After incubation, the culture medium was removed from the sides of the wells. The wells were washed with 0.9% saline. Then, 99% methanol was added to each well and the plates were kept at room temperature for 15 min. Subsequently, the methanol was removed and the plates were dried in the oven.

The 1% crystal violet aqueous solution was added to the wells and the plates were kept at room temperature. The dye was removed and the wells were washed with autoclaved distilled water, followed by drying the plates in the oven. 30% glacial acetic acid was added to each well. Subsequently, the absorbance at 630 nm was measured by spectrophotometry. Results were expressed as the percentage inhibition of biofilm formation [28]. Three independent experiments were performed in duplicates each.

2.3 Statistical Analysis

The data were presented as mean \pm SD, values of $p < 0.05$ (calculated by the analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test) were considered significant. To identify significant differences, the GraphPad Prisma 5.0 software was used.

3 Results and Discussion

3.1 Antioxidant Activities of Nerolidol

3.1.1 DPPH free radical sequestration

The DPPH • radical sequestration assay (Figure 1) revealed low antioxidant activity of nerolidol. The tested concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 µg / mL yielded percentage DPPH• values of 23.71, 23.91, 21.64, 19.60, 24.50, and 38.25, respectively. The nerolidol concentration of 1000 µg/mL was found to correspond to the highest capacity (38.25%) of DPPH• radical sequestration.

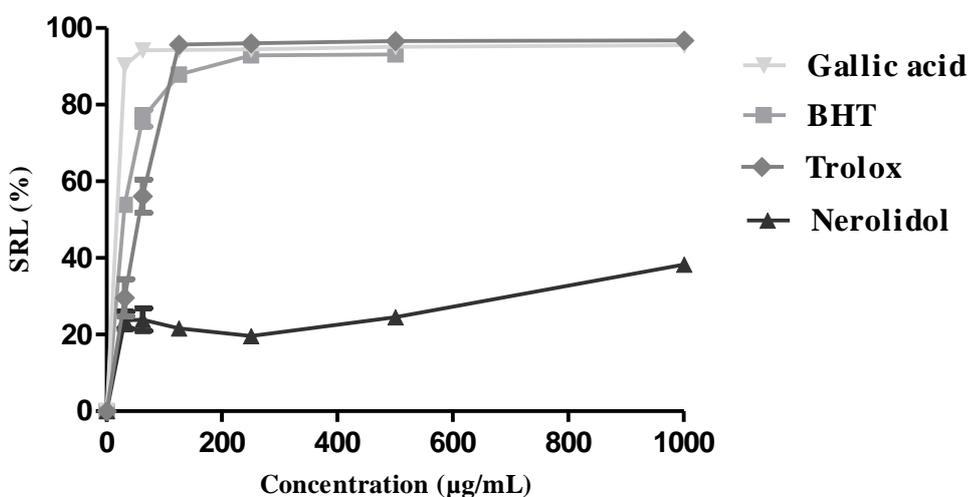


Figure 1. Antioxidant activity of nerolidol assayed by the sequestration (SRL) of the free radical DPPH •. BHT: Butylated hydroxytoluene.

3.1.2 Inhibition by the ABTS•⁺ radical

Results of ABTS • + radical inhibition activity (Figure 2) demonstrated low antioxidant activity of nerolidol, compared to the positive controls BHT and trolox. Nerolidol at concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 µg / mL showed 5.55, 3.42, 3.28, 3.57, 3.09, and 5.11 % inhibition, respectively.

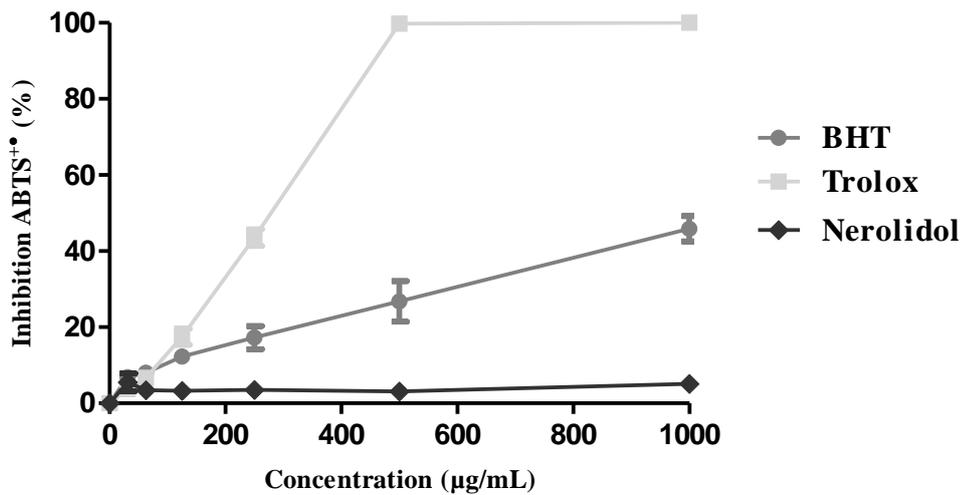


Figure 2. Antioxidant activity of nerolidol assayed by the ABTS • + radical inhibition method. BHT: Butylated hydroxytoluene.

The ABTS • + assay is similar to the DPPH • method since both are associated with the reduction of free radicals. However, the ABTS • + radical forms at the beginning of the assay, while DPPH • is naturally added in its radical form. The main difference between the two radicals is in terms of their solubility. The DPPH • radical could be dissolved in organic solvents, whereas ABTS • + is soluble in both water and organic solvents, allowing analysis of hydrophilic and lipophilic samples [29, 30].

3.1.3 Total Antioxidant Activity (TAA)

Nerolidol showed significant differences ($p < 0.001$) in TAA, with a percentage of $93.94 \pm 9.54\%$ relative to ascorbic acid, demonstrating a better antioxidant activity.

TAA was measured by the phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the tested antioxidant compound and the formation of a green phosphate/Mo (V) complex, which is formed under acidic pH and can be monitored by spectrophotometry at 695 nm [25]. Increased absorbance indicates increased total antioxidant capacity. Thus, the more reducing the tested agent, the greater the absorbance of the sample and the more intense the green color of the generated complex.

According to Serafini *et al.* the antioxidant activity of nerolidol protects the essential lipid biomolecules that are important for cell membrane function [31]. It is suggested that

nerolidol may form a complex with a free radical, possibly due to a chelating effect, and thereby convert these radicals into species with less reactivity [32].

By analyzing the antioxidant activity of nerolidol, Nogueira-Neto, Sousa and Freitas found that the compound has in vitro antioxidant potential through the ability to remove hydroxyl and nitric oxide radicals, as well as to prevent the formation of TBARS (substances reactive to thiobarbituric acid) [33]. Nerolidol was able to prevent AAPH (2,2'-Azobis(aminidopropane) dihydrochloride) induced lipid peroxidation. This led to a decrease in the amount of TBARS formed, displaying a considerable antioxidant potential of nerolidol, which may be able to reduce cellular damage caused by these radicals.

This was corroborating by Pacífico *et al.* while evaluating the antioxidant activity of nerolidol derivatives isolated from a methanolic extract of *Amaranthus retroflexus* L. The DPPH • and H₂O₂ assays showed significant changes in inhibition of the reaction with TBARS, and a decrease in all free radical formation tests, as well as the presence of an antioxidant potential [34].

Vinholes *et al.* also confirmed the inhibition of DPPH • by nerolidol. Several in vitro methods (such as DPPH •, ABTS • +, and ATT) can be used to evaluate the efficacy of naturally occurring antioxidant compounds, both pure and present as plant mixtures [35]. Due to the complex nature of sesquiterpenoids and their mechanisms of action, only one method cannot provide consistent information about the respective antioxidant profiles [36].

3.2 Antimicrobial Activity

3.2.1 Evaluation of nerolidol antibacterial activity

Nerolidol showed inhibition of bacterial growth in standard strains including *S. aureus* ATCC 6538 (MIC = 1000 µg/mL), *S. mutans* ATCC 10449 (MIC= 4000 µg/mL), *P. aeruginosa* ATCC 9029 (MIC= 500 µg/mL), and *K. pneumoniae* ATCC 29665 (MIC = 500 µg/mL) (Table 1).

Table 1. Antibacterial activity of nerolidol against standard bacterial strains

Bacteria	ATCC Identification	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Gram-positive		
<i>Streptococcus mutans</i>	10449	4000
<i>Enterococcus faecalis</i>	14506	>4000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	>4000
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	1000
Gram-negative		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9029	500
<i>Escherichia coli</i>	25922	>4000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29665	500

ATCC: American Type Culture Collection; MIC: minimum inhibitory concentration.

Nerolidol also demonstrated an inhibitory potential against gram-negative and gram-positive bacterial clinical isolates with and without resistance profiles. Nerolidol inhibited the growth of gram-negative bacteria such as *P. aeruginosa* MDR (LMB 303) and KPC (LMB 309) with an MIC of 500 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). As for gram-positive bacteria, nerolidol showed antibacterial activity with an MIC of 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against MSSA (LMB 403) and MRSA (LMB 409) (Table 2).

Table 2. Antibacterial activity of nerolidol against resistant bacterial clinical isolates

Samples	Source bacteria	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
LMB 303	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
LMB 309	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500
LMB 403	<i>Staphylococcus aureus</i>	2000
LMB 409	<i>Staphylococcus aureus</i>	2000

LMB 303: clinical isolate of moderate biofilm-producing multidrug resistant *P. aeruginosa*; LMB 309: clinical isolate of *K. pneumoniae* carbapenemase, a weak biofilm producer; LMB 403: clinical isolate of poor biofilm-producing methicillin-sensitive *S. aureus*; LMB 409: clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* and a moderate biofilm producer; MIC: minimum inhibitory concentration.

Hada *et al.* evaluated the antimicrobial activity of nerolidol against *S. aureus* (FDA209P) and obtained an MIC of 512 $\mu\text{g/mL}$ [37]. M'soua, Alifriqub and Romanaea analyzed the antimicrobial activity of *Fraxinus dimorpha* EO (which contains (E)-nerolidol (36.2%) as its major constituent) using the Brx microdilution method and verified its inhibitory effect against gram-negative bacteria including *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (DSM 50090) and clinical isolate of *K. pneumoniae*

(MIC = 7500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and gram-positive bacteria, including *S. aureus* CCMM B3 (MIC = 3800 $\mu\text{g} / \text{mL}$) [38].

3.2.2 Evaluation of antibiofilm activity of nerolidol

Nerolidol exhibited a dose-dependent antibiofilm activity for both standard strains and bacterial clinical isolates (Figures 3 and 4), i.e., increased nerolidol concentration leads to increased inhibition of bacterial biofilm formation. Nerolidol at concentrations of 500 to 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ inhibited biofilm formation above 50% in standard bacterial strains (Figures 3 and 4).

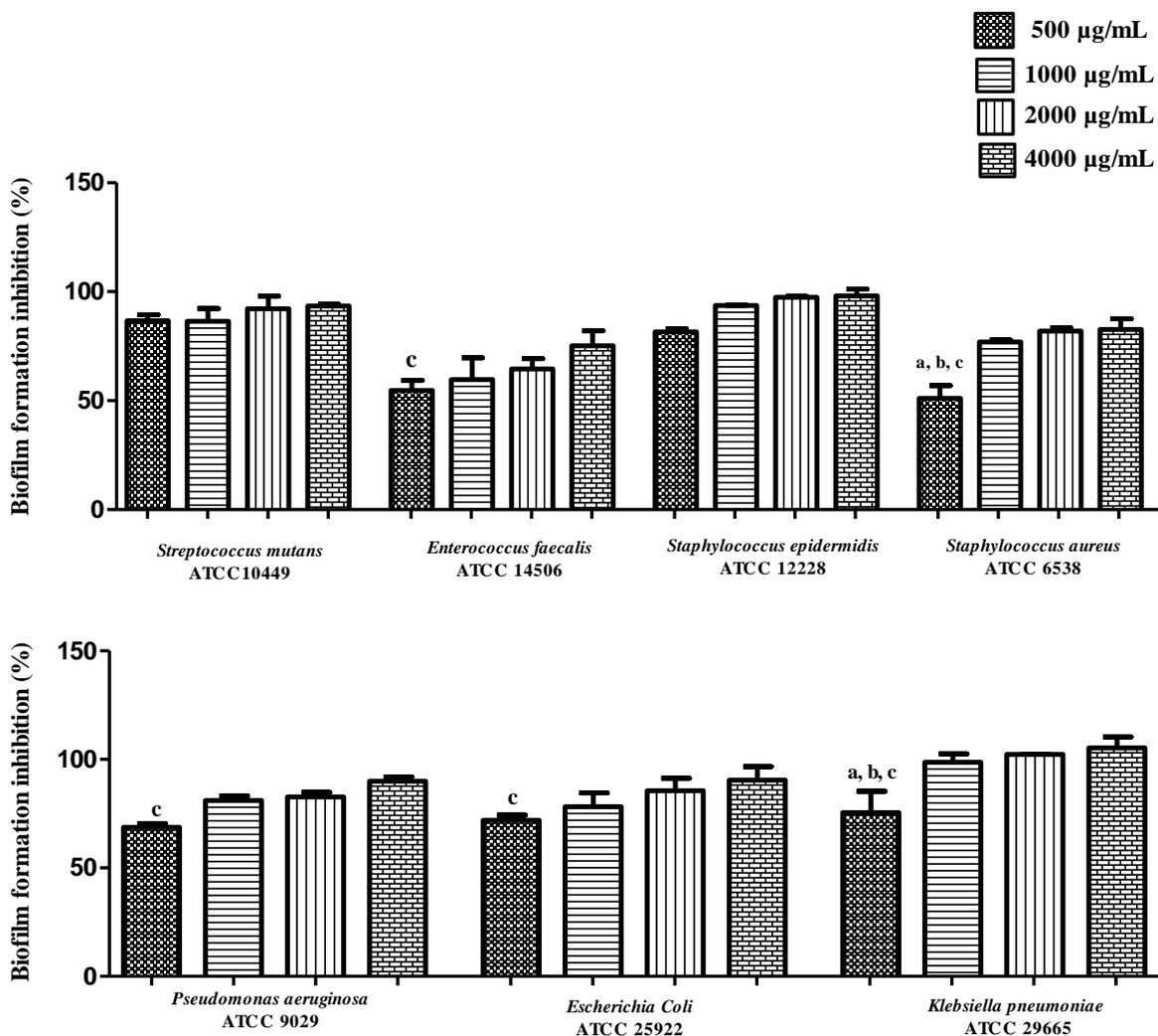


Figure 3. Inhibition of biofilm formation produced by bacterial strains after treatment with nerolidol. ATCC: American Type Culture Collection. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p > 0.05$): a: statistically significant difference compared to 1000

$\mu\text{g/mL}$; b: statistically significant difference compared to 2000 $\mu\text{g/mL}$; c: statistically significant difference compared to 4000 $\mu\text{g/mL}$ concentration.

The effect of nerolidol at concentrations of 500 to 4000 $\mu\text{g/mL}$ on bacterial biofilms of gram-negative clinical isolates ranged from 18 to 86.3 % inhibition (Figure 4). Regarding gram-positive microorganisms, the percentage inhibition of biofilm formation ranged from 6 to 60.53 % (Figure 4). Bacterial biofilm is a virulence factor present in most bacterial infections [39]. Thus, drugs that combat biofilm formation are fundamental for the treatment of pathological conditions triggered by biofilm-forming bacteria [40].

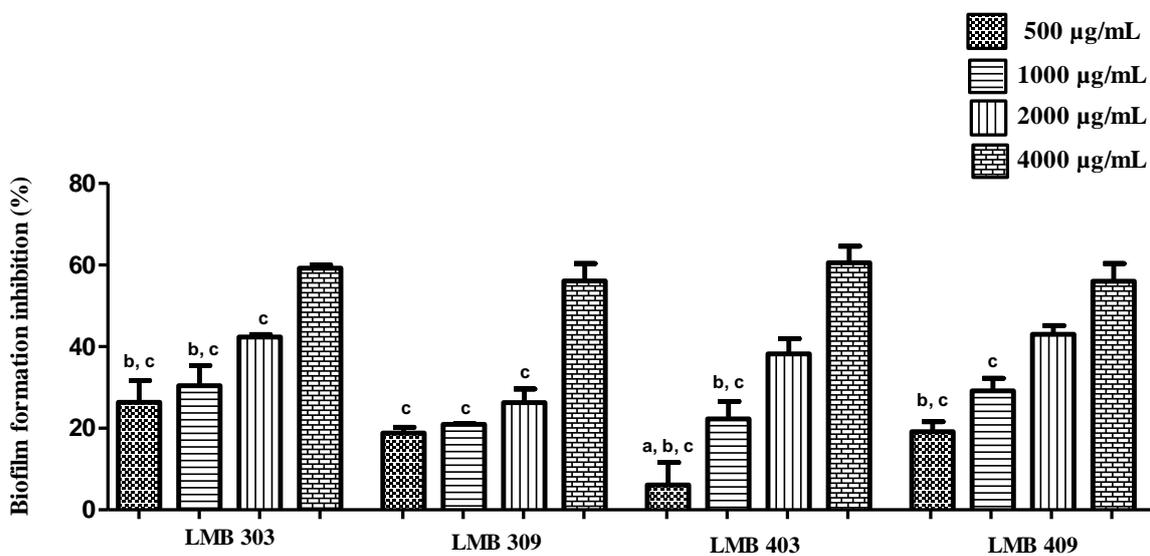


Figure 4. Inhibition of biofilm formation produced by clinical isolates of *K. pneumoniae* carbapenemase, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* following nerolidol treatment. LMB 303: clinical isolate of multidrug resistant *P. aeruginosa* and a moderate biofilm producer; LMB 309: clinical isolate of *K. pneumoniae* carbapenemase and a poor biofilm producer; LMB 403: clinical isolate of methicillin-sensitive *S. aureus* and a poor biofilm producer; LMB 409: clinical isolate of methicillin resistant *S. aureus* and a moderate biofilm producer. Different lower-case letters indicate statistically significant differences between treatments ($p > 0.05$); a: statistically significant difference compared to 1000 $\mu\text{g/mL}$; b: statistically significant difference compared to 2000 $\mu\text{g/mL}$; c: statistically significant difference compared to 4000 $\mu\text{g/mL}$ concentration.

Lee *et al.* evaluated the activity of cis- and trans-nerolidol and found that both the isomers inhibit the formation of *S. aureus* ATCC 6538 biofilm by 45% [41]. This finding is in overall agreement with the present results, since we show that the mixture of the two isomers of nerolidol inhibited biofilm formation of this same bacterium by 50 to 80 %.

Recent studies have shown that antibiotics administered at subinhibitory concentrations can alter the gene expression of infection-causing microorganisms and trigger the opposite effect by stimulating biofilm production, which makes the infection more difficult to treat [42,43]. In the present study, nerolidol, even at subinhibitory concentrations, did not lead to stimulation of biofilm production, i.e., it was not able to induce increase in biofilms, because in all tested concentrations there was a percentage inhibition of this virulence factor.

The present study is pioneering in the evaluation of antibacterial and antibiofilm activity of nerolidol against bacterial clinical isolates with resistance profile, especially in the backdrop of lack of scientific insights about this approach.

Conclusion

Nerolidol exhibits antioxidant and antibacterial activities against the strains *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, KPC, *P. aeruginosa* MDR, MSSA, and MRSA. In addition, it is characterized by antibiotic activity, with inhibition percentage greater than 50% in the highest concentration (4000 µg/mL) evaluated.

Future perspectives

The compounds of plant origin have demonstrated potential biological activities useful for the development of new drugs, among them nerolidol, the main phytochemical constituent of several essential oils of plant species that has received relevant notoriety. The use of nerolidol as an antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agent is considered a promising alternative in the search for therapeutic resources for human health.

Summary points

- In recent decades, interest in essential oils and their phytochemicals has grown, including terpenes, which are commonly known for their antioxidant and antimicrobial properties.
- Nerolidol is a sesquiterpene that has been gaining prominence, being a major constituent of several essential oils, which is generally used as a preservative in the food and cosmetics sector.

- The antimicrobial activity showed inhibition of the bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in addition, nerolidol inhibited biofilm formation above 50%.
- Nerolidol showed promising antioxidant, antimicrobial and antibiofilm potential.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil for the financial support. This work was partially supported by the Foundation for Supporting Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) [APQ-0814-4.03/17].

References

1. Szerwieski, L. L. D., Cortez, D. A. G., Bennemann, R. M., Silva, E. S., Cortez, L. E. R., 2017. Uso de plantas medicinais por idosos da atenção primária. Revista eletrônica de enfermagem. 19, 1-10. <https://doi.org/10.5216/ree.v19.42009>.
2. Stefanello, S., Kozera, C., Ruppelt, B. M., Fumagalli, D., Camargo, M. P., Sponchiado, D., 2018. Levantamento do uso de plantas medicinais na Universidade Federal do Paraná, Palotina-PR, Brasil. Extensão em Foco, 1(15). <http://dx.doi.org/10.5380/ef.v1i15.52776>.
3. Miranda, C. A. S. F., das Graças Cardoso, M., Batista, L. R., Rodrigues, L. M. A., da Silva Figueiredo, A. C., 2016. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. Revista Ciência Agronômica. 47, 213-220. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>.
4. Cruz, M. J. F.; Bezerra, S. B., 2018. Obtaining *Ocimum gratissimum* L essential oil for development of cosmetic facial cleansing. Revista Diálogos Acadêmicos. 6 (2), 159-162.

5. Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, E., 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105, 184-190. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000200013>.
6. Pinto-Zevallos, D. M., Martins, C. B., Pellegrino, A. C., Zarbin, P. H., 2013. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*. 36, 1395-1405. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000900021>.
7. Chan, W.K., Tan, L.T.H., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H., 2016. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*. 21, 1-40. <https://doi.org/10.3390/molecules21050529>.
8. Diniz, E. F. C., Moura, L. R., de Carvalho, R. B., Nunes, L. C. C., 2016. Prospecção tecnológica: estudos sobre complexo de inclusão do nerolidol com a β -ciclodextrina. *Cadernos de Prospecção*. 9, 307-315. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v9i3.16169>.
9. Arruda, D. C., D’Alexandri, A. M. K., Uliana, S. R. B., 2005. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrob Agents and Chemother*. v49,1679-1687. DOI: 10.1128 / AAC.49.5.1679-1687.2005. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>.
10. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*sv. 393, 561- 564. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>.
11. Alam, M. N.; Bristi, N. J.; Rafiquzzaman, M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2), p. 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
12. Borut, P.; Raja, D., 2012. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*. 2012, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/135206>.

13. Tinkel, J.; Hassanain, H.; Khouri, S. J. 2012. Cardiovascular Antioxidant Therapy: A Review of Supplements, Pharmacotherapies, and Mechanisms. *Cardiology in Review*. 20 (2), 77-83. <http://dx.doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823dbbad>.
14. Tao, J., Rajan, K., Ownley, B., Gwinn, K., D'Souza, D., Moustaid-Moussa, N., Tschaplinskif, T.J., Labbé, N., 2019. Natural variability and antioxidant properties of commercially cultivated switchgrass extractives. *Industrial Crops and Products*. 138 , 111474. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111474>.
15. Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous Animals and Toxins including tropical diseases*, 16 (3), 402-413. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>.
16. Savoia, D., 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future microbiology*. 7(8), 979-990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>.
17. Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T. M., 2020. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*, 9 (1), 109. <https://doi.org/10.3390/jcm9010109>.
18. Kyriacou S.V., Brownlow W.J. & Xu X.N. 2004. Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. *Biochemistry* 43(1):140-147. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0351110>.
19. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim Y.K., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H. & Cho M.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 3(1):95-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>.
20. Patil, S., Chen, H., Zhang, X., Lian, M., Ren, P. G., Wen, F., 2019. Antimicrobial Resistance and Resistance Determinant Insights into Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria Isolates from Paediatric Patients in China. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3625. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S223736>.

21. Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, x., Qiu, S., Song, H. 2016. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, 7, 483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483>.
22. Liu, Y., Shi, L., Su, L., van der Mei, H. C., Jutte, P. C., Ren, Y., Busscher, H. J., 2019. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chemical Society Reviews*. 48(2), 428-446. <https://doi.org/10.1039/c7cs00807d>.
23. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199- 1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.
24. Re, R; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v.26, p.1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
25. Prieto P, Pineda M, Aguilar M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 269 (2), 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th Edition (M100-S29). Wayne, PA, 2019.
27. Stepanovic´ S.; Vukovic´ D.; Dakic´ I.; Savic´ B.; Sˇvabic´ -Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam 40 (20), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).

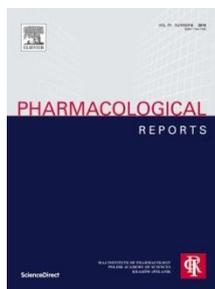
28. Ahmed, A., Khan, A.K., Anwar, A., Ali, S.A., Shah, M.R., 2016. Biofilm inhibitory effect of chlorhexidine conjugated gold nanoparticles against *Klebsiella pneumoniae*. Microbial pathogenesis. 98, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.016>.
29. Di, T., CHEN, G.J., SUN, Y., OU, S.Y., ZENG, X.X., YE, H., 2017. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. J. Funct. Foods. 28, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.005>.
30. WANG, X., ZHANG, Y., LIU, Z., ZHAO, M., LIU, P., 2017. Purification, Characterization, and Antioxidant Activity of Polysaccharides Isolated from Cortex Periplocae, Molecules. 31, 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules22111866>.
31. Serafini, M.R., Santos, R.C., Guimarães, A.G., Santos, J.P.A., Santos, A.D.C., Alves, I.A., Gelain, D.P., Nogueira, P.C.L., Quintans Júnior, L.J., Bonjardim, L.R., Araújo, A.A.S., 2011. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. J Med Food. 14, 1159-66. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0254>.
32. Guimarães, A.G., Oliveira, G.F., Melo, M.S., Cavalcanti, S.C., Antonioli, A.R., Bonjardim, L.R., Silva, F.A., Santos, J.P.A., Rocha, R.F., Moreira, J.C.F., Araújo, A.A., Gelain, D.P., Quintans Júnior, L.J., 2010. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 107, 949-57. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00609.x>.
33. Nogueira Neto, J. D., Sousa, D. P. D., Freitas, R. M., 2013. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 34, 125-130.
34. Pacifico, S., Abrosca, B., Golino, A., Mastellone, C., Piccolella, S., Fiorentino, A., Monaco, P., 2008. Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) leaves. Food Sci Technol. 41,1665-71. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.006>.

35. Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M. A., Rocha, S. M., 2014. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food chemistry*. 156, 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.106>.
36. Panda, S. K., 2012. Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. *Antioxidant enzyme*. 14, 382-400. <http://dx.doi.org/10.5772/50782>.
37. Hada, T., Shiraishi, A., Furuse, S., Inoue, Y., Hamashima, H., Matsumoto, Y., Masuda, K., Shimada, J., 2003. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Natural Medicine*. 57, 64–67.
38. M'sou, S., Alifriqui, M., Romane, A., 2017. Estudo fitoquímico e efeitos biológicos do óleo essencial de *Fraxinus dimorpha* Coss & Durieu. *Natural product research* , 31 (23), 2797-2800. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1294173>.
39. Borges, K. A., Furian, T. Q., Souza, S. N., Menezes, R., Tondo, E. C., Salle, C. T., Moraes, H. L.S., Nascimento, V. P., 2018. Biofilm formation capacity of *Salmonella serotypes* at different temperature conditions. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38, 71-76. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4928>.
40. Lima, J. L. D. C., Alves, L.R., Paz, J.N.P.D., Rabelo, M.A., Maciel, M.A.V., Morais, M.M.C., 2017. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 29 (3), 310-316. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20170039>.
41. Lee, K., Lee, J.H., Kim, S.I., Cho, M.H., Lee, J., 2014. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 9447-9457. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5903-4>.

42. Laureti, L., Matic, I., Gutierrez, A. 2013. Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, 2(1), 100-114.
<http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics2010100>.

43. Martínez, J.L., 2017. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Research*, 6, 1-10.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.9685.1>.

6 ARTIGO 5**Artigo a ser submetido na revista: Pharmacological Reports**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO NEROLIDOL FRENTE À CULTURA DO *Trypanosoma cruzi***

Danielle Feijó de Moura^{a,*}, Dayane de Melo Barros^b, Vitorina Nerivânia Covello Rehn^c, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^{c,d}, René Duarte Martins^e, Márcia Vanusa da Silva^{a,f}

a Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

b Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

c Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

d Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil,

e Espaço Farmácia Viva, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

f Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brasil.

*Corresponding author. E-mail address: danielle.feijo@hotmail.com

Resumo

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e considerada um problema de saúde pública. A transmissão da doença ocorre através das fezes infectadas de triatomíneos, sendo estes, insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiro. O fármaco de referência utilizado para tratar a infecção por *T. cruzi* no Brasil é o benzonidazol (BNZ) e diante dos seus efeitos adversos e eficácia parcial, faz-se necessário à busca por novos medicamentos mais resolutivos. Alguns estudos realizados demonstraram que substâncias extraídas de plantas de diversas classes, como quinonas, flavonoides, terpenos

apresentam um potencial terapêutico frente à espécie de *T. cruzi*. Vale salientar que essas substâncias, por sua vez, possuem menores efeitos adversos, quando comparadas aos fármacos sintéticos. O nerolidol é um terpeno presentes em Óleos Essenciais (OE) extraídos de várias plantas. Alguns estudos vêm demonstrando uma ampla gama de atividades farmacológicas e biológicas desempenhadas por esse composto, tais como, antioxidantes, antimicrobianas, antibiofilme, antiparasitárias, inseticidas e antitumorais. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito antiproliferativo do nerolidol frente à cultura de *T. cruzi* e compreender as alterações morfofisiológicas e o mecanismo de morte celular induzido pelo tratamento com o composto. Para tanto, foram realizados ensaios de citotoxicidade com macrófagos RAW 264.7 e avaliação da morte epimastigota e tripomastigota frente ao composto. Além disso, investigamos o perfil de indução de morte celular através da citometria de fluxo. Nesse estudo, pudemos observar que o nerolidol induziu a morte dos parasitos (IC₅₀ epimastigota 1,61 µg/mL; IC₅₀ tripomastigota 4,39 µg/mL), no entanto se mostrou mais tóxico e menos efetivo que o benzonidazol (IC₅₀ epimastigota 0,8 µg/mL; IC₅₀ tripomastigota 3,8 µg/mL). Em relação aos mecanismos de morte, investigados por citometria, pode-se inferir que o nerolidol não induziu a apoptose e necrose e, quanto a função mitocondrial, foi evidenciado que o nerolidol induziu essa modificação, com redução da função da estrutura celular. Em relação à formação de compartimentos ácidos, foi verificado que o nerolidol induziu uma alteração na estrutura interna do parasito, sob concentração de 1x IC₅₀, o que resultou em perda dos lissomos e autofagia e na concentração 2x a IC₅₀ ocorreu uma degradação celular afetando inclusive o material nuclear. Os achados obtidos sugerem que sejam realizados estudos adicionais baseados em técnicas inovadoras a fim de, minimizar os efeitos tóxicos do composto e permitir efetivamente uma possível utilização do mesmo no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Citometria de Fluxo. Doença de Chagas. Plantas. Óleo essencial. Terpenos.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and is considered a public health problem. The transmission of the disease occurs through the infected feces of triatomines, which are hematophagous insects popularly known as barber. The reference drug used to treat *T. cruzi* infection in Brazil is benznidazole (BNZ) and in view of its adverse effects and partial effectiveness, it is necessary to search for new, more effective drugs. Some studies have shown that substances extracted from plants of different classes, such as quinones, flavonoids, terpenes, have a therapeutic potential against the species of *T. cruzi*. It is worth mentioning that these substances, in turn, have lesser adverse effects when compared to synthetic drugs. Nerolidol is a terpene present in Essential Oils (EO) extracted from various plants. Some studies have demonstrated a wide range of pharmacological and biological activities performed by this compound, such as, antioxidants, antimicrobials, antibiofilm, antiparasitic, insecticides and antitumor agents. Therefore, the objective of the study was to evaluate the antiproliferative effect of nerolidol against the culture of *T. cruzi* and to understand the morphophysiological changes and the mechanism of cell death induced by treatment with the compound. Therefore, cytotoxicity tests were performed with RAW 264.7 macrophages and evaluation of epimastigote and trypomastigote death against the compound. In addition, we investigated the cell death induction profile using flow cytometry. In this study, we observed that nerolidol induced the death of the parasites (IC₅₀ epimastigote 1.61

$\mu\text{g/mL}$; IC_{50} trypomastigote 4.39 $\mu\text{g/mL}$), however it was more toxic and less effective than benznidazole (IC_{50} epimastigote 0, 8 $\mu\text{g/mL}$; IC_{50} trypomastigote 3.8 $\mu\text{g/mL}$). Regarding the mechanisms of death, investigated by cytometry, it can be inferred that nerolidol did not induce apoptosis and necrosis and, as for mitochondrial function, it was evidenced that nerolidol induced this modification, with a reduction in the function of cell structure. In relation to the formation of acidic compartments, it was found that nerolidol induced a change in the internal structure of the parasite, under a concentration of 1x IC_{50} , which resulted in loss of lysosomes and autophagy and in concentration 2x the IC_{50} , cell degradation occurred affecting even the nuclear material. The findings obtained suggest that additional studies based on innovative techniques be carried out in order to minimize the toxic effects of the compound and effectively allow its possible use in the treatment of Chagas disease.

Keywords: Flow Cytometry. Chagas disease. Plants. Essential oil. Terpenes.

Introdução

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, de elevada prevalência e expressiva morbimortalidade a nível mundial, além de ser considerada uma doença parasitária negligenciada. A transmissão decorre do triatomíneo infectado (barbeiro), por meio das formas, vetorial, transfusional, transplacentária e via oral (NUNES et al., 2013; HOWARD et al., 2014; LIDANI et al., 2019).

O tratamento é realizado através do uso de antiparasitários e deve ser iniciado logo após o diagnóstico da doença. Vale salientar que, em virtude da toxicidade das drogas disponíveis, não se recomenda esta terapêutica durante a gestação, a menos que se trate de casos agudo e grave. Fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o Benznidazol (BNZ) é a única droga de escolha disponível para o tratamento específico da doença (PAVAN et al., 2018; FERRAZ et al., 2018; LLANOS et al., 2019).

Apesar de ser o único fármaco disponível no Brasil para a doença de Chagas, o BNZ apresenta efetividade parcial (ativo apenas na fase aguda) e alta toxicidade, que varia desde reações de hipersensibilidade a aplasia medular. Segundo o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (CBDC), cerca de 30% dos usuários de BNZ apresentam reações adversas e como consequência dessa toxicidade os pacientes não completam o tratamento por conta dos efeitos colaterais tais como: enjoos, dores estomacais e resistência ao medicamento, devido aos seus efeitos adversos e, por não ter muitas vezes eficácia no tratamento, há necessidade da busca por novos fármacos (CORREIA et al., 2017; PAVAN et al., 2018).

Nessa perspectiva, faz-se necessário a busca por novas substâncias mais eficientes e, principalmente, com menor potencial tóxico ao ser humano. As plantas têm se mostrado uma

importante fonte de substâncias ativas frente às formas, amastigota, epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, e são promissoras quanto a sua representatividade na prevenção e tratamento da doença de Chagas. Dentre os constituintes de origem vegetal diversas classes, como quinonas, flavonóides e terpenos são de interesse para o tratamento alternativo da doença (BOMBAÇA et al., 2018; MELO et al., 2020).

O nerolidol é um terpeno de ocorrência natural encontrado nos Óleos Essenciais (OE) de vários tipos de plantas e flores. Este composto apresenta-se em diversos OE extraídos plantas como: *Croton argyrophylloides* Muell. Arg, *Banisteriopsis campestris* (A.Juss.) Little, *Piper mollicomum* Kunth, *Croton sincorensis* Mart, *Zornia brasiliensis* Vogel. Esse terpeno é conhecido por desempenhar várias atividades biológicas, incluindo: antioxidante, antifúngica e anticâncer (CHAN et al., 2016; MOURA; MARTINS; SILVA, 2020).

Embora haja uma escassez quanto a estudos acerca da utilização do nerolidol como composto ativo no tratamento da doença de Chagas, um número discreto de pesquisas tem tratado dessa abordagem (SÜLSEN et al., 2008; NIBRET; WINK, 2010). Através de avaliação *in vitro*, Hoet et al. (2006) verificaram um efeito potente do nerolidol frente à espécie *Trypanosoma brucei brucei*, sugerindo sua atividade promissora em espécies do gênero *Trypanosoma*. Salienta-se que, a avaliação biológica *in vitro* de compostos com promissora atividade frente *T. cruzi* deve ser realizada de acordo com os protocolos experimentais preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no programa de pesquisas por novos fármacos para a doença de Chagas (ROMANHA et al., 2010; ZINGALES et al., 2014).

Logo, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos antiproliferativos do nerolidol frente à cultura de *T. cruzi* e compreender as alterações morfofisiológicas e o mecanismo de morte celular induzido pelo tratamento com nerolidol.

Metodologia

Composto

O composto utilizado foi o nerolidol (C₁₅H₂₆O) constituído dos isômeros cis- e trans, com ≥ 97,0% de pureza, peso molecular 222,372 g/mol e densidade de 0,8700g/mL, adquiridos através da Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA). O Nerolidol inicialmente foi inicialmente dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido) a uma concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi diluída em meio de cultura para obter uma solução estoque a 1000 µg/ml (solução

estoque). A solução estoque foi diluída novamente no meio de cultura para obter concentrações de 1 a 100 µg/mL. Ao longo dos procedimentos experimentais, a concentração de DMSO não excedeu 0,05%, essa concentração do DMSO não é tóxica para os protozoários.

Citotoxicidade

O ensaio MTT foi utilizado para determinar os efeitos do nerolidol na viabilidade celular. Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células / mL, contendo meio DMEM completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24h. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram expostas ao nerolidol em diferentes concentrações (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml), incubados novamente por 48 horas. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm e 600 nm em leitor de placa (Multiskan FC Microplate Photometer, ThermoFisher Scientific). O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benzonidazol.). A partir dos valores de inibição, obteve-se a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) de cada composto. O Experimento foi realizado em duplicata.

Avaliação da atividade tripanocida

Epimastigotas

Para determinar o efeito antiproliferativo para formas epimastigotas da cepa DM28c (10^6 parasitos/mL), mantidas em meio LIT+1% de antibiótico+20% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 27 °C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (1 a 100 µg/mL) por 96h. Testou-se o composto em duplicata. O controle negativo da reação foi poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos).

Tripomastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* (10^7 parasitos) da linhagem de células Veras, após estas obterem confluência em cultura. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y (4×10^6 parasitos/ml), mantidas em meio RPMI+1% de antibiótico+5% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 37°C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (1 a 100 µg/mL) por 24h a atmosfera de 5% de CO₂. Testou-se o composto em duplicata. Obteve-se como controle negativo da reação poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀.

Avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo

Tripomastigotas (4×10^6 parasitos/mL) foram ressuspensos em meio RPMI e não tratados ou tratados com 1x e 2x IC₅₀ dos compostos, durante 24h a 37°C em 5% de CO₂. Parasitos foram marcados com 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e anexina V (AV) utilizando o kit de detecção de apoptose de AV-FITC (Ebioscience, San Diego, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi realizado utilizando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, EUA), adquirindo-se 20.000 eventos da região parasitária, utilizando o canal FL1-H para AV-FITC e o canal FL2-H para 7-AAD. A droga de referência foi o benzonidazol. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo® (Tree Star Inc ©, Ashland, EUA) e expressos como a percentagem de parasitos em cada quadrante (não coradas, coradas apenas com 7-AAD, coradas apenas com AV ou coradas com ambos os marcadores) em comparação com o número total de células analisadas.

Ensaio de rodamina 123 (Rho) e laranja de acridina (AO)

Os parasitas tratados e não tratados foram lavados e ressuspensos em 0,5 mL de PBS com 10 mg / mL de Rho 123 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) ou 10 mg / mL de AO (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 20 minutos. Após a incubação, os parasitas foram lavados 3x com 500 µl de PBS e imediatamente analisados por citometria de fluxo, onde as intensidades de fluorescência para AO (compartimentos ácidos) e Rho 123 (potencial da membrana mitocondrial) foram quantificadas. Um total de 20.000 eventos foram adquiridos na região

previamente estabelecida como correspondente às tripomastigotas de *T. cruzi*, com base na dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC). Alterações nas intensidades de fluorescência de Rho 123 (FL1-H) ou AO (FL3-H) foram quantificadas pelo Índice de Variação (IV) obtido pela equação $(TM - CM) / CM$, onde TM é a média de fluorescência para parasitas tratados e a média de fluorescência CM é a do controle (não tratado).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da CC_{50} e da IC_{50} . A análise para medir a variabilidade entre o grupo tratado foi o teste Wilcoxon e entre grupos tratado e controle foi o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% e todas as análises foram feitas no *software* GraphPad Prism 5.0.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da CC_{50} e da IC_{50} . A análise para medir a variabilidade entre grupos, tratado e controle foi o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% e todas as análises foram feitas no *software* GraphPad Prism 5.0. Para verificar o quanto os compostos foram ativos para os parasitos sem causar danos às células normais, foi feito o índice de seletividade (ISE) para esta forma evolutiva. O ISE consiste na razão entre a CC_{50} ou concentração atóxica e a IC_{50} . Quanto maior o ISE, mais específica a atividade do composto para o parasito.

Resultados e Discussão

Citotoxicidade

Os efeitos do nerolidol na viabilidade celular de Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi expressa como a maior concentração testada dos compostos (Tabela 1), os valores de citotoxicidade no nerolidol e do Benzonidazol foram de 20.45 $\mu\text{g/mL}$ e 119.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O nerolidol induziu a morte dos parasitos (IC_{50} epimastigota 1,61 $\mu\text{g/mL}$; IC_{50} tripomastigota 4,39 $\mu\text{g/mL}$), no entanto, se apresentou mais tóxico e menos efetivo

quando comparado ao fármaco de referência, o benzonidazol (IC₅₀ epimastigota 0,8 µg/mL; IC₅₀ tripomastigota 3,8 µg/mL).

Tabela 1. Avaliação dos efeitos antiproliferativa do nerolidol

Composto	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ epimastigotas (µg/mL) (cepa DM28c)	Índice de seletividade (µg/mL)	IC ₅₀ tripomastigotas (µg/mL) (cepa Y)	Índice de seletividade (µg/mL)
Nerolidol	20.45	1.61	12.70	4.39	4.66
Benzonidazol	119.5	0.8	149,38	3.8	31.45

Avaliação dos mecanismos de ação do Nerolidol

Em relação aos mecanismos de morte induzidos pelo composto e investigados por citometria de fluxo, inferiu-se que o nerolidol não induziu apoptose e necrose (Figura 1).

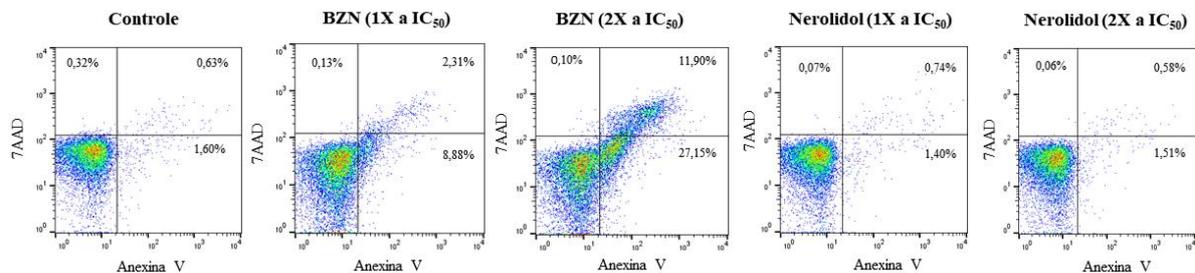


Figura 1. Ensaios de apoptose e necrose do nerolidol por citometria de fluxo. Gráficos de pontos citométricos de fluxo de controle das células tratados com BNZ e o nerolidol nas concentrações de 1X a IC₅₀ e 2X a IC₅₀.

Quanto à função mitocondrial, foi possível evidenciar que o nerolidol induziu uma alteração caracterizada pela diminuição da função dessa estrutura celular (Figura 2). Enquanto que, em relação à formação de compartimentos ácidos (Figura 3), evidenciou que o nerolidol induziu uma modificação na estrutura interna do parasito na concentração de 1x a IC₅₀, o que acarretou na perda dos lissomos e autofagia e sob a concentração de 2x a IC₅₀ houve uma degradação celular, a qual afetou o material nuclear (Figura 2 e 3).

A variação de potencial da membrana mitocondrial (Figura 2), avaliada com o marcador rhodamina foi negativa quando comparados o controle com o tratado. O nerolidol obteve uma variação de -0,22 nas concentrações de 1x a IC₅₀ e de -0,12na concentração de 1x

a IC_{50} , já a droga de referência (BZN) obteve uma variação de -0,40 e -0,25, nas concentrações de 1X a IC_{50} e 2X a IC_{50} , respectivamente.

Em relação à formação de compartimentos ácidos (Figura 3), através do marcador laranja de acridina foi possível observar que o nerolidol aprestou uma variação de -0,15229 (1X a IC_{50}) e de 0,15021 (2X a IC_{50}), enquanto que BZN apresentou uma variação e -0,37299 (1X a IC_{50}) e de -0,57971 (1X a IC_{50}).

Geralmente, as alterações morfológicas das células representam de forma indireta o efeito dos materiais de teste nas células-alvo, ao passo que, quando identificadas, essas alterações podem contribuir na elucidação do mecanismo de ação do composto (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010).

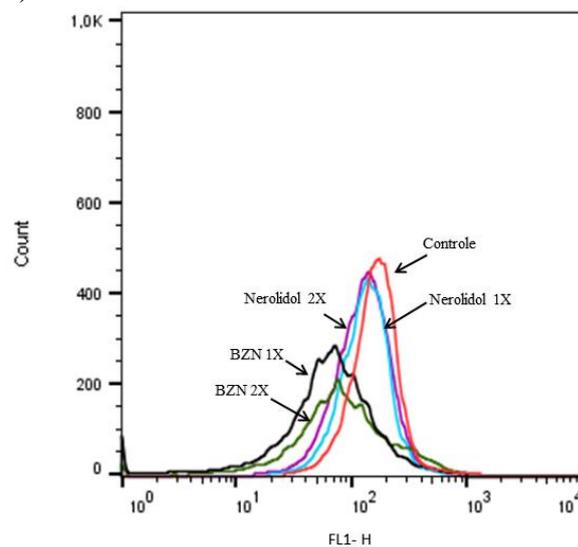


Figura 2. Efeitos do nerolidol no potencial da membrana mitocondrial. Sobreposição de histogramas obtidos por citometria de fluxo das células de controle e tratadas com nerolidol marcadas com Rho 123 (FL1-H).

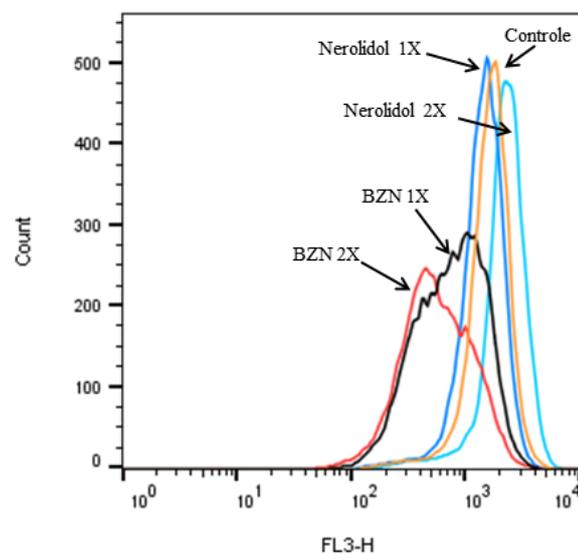


Figura 3. Efeitos do nerolidol na formação de compartimentos ácidos. Sobreposição de histogramas obtidos por citometro de fluxo das células de controle e tratadas com nerolidol marcadas com laranja de acridina.

Os OE de *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) os quais apresentam em sua constituição o nerolidol, revelaram atividade frente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Diferentes concentrações de OE de *A. millefolium* e *O. basilicum* resultou na inibição do crescimento das formas epimastigotas apresentando valores de IC₅₀ equivalentes a 145,5 e 102 µg/mL, respectivamente. Em relação a IC₅₀, os valores obtidos após o tratamento de tripomastigotas na corrente sanguínea foram de 228 µg/mL para *A. millefolium* e 467,5 µg/mL para *O. basilicum* (Santoro et al., 2007).

A atividade *in vitro* do OE de *Strychnos spinosa* e de seus constituintes incluindo o nerolidol foi avaliada frente à *T. b. brucei* e em células de mamíferos (macrófagos murinos J774). O OE foi ativo nos parasitas sem demonstrar uma significativa seletividade [IC₅₀ em *T. b. brucei* = 13,5 µg/mL, enquanto que, o (E)-Nerolidol, demonstrou um efeito mais potente e seletivo nos tripanossomas [IC₅₀ = 1,7 µg / mL, o que põs em evidência a atividade promissora do terpeno (HOET et al., 2006).

Outro estudo também avaliou a atividade tripanocida e citotóxicas de compostos presentes em OE e o fitoconstituente nerolidol revelou atividades tripanocidas frente a *T.b. Brucei* (IC₅₀ = 15,78 µg / mL), embora o parasito seja de outra espécie os resultados encontrados são relevantes, tratando-se do mesmo gênero em estudo (NIBRET; WINK, 2010).

Pesquisas avaliaram a atividade tripanocida de OE que apresentam em sua composição o nerolidol frente a cepas de *T. cruzi* (epimastigotas) e demonstraram que o OE de *Ambrosia tenuifolia* apresentou atividade tripanocida leve (IC₅₀ = 59,7 µg / mL), nesse estudo o BNZ também foi usado como controle positivo (SÜLSEN et al., 2008). Silva et al. (2014) também avaliaram *in vitro* a atividade antiparasitária do extrato *Pilocarpus spicatus* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*, e identificaram atividade tripanocida (inibição maior que 50%).

O OE de *Piper aduncum* também foi eficaz frente as formas, tripomastigota (IC₅₀/24 h: 2,8 µg / mL), metacíclicos (IC₅₀/ 24 h: 12,1 µg / mL) e amastigotas (IC₅₀/24 h: 9 µg / mL). A forma tripomastigota foi mais sensível ao OE (IC₅₀/24 h = 3,8 µg / mL). A análise por citometria de fluxo demonstrou que o OE não influencia o ciclo celular da forma epimastigota de *T. cruzi*, contudo, diminui seu potencial de membrana mitocondrial, corroborando com o presente estudo (Villamizar et al., 2017).

Mohd-Shukri e Zainal-Abidin (2011) avaliaram o efeito do nerolidol na morfologia do *Trypanosoma evansi* em camundongos tratados com 8,8 µg/mL de nerolidol administrado por via intraperitoneal. Os efeitos do nerolidol foram comparados com o efeito do berenil (medicamento anti-tripanosomal). Os parasitas observados no estágio tripomastigota apresentaram alterações morfológicas no grupo tratado com nerolidol após o 23º dia de tratamento e continuaram gradualmente até o 25º dia pós-tratamento, a partir disso, os parasitas ficaram rígidos, perderam a membrana ondulante, contudo, os flagelos livres permaneceram intactos.

Conclusão

Pode-se inferir que o nerolidol, é um composto promissor para estudos futuros sobre o tratamento tripanocida. A fim de otimizar o perfil de segurança do nerolidol, as combinações com compostos de menor potencial tóxico (incluindo BNZ) devem ser testadas de forma combinada com técnicas inovadoras a fim de, minimizar os efeitos tóxicos do composto e permitir efetivamente uma possível utilização do mesmo no tratamento da doença de chagas.

Referências

- ADADE, C.M., SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. *The Open Parasitology Journal*. v. 4, n. 1, p. 178-187, 2010.
- BOMBAÇA, A. et al. Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*. v. 23, n.11, p. 1-4, 2018.
- CHAN, W. et al. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.
- CORREIA, J. P. R. et al. Pharmacotherapeutic follow-up of patients with Chagas disease using benznidazole: drug-related problems and pharmaceutical interventions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 3, p. 334-340, 2017.
- FERRAZ, L. R. M. et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. *Acta tropica*, v. 185, p. 127-132, 2018.
- LLANOS, M. A. et al. Uma abordagem baseada na estrutura para a identificação de novos compostos anticagásicos: inibidores da anidrase carbônica do *Trypanosoma cruzi*. *Jornal de Inibição de Enzimas e Química Medicinal*, v. 35, n. 1, p. 21-30, 2020.

MELO, A. R. B. et al. Os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia organoides* afetam a viabilidade, motilidade e ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*. *Micron*, v. 129, p. 102781, 2020.

MOHD-SHUKRI, H. B.; ZAINAL-ABIDIN, B. A. H. The effects of nerolidol, allicin and berenil on the morphology of *Trypanosoma evansi* in mice: a comparative study using light and electron microscopic approaches. *Malays. Appl. Biol*, v. 40, p. 25-32, 2011.

NIBRET, E.; WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*, v. 17, n. 12, p. 911-920, 2010.

NUNES, Maria Carmo Pereira et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta medica*, v. 72, n. 05, p. 480-482, 2006.

HOWARD, E. J. et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 121, n. 1, p. 22-33, 2014.

PAVAN, T. B. S. et al. Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease. *PloS one*, v. 13, n. 7, p. e0200707, 2018.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental parasitology*, v. 116, n. 3, p. 283-290, 2007.

SILVA, C. V. et al. Estudo fitoquímico e avaliação in vitro da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* cepa Y de *Pilocarpus spicatus* St. Hil.(Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 4, p. 812-818, 2014.

SÜLSEN, V.P. et al. In vitro Antiprotozoal Activity and Chemical Composition of *Ambrosia tenuifolia* and *A. scabra* Essential Oils. *Natural Product Communications*, v. 3, n. 4, p. 1934578X0800300416, 2008.

ZINGALES, B. et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caatinga é um domínio fitogeográfico predominante da região Nordeste e abrange um elevado quantitativo de espécies da flora brasileira. Este bioma apresenta uma considerável variedade química de metabólitos secundários, como OE e seus ficonstituintes, dentre estes, o nerolidol, sesquiterpeno acíclico, que apresenta importante potencial bioativo e vem sendo empregado em diferentes setores industriais (farmacêutico, cosmético e alimentício) de forma crescente e promissora, o que evidencia a relevância de estudos acerca das atividades biológicas do referido composto.

Quanto às propriedades biológicas analisadas foi possível verificar que o nerolidol não causou sinais evidentes de toxicidade aguda nos animais. No entanto, a ausência de sinais de toxicidade aguda em camundongos ainda não é suficiente para validar a sua utilização terapêutica, pois, isto requer estudos adicionais que possam avaliar a toxicidade crônica.

No teste de citotoxicidade, o nerolidol induziu leves efeitos inespecíficos em diferentes linhas celulares e apresentou atividade hemolítica nas hemácias de camundongos. Após administrar o nerolidol sob dose oral única equivalente a 2000 mg/kg, o composto revelou baixa toxicidade e alterações hepáticas leves, e não foi considerado genotóxico tampouco mutagênico. Sob essas condições experimentais, o nerolidol foi considerado seguro por via oral.

O Nerolidol também demonstrou atividades antioxidante e antibacteriana frente as cepas de *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* MDR, MSSA e MRSA. Além disso, foi observada atividade antibiótica, com porcentagem de inibição superior a 50% sob maior concentração (4000 µg/mL) avaliada.

E sobre sua utilização no tratamento tripanocida pode-se inferir que o nerolidol, é um composto promissor para estudos futuros e a fim de otimizar o perfil de segurança do mesmo, as combinações com outros compostos que conferem menor potencial tóxico (incluindo BNZ) devem ser testadas de forma sinérgica com técnicas inovadoras a fim de, reduzir os efeitos tóxicos do composto e tornar viável a utilização do mesmo na terapêutica da doença de chagas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. In: STREAM, C. (Ed.). 4th. ed. [s.l.] Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil **Acta Botânica Brasileira**, v.16, n.3, p.273-85, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P, HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALVES, M. S. et al. Comparação das atividades antineoplásica e antioxidante do triterpenóide lupeol em plantas da caatinga. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 1-4, 2019.
- AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de Casearia sylvestris, em ratos Wistar**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- AMES, B N. Dietary Carcinogens and Anti-carcinogens (Oxygen Radicals and Degenerative Diseases). **Science**, v. 221, p. 1256-64,1983.
- ANDRADE, L. E. A.; DANTAS, M. S. S. Áreas protegidas e sociobiodiversidade no Semiárido brasileiro. **Anuário Antropológico**, n. 1, p. 69-96, 2020.
- ARNOUS, A.H. et. al. Plantas medicinais de uso caseiro – Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- ARRUDA, D. C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.
- AYDIN, Y. et al. Efeitos hipotensores do carvacrol na pressão sanguínea de ratos normotensos. **Planta medica** , v. 73, n. 13, p. 1365-1371, 2007.
- AYE, M. M. et al. Uma revisão sobre a fitoquímica, propriedades medicinais e atividades farmacológicas de 15 plantas medicinais selecionadas de Mianmar. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.
- BADKE, M. R. et al. Panorama brasileiro dos serviços de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 9, p. 64, 2019.
- BAKER, C.N.; TENOVER, F.C. Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2654-2659, 1996.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446- 475, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASTOS, J. F. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basical Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, p.331-337,2010.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.

BERG, J. M.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6 Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BERNARDES, M. F. F. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular**. 2016. 158f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

BEZERRA, D.P. et al. Atividade antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton regelianus* e seu componente ascaridol. **Química e Biodiversidade**, v. 6, n. 8, p. 1224-1231, 2009.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 829 p., 2002.

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por MTT em células tratadas com toxinas urêmicas–revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 2016.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proc Natl Acad**, v.95, p.4126-4133, 1998.

BONIFACIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BONNEY, K.M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v.21, n.11, 2014.

BRANDÃO, M.G.L. et al. Traditional Uses of Brazilian Plants from the first Edition of Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2a, p.478-87, 2009.

BRASIL. Manual técnico de hemovigilância/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Brasília: Ministério da Saúde**, 3ª versão, 2003.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Nova delimitação do semi-árido brasileiro. **Brasília: Ministério da Integração Nacional**, 32p., 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**, Campinas: UNICAMP, 122p., 1994.

BRIZZOLLA, J.C. et al. Promoção da saúde e o uso de plantas medicinais no contexto escolar: um relato de caso. **Vivências**, v. 14, n. 26, p. 281-292, 2018.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

BUCKNER, F.S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009–2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, n.6, p. 609-616, 2010.

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.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CALVIELLO, G. et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 87 - 96. 2006.

CARDOSO, J. C. et al. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.

CARRARD, V. C. et al. Teste dos Micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**. Porto Alegre. Vol. 48, n. 1, p. 77-81, 2007.

CARVALHO, E. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CARVALHO, L. S.; PEREIRA, K. F.; ARAÚJO, E. G. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 147-157, 2015.

CASTRO, M.R.; FIGUEIREDO, F.F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56, 2019.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p., 2008.

CHANG, T. H. et al. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint (*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

CHAN, W.K. et al. Nerolidol: um álcool sesquiterpeno com atividades farmacológicas e biológicas multifacetadas. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, NCCLS, 49p., 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29th Edition (M100-S29). Wayne, PA, 2019.

COLLINS, A.R. et al. The comety assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, p.143-151, 2008.

COLOMA, A. G. et al. Triterpene-based plant defenses. **Phytochem Ver**, v. 10, p. 245-260, 2011.

CORRÊA, C. L.; BOFF, M. M. **Toxicidade Aguda**. In: CORRÊA, C. L.; LEMONICA, I. P.; ZAMBRONE, F. A. D.; CAMARGO, J. L. V. Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos. São Paulo: ILSI- Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, cap. 3, p.43-91, 2009.

COUTINHO, H.D.M., BEZERRA, D. A. C., LÔBO, K., BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, jul 2003/jun 2004.

COWAN, M.M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN T.M.; LEWIS N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Grisse W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.

CUI, K. et al. Murthy, “Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants,” **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 28, no. 5, pp. 771–799, 2004.

DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**. v. 72, p.135-144, 2002.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, Alcance, 422p., 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products biosynthetic approach**. Chichester: Wiley, 2009.

DIMITROVA, L. et al. Potencial antimicrobiano e antioxidante de diferentes extratos solventes da planta medicinal *Geum urbanum* L. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 113, 2017.

DINIZ, E. F. C. et al. Prospecção Tecnológica: Estudos Sobre Complexo de Inclusão do Nerolidol com A B-Ciclodextrina. **Cadernos de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 307, 2016.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. **Acute toxicity and eye irritancy**. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis, p.853-916, 2001.

DONELLI G. et al. Synergistic activity of dispersin B, cefamandole nafate in the inhibition of Staphylococcus biofilm growth on polyurethanes. **Antimicrob Agents Chem**, v.51, n.8, p. 2733-2740, 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

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

EDDOUKS, M.; AJEBLI, M.; HEBI, M. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco. **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 516-530, 2017.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do resinoso material, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, n.8, p.711-713, 1998.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. Safety of Food and Beverages: Spices and Seasonings. **Encyclopedia of Food Safety**, Elsevier, p. 324-3330, 2014.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, B. L. A. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

FIB (Food Ingredients Brasil). **A Ciência dos Antioxidantes**. Nº 34, p.68-75, 2015. Disponível: <https://revista.fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060542256001464876372.pdf>. Acesso em 27 de novembro de 2019.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

GAMEIRO, P. H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *Agaricus brasilienses* em cultura de linfócitos humanos**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pelotas, p. 56, 2005.

GANEM, R. S. **Caatinga: Estratégias de Conservação**. Consultoria Legislativa, 2017. Disponível em: < <http://bd.camara.gov.br/bd/handle/bdcamara/34479> >. Acesso em de dezembro de 2019.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v.165, n. 2-3, p.153-162, 2001.

GARIGLIO, E. S. et al. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. **Brasília, DF: Serviço Florestal**, p. 349-367, 2010.

GONÇALVES, L. M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALL-JUNIOR, C. **Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão Perna perna através do Ensaio do Cometa**. In: II Simpósio Brasileiro De Engenharia Ambiental. Livro de Resumos. v.1, UNIVALI, p. 384, 2003.

GUIMARÃES, D. A. S.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.2, p.267-275, 2014.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Clarendon, UK: Oxford University Press, 936p., 1999.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188, 1996.

HAUFF, S. N. Representatividade do sistema nacional de unidades de conservação na Caatinga. **Brasília: Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento**, 2010.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

IARMARCOVAI, G. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 215-233, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Mapa de Biomas do Brasil**, primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <www.ibge.gov.br >. Acesso em 28 de dezembro de 2019.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 20^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 524p., 1998.

KATTAN, E. A. F. et al. The effect of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **Int. J. Pharm**, v. 215, p. 229-240, 2001.

KAWAGUCHI, W. H. et al. Doença de Chagas: do surgimento ao tratamento–revisão da literatura. **J Health Sci Inst**, v.37, n.2, p. 182-189, 2019;

KITAOKA, N. et al. The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. **Molecular Plant**. v. 8, n°1, p. 6-16, 2015.

KITTS, D.D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 423-434, 1994.

KLOPELL, F. C. et al. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 819-828, 2001.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Em Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Editora EMBRAPA: Belém, p. 19-26. 2008.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, p.183-199, 2002.

LAPA, J.A. et al. **Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais**. In: SIMÕES, C.M. O.; SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora UFSC, .1102p., 2003.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food Chem. Toxicol**, v.46, Suppl 11: S247-S250, 2008.

LINDBERG, H.K. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 617, n.1, p, 33-45. 2007.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006

MARGETTS, J. **Aroma Chemicals V: Natural Aroma Chemicals**. In: ROWE, D. (ed.). 1^o Ed. Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., Ch. 8, p. 175. 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p. , 2007.

MARQUES, A. M. et al. Chemistry and biological activity of essential oils from *Piper clausenianum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, n.11, p. 1837-1840, 2010.

MATICH, A. J. et al. Chirality and biosynthesis of lilac compounds in *Actinidia arguta* flowers. **Phytochemistry**, v. 68, p.1746-1751, 2007.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. S43-S45, 2010.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, vol. 15, p. 9252-9287, 2010.

MORALES-YUSTEA, M. et al. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, p. 279-281, 2010.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/ microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOSER, M. C. **Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos**. 2011. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, n. 1-2, pp. 55–63, 1983.

MOURA, D. F., MARTINS, R. D., SILVA, M. V. Nerolidol: Phytoconstituent of Essential Oils of Caatinga Plants. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n.12, p. 33402-33416, 2019.

MUGHAL, A et al. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. **Mutation research**, v. 700, n. 1-2, p. 86-94, 2010.

NOGUEIRA NETO, J.D. et al. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1861-1870, 2013.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, v. 504, n.5, p. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, M.; SIMOES, M.; SASSI, C. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 64p., 2003.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Quality control methods for medicinal plants methods**. p. 41- 43, 1998.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p. 291-298, 1984.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PASTOR, S. et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v.18, n.3, p.249-58, 2003.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “Arnica-da-Serra” (*Lychnophora* spp.). **Revista Virtual de Química**. v. 8, n. 1, p. 242-261, 2016.

PAULA, A. G. P.; LIMA, C. P. Phytochemical prospection and medication interactions of 37 herbs marked in Pinhais-PR. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4621-4640, 2019.

PEIXOTO, D. N. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 24, p.341-350, 2010.

PEREIRA JÚNIOR, L. R. et al. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.271-299, 2001.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p.1-10, 2004.

PFALLER, M.A.; BARRY, A. L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1992-1996, 1994.

PHILLIPS, M. A. et al. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 619-23, 2008.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRADO, D. E. **As Caatingas da América do Sul**. In: LEAL, R. I.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 823p. 2003.

RAMOS, Y.; ALONSO, G. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 31, n. 2, p. 130-137, 2011.

REDDY, G.M. et al. Evaluation of antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl method of 40 medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 24, p. 4082-4086, 2012.

REMPEL, C. et al. Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K., **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K., Mutagênese Ambiental. Canoas: Editora ULBRA, p.21-27, 2003.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311- 318 2011.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p.764-771, 2011.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SASAKI, Y.F. et al. The comet assay with mouse multiple organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. **Critical Reviews Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender, A.). **Plenum Press**, v.4, p.31-53, 1976.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. *Mutat. Res.*, v. 31, no. 1, p. 9-15, 1975.

SIKKEMA, J.; BONT, J., POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v.59, p.201–222, 1995.

SILVA, C. J. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. *Química Nova*, v.33, n.1, 2010.

SILVA, R. A. et al. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos do Estado de São Paulo/*Trypanosoma cruzi* infection in triatomines of the State of São Paulo. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, n. 4, p. 3446-3453, 2019.

SILVA, R. A. et al. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 23, p. 259-267, 2014.

SILVA TRENTIN, D.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C.M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, ED. UFRGS, 2007.

SIMÕES, O. M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 14-15, 2003.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*, v.55, p.313-315, 1984.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Experimental cell research*, v. 175, p. 184-91, 1988.

SLESÁK, I. et al. O papel do peróxido de hidrogênio na regulação do metabolismo vegetal e sinalização celular em resposta a estresses ambientais. *Acta Biochimica Polonica*, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2007.

SŁOCZYŃSKA, K. et al. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, v. 55, p. 273–285, 2014.

SOEIRO, M. N. C. et al. Quimioterapia experimental para a doença de Chagas: 15 anos de contribuições de pesquisas de estudos in vivo e in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 301-310, 2009.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUSA, C.M.M.et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

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

SPIVAK, G. COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New applications of the Comet assay: CometFISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, v. 681. p. 44-50, 2009.

STICH, H.F. et al. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 195–199, 1998.

TABARELLI, M. et al. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 25-29, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TEIXEIRA, A. H. et al. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2014.

TENFEN, A. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de uma espécie de “inhame” (*Dioscorea scabra*) contra microorganismos causadores de infecções veterinárias. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, 2019.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**, v.119, p.3-10, 2006.

TERRADAS, M. et al. DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. **DNA repair**, v. 8, n. 10, p. 1225-1234, 2009.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206–221, 2000.

TIRAPÉGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 2. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2006.

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. **Ann Ist Super Sanità**, v.45, p.260-264, 2009.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 25, n. 6, 2003.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C.S.; The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 153 – 162, 2008.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998.

WHO (World Health Organization). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve, Switzerland, 1998.

YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 12A, p. 978-989, 2013.

ZUZARTE, M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 612–618, 2011.

APÊNDICE A-Nerolidol: Fitoconstituente de Óleos Essenciais de Plantas da Caatinga

33402

Brazilian Journal of Development**Nerolidol: Fitoconstituente de Óleos Essenciais de Plantas da Caatinga****Nerolidol: Phytoconstituent of Essential Oils of Caatinga Plants**

DOI: 10.34117/bjdv5n12-384

Recebimento dos originais: 10/11/2019

Aceitação para publicação: 02/01/2020

Danielle Feijó de Moura

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

E-mail: danielle.feijo@hotmail.com

René Duarte Martins

Espaço Farmácia Viva, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Márcia Vanusa da Silva

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brasil.

RESUMO

A caatinga é um domínio fitogeográfico que se concentra na região nordeste e na porção norte do estado de Minas Gerais no Brasil, este bioma compõe um rico ecossistema com vasta biodiversidade de um grande número de espécies endêmicas e, extenso potencial inexplorado para bioprospecção. Dentre os tipos de produtos fornecidos por esse bioma, os Óleos Essenciais (OE) recebem notoriedade, visto que, tanto os OE quanto os seus fitoconstituintes apresentam importante relevância para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. O nerolidol por sua vez é um sesquiterpeno encontrando de forma majoritária em OE e vem sendo pesquisado devido as suas promissoras propriedades biológicas. Logo, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura sobre a presença do

Brazilian Journal of Development

variadas propriedades biológicas têm sido postas em evidência para pesquisas no âmbito científico. Desse modo, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura sobre a presença do nerolidol em OE obtidos de plantas da caatinga.

2 METODOLOGIA

Realizou-se um levantamento bibliográfico descritivo e quali-quantitativo acerca da presença do nerolidol em OE obtidos de plantas da caatinga. O levantamento bibliográfico baseou-se em artigos científicos completos, dissertações e teses publicados nos idiomas, português, inglês e espanhol, com dimensão temporal entre 2001 e 2019. Os descritores utilizados foram: caatinga, óleo essencial, sesquiterpeno e nerolidol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os OE também conhecidos por óleos etéreos, óleos voláteis e essências, encontram-se entre os produtos do metabolismo vegetal com maiores potenciais promissores e de melhor acesso para a pesquisa científica de compostos úteis ao ser humano (MATTOS et al., 2007). Entende-se por OE “misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênic” (MORAIS, 2009).

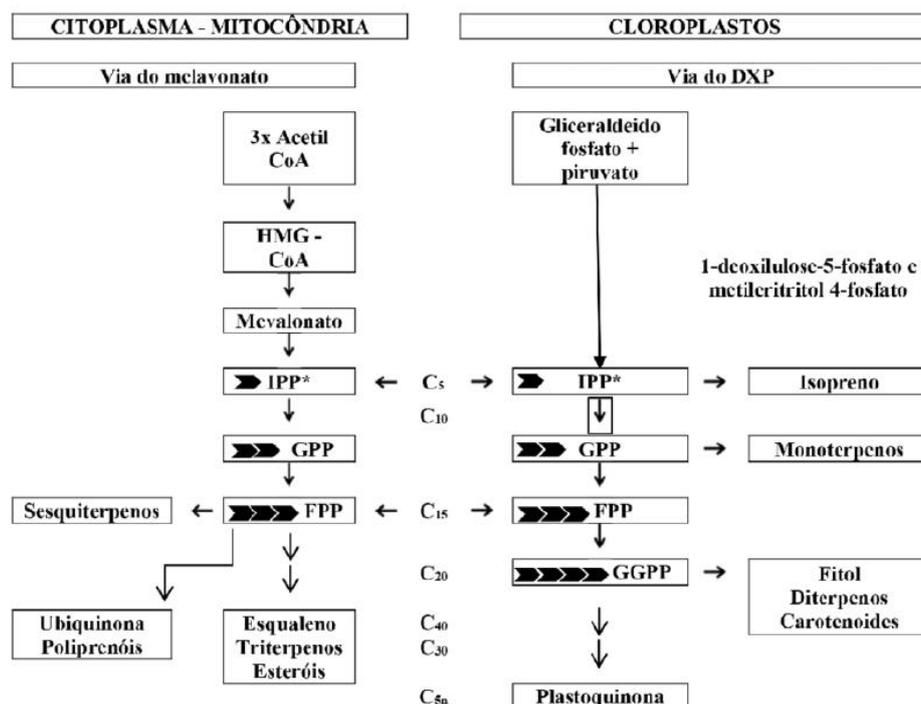
Os OE são encontrados em inúmeras plantas, sendo constituídos por substâncias do metabolismo secundário, que não estão associadas de forma direta com as etapas de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (GARCÍA; CARRIL; 2011). A produção e armazenamento desses óleos ocorrem em estruturas secretoras especializadas, como canais oleíferos, células ou bolsas secretoras e tricomas glandulares, que podem se apresentar em diferentes órgãos dos vegetais. Logo, de forma inerente a espécie vegetal, os OE podem estar presentes nas flores, folhas, sementes, raízes ou ramos/caules (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Simões et al. (2010) os OE podem apresentar entre dezenas e centenas de substâncias voláteis em sua composição. Estas substâncias fazem parte, predominantemente, da classe dos terpenos os quais estão inseridos nas vias do ácido mevalônico e do 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP), rotas metabólicas responsáveis pela síntese destes compostos (Figura 1). Os terpenos quando apresentam elementos adicionais

Brazilian Journal of Development

em sua constituição, comumente oxigênio, são conhecidos como terpenoides (BAKKALI et al., 2008).

Figura 1. Rotas metabólicas da síntese de terpenos/terpenoides: via do mevalonato e via do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP)



IPP ou DMAPP. IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato. GPP: geranyl pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato. **Fonte:** Adaptado de: Baser; Demirci (2007).

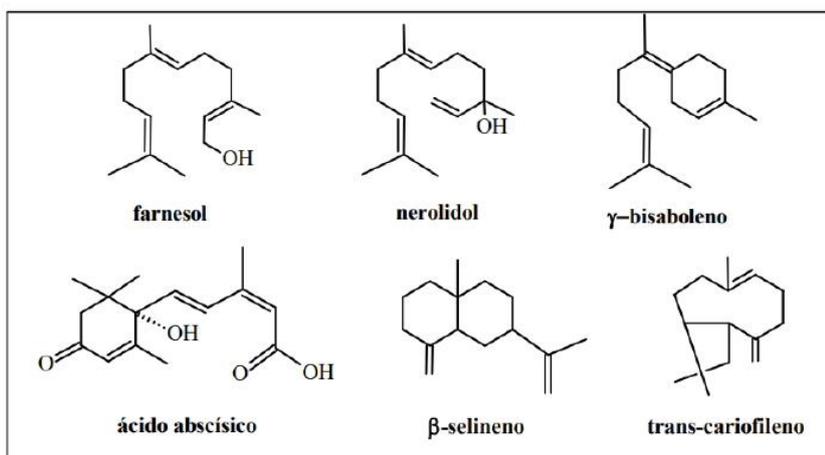
Segundo Bakkali et al. (2008) os terpenos são classificados conforme o número de unidades presentes no seu esqueleto de carbono: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e triterpenos (C30). Os monoterpenos e sesquiterpenos são os mais comuns em OE compondo até 90% do conteúdo total (LAHLOU, 2004).

De acordo com Bruneton (2001) e Simões e Spitzer (2003) os monoterpenos podem ser classificados conforme a ciclização: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol, terpinoleno) e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona) ou por meio do grupo funcional: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas (nepetalactona) e tropolonas (gama-tujaplicina). Enquanto que, os sesquiterpenos (Figura 2), considerados fitoconstituintes majoritários em OE (por isso são os mais notáveis) são classificados conforme a ciclização: acíclicos

Brazilian Journal of Development

(farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico, gama bisaboleno) e bicíclicos (beta-selineno, beta-cariofileno). Vale destacar que, cada em um desses subgrupos, classifica-se um amplo número de substâncias, estimando-se aproximadamente 200 tipos de esqueletos carbônicos (SIMÕES; SPITZER, 2003; PAVARINI, LOPES, 2016).

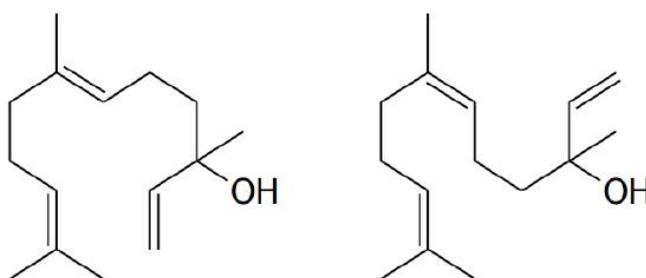
Figura 2. Exemplos de constituintes terpênicos



Fonte: Simões; Spitzer, (2003).

Dentre os fitoconstituintes de natureza terpênic, o nerolidol recebe notabilidade, tratando-se de um composto geralmente majoritário em OE de várias espécies vegetais. Conforme Chan et al. (2016) o nerolidol é um sesquiterpeno que possui fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ (Figura 3) e pode se apresentar nas formas *cis* (Z) e/ou *trans* (E). Ressalta-se que na isomeria geométrica *cis* (Z) refere-se a ligantes de maior massa situados no mesmo lado da molécula e *trans* (E) refere-se a ligantes de maior massa não situados no mesmo lado da molécula.

Figura 3. Estrutura química do nerolidol: *cis* (Z) e/ou *trans* (E), respectivamente



Fonte: Diniz et al. (2016).

Brazilian Journal of Development

O nerolidol é encontrado em OE de várias plantas pertencente a diferentes biomas incluindo a caatinga. Com base na literatura foram identificadas a presença de nerolidol em 20 espécies vegetais de origem tanto nativa quanto naturalizada. Dentre estas plantas apenas 5 são endêmicas do Brasil. A parte da planta onde se obteve os OE, foram as folhas sendo estas consideradas a fonte mais comum de extração do nerolidol. Quanto à isomeria do composto, a forma *trans* (E)-nerolidol foi a mais prevalente. Vale ressaltar que apenas 3 estudos não informaram acerca do tipo de nerolidol identificado nos OE (Tabela 1). Observou-se também no presente estudo que *Varronia dardani* (Taroda) J.S.Mill. (Figura 4) foi à única espécie endêmica e exclusiva do bioma caatinga, esta espécie distribui-se na região Nordeste do país nos seguintes estados: Ceará, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte (MELO et al., 2012).

Figura 4. Folha de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill



Fonte: Duarte (2015).

Diante disso pode-se inferir que, a caatinga é um patrimônio muito valioso do Brasil tendo em vista, sua ampla biodiversidade e o seu elevado nível de endemismo (CORDEIRO et al., 2016). E tratando-se de compostos bioativos presentes neste domínio fitogeográfico o nerolidol extraído de OE têm evidenciado potencial promissor de aplicação, uma vez que, possui várias atividades biológicas como antineoplásica, leishmanicida, antioxidante, antimicrobiana, ansiolítica, potencializador para permeação de drogas terapêuticas na forma

Brazilian Journal of Development

transdérmica e larvicida (ARRUDA et al., 2005; MARQUES et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013; YAMANE et al., 2013).

Tabela 1. Fontes vegetais de nerolidol presentes em OE

Nº	Nome Científico da planta	Origem	Endemismos	Domínios fitogeográficos	Parte da Planta	Tipo de Nerolidol encontrado	Referência
01	<i>Croton argyrophylloides</i> Muell. Arg.	Nativa	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica.	Partes aéreas	(E)- nerolidol	Morais et al., 2006.
02	<i>Momordica charantia</i> L.	Naturalizada	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal.	Semente	trans- Nerolidol	Braca et al., 2008.
03	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica.	Flores, caules e folhas.	trans- Nerolidol	Stashenko et al., 2009.
04	<i>Myrocarpus fastigiatus</i> Allemão	Nativa	Sim	Caatinga, Mata Atlântica.	Madeira	(E) - nerolidol	Wanner et al., 2010.
05	<i>Lantana radula</i> Sw.	Nativa	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica.	Folhas	(E)- nerolidol	Passos et al., 2012.
06	<i>Byrsomima verbascifolia</i> Rich. Ex A. Juss.	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica.	Folhas	nerolidol (n.s.)	Lourenço, 2012.
07	<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Nativo	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica.	Folhas	trans- nerolidol	Brun, 2012.
08	<i>Croton nummularius</i> Baill.	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado	Ramo	nerolidol (n.s.)	Basto, 2014.
09	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal.	Folhas	(E)- nerolidol	Christofoli, 2014.
10	<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica.	Folhas	trans- nerolidol	Costa et al., 2015.
11	<i>Croton sincorensis</i> Mart.	Nativa	Sim	Caatinga e Floresta Ombrófila	Folhas	(Z)-Nerolidol	Souza et al., 2017
12	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica.	Partes aéreas	(E)-nerolidol	Silva et al., 2017.
13	<i>Geophila repens</i> (L.) I.M. Johnst	Nativa	Não	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica.	Partes aéreas	trans- nerolidol	Rao; Lai; Gao, 2017.
14	<i>Piper aduncum</i> L.	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal.	Folhas	Nerolidol (n.s.)	Villamizar et al., 2017.
15	<i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill	Nativa	Sim	Caatinga.	Partes aéreas	trans-Nerolidol	Veloso, 2018.
16	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal.	Frutos maduros	(Z)-Nerolidol	Cabral et al., 2018.
17	<i>Psidium guajava</i> L.	Naturalizada	Não	Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica.	Folhas	trans- Nerolidol	Souza et al., 2018.
18	<i>Piper mollicomum</i> Kunth	Nativa	Não	Caatinga, Amazônia,	Folhas	(E)- nerolidol	Marques et al., 2018.
19	<i>Banisteriopsis campestris</i> (A.Juss.) Little	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado	Flor	(Z)- Nerolidol (E)- Nerolidol	Rocha, 2018.
20	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm.	Nativa	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal.	Madeira	(E)- nerolidol	Guedes, 2019.

n.s. = não especificado.

Brazilian Journal of Development

4 CONCLUSÕES

A caatinga é um bioma predominante na região Nordeste e compreende um grande número de espécies da flora brasileira. Este domínio fitogeográfico apresenta uma considerável variedade química de metabólitos secundários, como OE e seus ficonstituintes, dentre estes, o nerolidol, sesquiterpeno acíclico que possui várias propriedades biológicas e vem sendo inserido em diferentes setores industriais (farmacêutico, cosmético e alimentício) de forma progressiva e promissora. Com base no estudo, pode-se inferir que o nerolidol é um composto facilmente encontrado em diferentes biomas brasileiros inclusive o da caatinga.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil **Acta Botânica Brasilica**, v.16, n.3, p.273-85, 2002.

ARRUDA, D. C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v .49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDISSERA, M. D. **A nanotecnologia potencializa uma ação tripanocida do nerolidol em camundongos infectados com *Trypanosoma evansi*: interação da barreira hematoencefálica**. 60f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2018.

BAŞER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: BERGER, R.G. (ed.). **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. **Springer Science & Business Media**, v. 4, p. 75-76. 2007.

Brazilian Journal of Development

BASTO, S. R. L. *Croton nummularis* Baill.(Euphorbiaceae): **composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais**. 46f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2013.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v. 79, n. 2, p. 123–125, 2008.

BRUM, T. F. **Metabólitos Secundários, Composição Química e Atividade Antioxidante do Óleo Essencial e das Folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke**. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa maria, Rio Grande do Sul, 2012.

BRUNETON, J. **Farmagonosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales**. 2ª edición, Zaragoza: Acribia, 1100p, 2001.

CABRAL, R. S.C. et al. Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their in vitro antibacterial activity. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2018.

CAVALCANTE, M. B. Ecoturismo no bioma Caatinga: o caso do Parque Estadual da Pedra da Boca, Paraíba. **Nature and Conservation**, v. 2, n. 1, p. 25–38, 2009.

CHAN, W. K. et al. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1-40, 2016.

CORDEIRO, I. et al. Euphorbiaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016.

Brazilian Journal of Development

CHRISTOFOLI, M. **Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B.** 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, Goiás, 2014.

COSTA, E. V. et al. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 7, p. 563–567, 2015.

CUNHA, A.P., NOGUEIRA, M.T., ROQUE, O.R. **Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações.** Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 678p. 2012.

DINIZ, E. F. C. et al. Prospecção Tecnológica: Estudos Sobre Complexo de Inclusão do Nerolidol com A B-Ciclodextrina. **Cadernos de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 307, 2016.

Duarte, B. A. M. **Estudo químico e biológico da *Varronia dardani* (taroda) j.s. Mill (boraginaceae).** 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, Rio Grande do Norte, 2015.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120–130, 2017.

FORZZA, Rafaela C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39–45, 2012.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P.U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biologia)**, v. 2, n. 3, 2011.

Brazilian Journal of Development

GUEDES, U.H. **Identificação e caracterização das propriedades da madeira de espécies brasileiras visando à produção de lamelas de madeira para churrasco (*grilling planks*)**. 98f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2019.

HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 431–460, 1997.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microorganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132, 2010.

LAHLOU, M. Methods to study the Phytochemistry and Bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, p.435-448, 2004.

LOURENÇO, H. A. O. **Teor e Composição Química do Óleo Essencial De *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc. e *Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. Ex Juss: Influência da Variação Sazonal e Circadiana**. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, Goiás, 2012.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 785–801, 2011.

MARQUES, A. M. et al. Chemistry and biological activity of essential oils from *Piper claussonianum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, n.11, p. 1837-1840, 2010.

MARQUES, A. M. et al. Separation of volatile metabolites from the leaf-derived essential oil of *piper mollicomum* kunth (piperaceae) by high-speed countercurrent chromatography. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

Brazilian Journal of Development

MATTOS, S.H. et al. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. **Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil**, p. 61-63, 2007.

MELO, J. I. M. et al. Boraginaceae. In: FORZZA, R. C. et al. (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas **Embrapa Meio Ambiente**, p. 140- 152, 2009.

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907–910, 2006.

NOGUEIRA NETO, J.D. et al. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1861-1870, 2013.

PASSOS, J. L. et al. Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11447–11455, 2012.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “Arnicas-da-Serra” (*Lychnophora* spp.). **Revista Virtual de Química**. v. 8, nº 1, p. 242-261, 2016.

RAO, H.; LAI, P.; GAO, Y. Chemical composition, antibacterial activity, and synergistic effects with conventional antibiotics and nitric oxide production inhibitory activity of essential oil from *Geophila repens* (L.) I.M. Johnst. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

Brazilian Journal of Development

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014.

ROCHA, E. O. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little**. 158F. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

SAMPAIO, E.V.S.B. et al. Espécies da flora Nordestina de importância econômica potencial. Recife: **Associação Plantas do Nordeste**, 331p, 2005.

SILVA, A. P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSCS; Florianópolis: Editora UFSC, 1104 p, 2010.

SIMÕES, C. M. O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, v. 1, p. 467-497, 2003.

SOUZA, G. S. et al. Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 8, p. 1–8, 2017.

SOUZA, T. S. et al. Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. **Phytochemistry**, v. 153, p. 129–137, 2018.

Brazilian Journal of Development

STASHENKO, E. E. et al. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93–103, 2010.

VELOSO, C. A. G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial.** 103f. Dissertação Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2018.

VILLAMIZAR, L. H. et al. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma Cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 131–139, 2017.

WANNER, J. et al. Chemical composition and antibacterial activity of selected essential oils and some of their main compounds. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 9, p. 1359–1364, 2010.

YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 12A, p. 978-989, 2013.

APÊNDICE B- Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados Com Nerolidol

5172

Brazilian Journal of Development

Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados com Nerolidol

Ponderal Evaluation and Hypocratic Screening of Nerolidol Treated Mice

DOI:10.34117/bjdv6n1-375

Recebimento dos originais: 30/11/2019

Aceitação para publicação: 31/01/2020

Danielle Feijó de Moura

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

E-mail: danielle.feijo@hotmail.com

Tamiris Alves Rocha

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Dayane de Melo Barros

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Marilyn Marques da Silva

Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NANOBIOCEL), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Silvio Assis de Oliveira Ferreira

Laboratório de Bromatologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

René Duarte Martins

Espaço Farmácia Viva, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Márcia Vanusa da Silva

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brasil.

RESUMO

A natureza é uma importante fonte de novos agentes terapêuticos, com isso a quantidade de medicamentos à base de produtos naturais ou de fitoconstituintes tem aumentando cada vez mais. O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico presente em Óleos Essenciais (OE) de diferentes espécies botânicas e é amplamente utilizado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e sob o ponto de vista terapêutico possui algumas propriedades farmacológicas importantes tais como: antineoplásica, leishmanicida, ansiolítica, potencializadora para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica, larvicida, antioxidante e antimicrobiana. O uso de produtos naturais e fitoconstituintes no tratamento de doenças vêm crescendo ao longo do tempo, e muitas vezes sua utilização é realizada de

Brazilian Journal of Development

forma indiscriminada por grande parte da população, podendo inclusive causar sinais e sintomas de toxicidade. Para avaliar a toxicidade produzida por uma substância são realizados testes de toxicidade que resultarão em informações utilizadas para a sua classificação toxicológica. Logo, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com o nerolidol, a fim de verificar uma possível toxicidade desse composto. A avaliação do peso e a triagem farmacológica comportamental foi realizada em camundongos machos. Um grupo recebeu a administração por via oral de 2000 mg/kg de nerolidol enquanto que o outro grupo recebeu o veículo de diluição (PBS e 10% de DMSO). Após as respectivas administrações, os camundongos foram monitorados quanto aos parâmetros comportamentais por 4h e avaliação ponderal foi realizada durante 14 dias consecutivos. Não foi observada morte dos animais, na avaliação aguda do nerolidol sobre camundongos Swiss no período de 14 dias. Da mesma forma, nenhuma alteração em relação ao screening hipocrático foi observada, sendo o comportamento do grupo tratado semelhante ao do grupo controle em ambas as doses. O ganho de peso obtido com a dose avaliada foi semelhante com o grupo controle, evidenciando que o nerolidol não demonstrou toxidez nos modelo experimental avaliado.

Palavras-chave: Nerolidol. Óleos Essenciais. Toxicologia. Triagem comportamental.

ABSTRACT

Nature is an important source of new therapeutic agents, with which the number of medicines based on natural products or phytochemicals is increasing. Nerolidol is an acyclic sesquiterpene present in Essential Oils (EO) from different botanical species and is widely used as a flavoring agent by the food industries and under the therapeutic point of view it has some important pharmacological properties such as: antineoplastic, leishmanicidal, anxiolytic, enhancer for permeation of therapeutic drugs in transdermal, larvicidal, antioxidant and antimicrobial form. The use of natural products and phytochemicals in the treatment of diseases has grown over time, and many times their use is carried out indiscriminately by a large part of the population, and may even cause signs and symptoms of toxicity. To assess the toxicity produced by a substance, toxicity tests are carried out that will result in information used for its toxicological classification. Therefore, the objective of the present study was to carry out a weight assessment and hypocratic screening of mice treated with nerolidol, in order to verify a possible toxicity of this compound. Weight assessment and pharmacological behavioral screening was performed in male Swis mice. One group received oral administration of 2000 mg / kg of nerolidol while the other group received the dilution vehicle (PBS and 10% DMSO). After the respective administrations, the mice were monitored for behavioral parameters for 4 hours and weight assessment was performed for 14 consecutive days. No death of the animals was observed in the acute evaluation of nerolidol in mice in the period of 14 days. Likewise, no changes in relation to hypocratic screening were observed, the behavior of the group being treated as a control group in the form of doses. The weight gain obtained with the evaluated dose was similar with the control group, showing that nerolidol did not show toxicity in the evaluated experimental model.

Keywords: Nerolidol. Essential oils. Toxicology. Behavioral screening.

Brazilian Journal of Development

1 INTRODUÇÃO

A natureza é uma fonte abundante de novos recursos terapêuticos, logo, o uso de medicamentos à base de produtos naturais ou de fitoconstituintes tem aumentando de maneira crescente. Vários compostos, principalmente de origem vegetal têm despertado o interesse da comunidade científica, dentre esses, o nerolidol, composto presente em diversos Óleos Essenciais (OE) de plantas como: *Croton argyrophylloides* Muell. Arg., *Piper aduncum* L., *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. e *Zornia brasiliensis* Vogel (Moura; Martins; Silva, 2019).

O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico de fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$, este composto é amplamente utilizado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e apresenta um grande interesse para a indústria de cosméticos em virtude de ser um fixador natural. Sob o ponto de vista terapêutico, algumas propriedades farmacológicas já foram atribuídas a esse composto, tais como antineoplásica, leishmanicida, ansiolítica, potencializadora para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica, larvicida, antioxidante e antimicrobiana (Arruda et al., 2005; Nogueira Neto et al., 2013; Yamane et al., 2013).

O uso de produtos naturais e fitoconstituintes no tratamento de doenças tem crescido ao longo do tempo, e muitas vezes sua utilização é realizada de maneira indiscriminada por grande parte da população, no entanto, em muitos casos, a utilização inadequada pode desencadear doenças crônicas e agudas conforme a parte utilizada, formas de uso, dose e tempo de utilização (Carvalho et al., 2015; Seca; Pinto, 2019).

Testes de toxicidade são métodos utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada durante um período não superior a 24h, seguido do monitoramento do modelo experimental (animais) por 14 dias após essa administração (OECD, 2001). Estes testes demonstram informações relevantes de toxicidade aguda e letalidade utilizando um número reduzido de animais quando comparado ao teste clássico de DL50 (Dipasquale; Hayes, 2001).

Nos testes de toxicidade também é realizada uma triagem comportamental que serve para facilitar a identificação de uma possível atividade do composto no Sistema Nervoso Central (SNC) bem como, indicar os efeitos do mesmo sob o comportamento dos animais (Almeida, 2006). Devido a escassos relatos na literatura acerca dos possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo nerolidol em ensaios pré-clínicos, o estudo teve como objetivo

Brazilian Journal of Development

realizar uma avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com o nerolidol.

2 METODOLOGIA

2.1 Composto

O nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) consistindo em isômeros *cis* e *trans* com pureza $\geq 97,0\%$, com peso molecular 222,372 g/mol e densidade 0,8700 g/mL, foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA).

2.2 Animais

Foram utilizados para os testes, camundongos machos Swiss albinos (*Mus musculus*) com aproximadamente oito semanas de idade, pesando entre 30 e 50g, provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Durante o experimento, os animais foram aclimatados em caixas de polipropileno sob condições apropriadas (três camundongos por caixa) em uma sala com ar condicionado, sob temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$, umidade relativa de $50 \pm 5\%$ e ciclo de claro/escuro de 12h. Os animais receberam água potável e comida *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com a legislação nacional de experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 0001/2018).

2.3 Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental foram utilizados três animais por grupo. Um grupo recebeu a administração por via oral de 2000 mg/kg de nerolidol diluído em PBS e 10% de DMSO enquanto que, o outro grupo recebeu o veículo de diluição (PBS e 10% de DMSO). Os animais foram submetidos a jejum de água e alimentos por 3h antes da administração dos tratamentos. Após as respectivas administrações, os camundongos foram recolocados na caixa de polipropileno (em grupos de três animais cada) e monitorados a cada trinta minutos (30, 60, 120, 180 e 240 min), durante

Brazilian Journal of Development

quatro horas após a administração do tratamento e a cada 24h por 14 dias consecutivos, seguindo os parâmetros comportamentais, segundo o teste screening hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962). Durante o período de 14 dias, os animais foram pesados diariamente para a avaliação ponderal.

Foram estabelecidos alguns critérios comparativos de acordo com Almeida et al. (1999) para uma série de comportamentos, que em sua maioria são realizados de forma comum e rotineira pelos animais, de modo que, caso ocorresse qualquer alteração comportamental em decorrência dos tratamentos administrados seria possível inferir uma relação com a atividade no SNC, Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

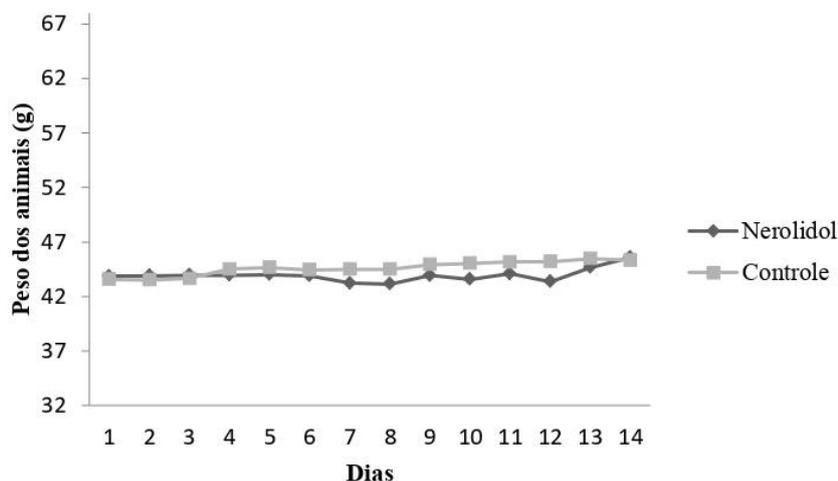
Os parâmetros comportamentais avaliados foram: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta a estímulos na cauda, contorção, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. Esses parâmetros foram classificados pela intensidade, duração e progressão, em uma escala de 0 a 3 onde: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso, para posterior análise (Malone, 1962; Malone, 1977).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações clínicas diárias evidenciaram ausência de toxicidade dérmica com adequada recuperação, manutenção do estado geral, presença de atividade física, disposição para alimentar-se e ausência de mortes nos animais tratados com o nerolidol e o grupo controle negativo. Em relação à avaliação ponderal dos camundongos foi observado ganho de massa corpórea do grupo experimental, a partir das aferições realizadas de forma prévia e no decorrer de 14 dias de monitoramento após a aplicação da dose de 2000 mg/mL do nerolidol (Figura 1). O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância aplicada em animais saudáveis, pois, após a administração de quaisquer substâncias a presença de lesões dermatológicas acompanhadas de prurido e dor, inapetência e consequente perda de peso, caracterizam uma possível toxicidade do composto (Silva et al., 2005).

Brazilian Journal of Development

Figura 1. Avaliação ponderal do peso dos camundongos tratados com nerolidol



Júnior et al. (2012) afirmaram que a variação de peso é um dos parâmetros mais utilizados em estudos toxicológicos para indicar o aparecimento, muitas vezes, precoce, da toxicidade de uma substância em um animal. Da mesma forma, outros estudos têm avaliado o ganho ou perda de peso corporal em animais submetidos a determinadas substâncias de interesse na toxicologia médica, ambiental e alimentar (Bhaskar e Mohanty, 2014; Lu et al., 2014; Mukerji et al., 2015; Das et al., 2015; Olson et al., 2015).

Os animais tratados com o nerolidol na dose de 2000 mg/mL não apresentaram mudanças comportamentais anormais quando comparados com o grupo controle, uma vez que, durante o tratamento. Os parâmetros analisados foram realizados de forma sistemática: avaliação clínica (modificações na pele, pêlos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e dos SNC e SNP) e avaliação de efeitos gerais, ou seja, alterações no estado de consciência e disposição, sistema motor, tônus muscular, SNC (tremores, convulsão e sedação) e SNA (lacrimejamento, salivação, ptose, piloereção e respiração). Os achados obtidos revelaram que não foram observadas alterações nesses sistemas tampouco alterações comportamentais (Tabela 1 e 2).

Brazilian Journal of Development**Tabela 1.** Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNC

Parâmetros Avaliados	Tempo (min)									
	30		60		120		180		240	
SNC	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
1) Estimulantes										
Agitação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambulação aumentada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Andar em círculo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autolimpeza	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Bocejo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escalar	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levantar	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Movimento estereotipado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Movimentação das vibrissas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sacudir a cabeça	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saltos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Taquicardia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Refluxo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Depressores										
Abdução das patas do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambulação diminuída	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caída de Straud	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estiramento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo córneo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonolência	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

C= Controle e N= Nerolidol. Classificação dos efeitos: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso.

Brazilian Journal of Development

As observações descritas na triagem comportamental servem para facilitar a investigação de uma possível atividade do composto no SNC, bem como, indicar os efeitos do mesmo no comportamento dos animais (Quintans-Júnior, 2004). Por meio do screening hipocrático foi possível obter uma estimativa geral da natureza toxicológica da concentração aplicada nos animais, analisando, estado de consciência e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividades sobre o SNC e sobre o SNA.

Tabela 2. Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNA

Parâmetros Avaliados	Tempo (min)									
	30		60		120		180		240	
SNA	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
Diarreia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Força para agarrar	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lacrimejamento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração acelerada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tônus muscular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C= Controle e N= Nerolidol. Classificação dos efeitos: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso.

Pires Júnior et al. (2012) avaliaram em camundongos a toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* que apresenta o nerolidol como constituinte majoritário e observaram que não houve morte dos animais na avaliação aguda do extrato (dose de 2000 mg/kg), no período de 14 dias. Além disso, não foi observada alteração no screening hipocrático, de modo que, o comportamento do grupo tratado foi semelhante ao do grupo controle. Quanto ao consumo de ração, não houve diferença no grupo dos camundongos tratados com o extrato e o ganho de peso obtido foi parecido com o grupo controle, evidenciando que o extrato não apresentou toxicidade frente aos parâmetros analisados o que corrobora com o presente estudo.

A toxicidade de uma substância para um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Vale destacar que toda substância de acordo com os princípios da toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico dependendo das condições de exposição (doses administradas e conseqüentemente o quanto foi absorvido),

Brazilian Journal of Development

tempo, frequência de exposição (doses únicas ou repetidas) e vias de administração envolvida (Campos et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se verificar que o nerolidol não causou sinais evidentes de toxicidade aguda nos animais. Vale ressaltar que, a ausência de sinais de toxicidade aguda nesse tipo de modelo experimental ainda não é suficiente para determinar o uso terapêutico do nerolidol, pois estudos adicionais devem ser realizados a fim de avaliar a toxicidade crônica, o que agregará maior segurança para sua utilização comercial.

REFERÊNCIAS

Almeida, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80, p.72-76, 1999.

Almeida, R.N., 2006. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., v.11, p. 131-137.

Arruda, D. C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>

Bhaskar, R., Mohanty, B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. **General and Comparative Endocrinology**, v. 205, p. 2226-234, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.007>.

Brazilian Journal of Development

Campos, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.1, p.373-382, 2016.

Carvalho, C. et al. Screening hipocrático de ratos tratados com extrato hidroetanólico de *Solanum auriculatum* AITON. **Revista Panorâmica online**, v. 18, p. 15-25, 2015.

Das, K. P. et al. Developmental toxicity of perfluorononanoic acid in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 51, p. 133-144, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014>.

Dipasquale, L.C.; Hayes, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hayes, A.W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, v.18, p. 853-916, 2001.

Júnior, H. B. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, 512-519, 2012. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.15179>.

Kharkwal, G. C. et al. Volatile terpenoid composition and antimicrobial activity of flowers of *Melia azedarach* Linn from North West Himalayas, India. **Journal of Indian Chemical Society**, v.92, p.141-145, 2015.

Lu, L. et al. Safety assessment of the fermented *Phylloporia ribis* (*Lonicera japonica* Thunb.) mycelia by oral acute toxicity study in mice and 90-day feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, n. 69, p. 18-24, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.044>.

Malone, M.H., Robichaud, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p.320-32, 1962.

Brazilian Journal of Development

Seca, A.M., Pinto, D.C. Potencial biológico e uso médico de metabólitos secundários.

Medicines, v. 6, n. 66, p. 1-6, 2019. <https://doi.org/10.3390/medicines6020066>.

Silva, E. J.R. et al. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar.

Rev. bras. Farmacogn, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

Yamane, M. A.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of**

Pharmacy and Pharmacology, v. 47, n. 12, p. 978-989, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb03282.x>