



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS- DCF  
CURSO DE FARMÁCIA**

Gabriela Tafaela Dias

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN SILICO* E DAS  
ATIVIDADES HEMÓLITICA, ANTIOXIDANTE E  
ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DAS FORMAS ÓLEO  
ESSENCIAL E ÓLEO ESSENCIAL  
MICROENCAPSULADO *DE LIPPIA PEDUNCULOSA***

João Pessoa

2018

Gabriela Tafaela Dias

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN SILICO* E DAS ATIVIDADES  
HEMÓLITICA, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *IN VITRO*  
DAS FORMAS ÓLEO ESSENCIAL E ÓLEO ESSENCIAL  
MICROENCAPSULADO *DE LIPPIA PEDUNCULOSA*

Trabalho de Conclusão de Curso  
de Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa

2018

D541a Dias, Gabriela Tafaela.

Avaliação da toxicidade *in silico* e das atividades hemolítica, antioxidante e antibacteriana *in vitro* das formas óleo essencial e óleo essencial microencapsulado de *lippia pedunculosa* / Gabriela Tafaela Dias. - - João Pessoa, 2018.

81p: il. -

Orientadora: Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Lippia pedunculosa*. 2. Óleo microencapsulado. 3. *In silico*. 4. Citotoxicidade.  
5. Hemólise. 6. Antimicrobiano. 7. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

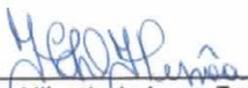
CDU: 665-947.8(043.2)

**GABRIELA TAFELA DIAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in silico* E DAS ATIVIDADES HEMOLÍTICA,  
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *in vitro* DAS FORMAS ÓLEO  
ESSENCIAL E ÓLEO ESSENCIAL MICROENCAPSULADO DE LIPPIA  
PEDUNCULOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à coordenação do Curso de  
Farmácia da Universidade Federal da  
Paraíba como pré-requisito para obtenção  
do título de Farmacêutico.

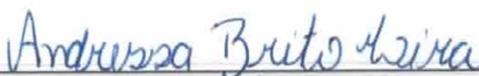
Aprovado em 23 de fevereiro de 2018.



\_\_\_\_\_  
Profa Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa  
Orientadora - UFPB



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães  
Examinador - UFPB



\_\_\_\_\_  
Ms. Andressa Brito Lira  
Examinadora - UFPB

João Pessoa – PB  
2018

## Resumo:

Desde a existência da humanidade os recursos do reino vegetal são de importância inegável para o desenvolvimento da sociedade. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, maior parte do mundo faz uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde. Diante disso grande é o interesse profissional e acadêmico na pesquisa com produtos naturais quanto a sua atividade farmacológica, toxicológica, sua caracterização química e botânica a fim de regulamentar suas exigências quanto à qualidade e eficácia e segurança para então alcançar ensaios clínicos e o desenvolvimento de drogas. Estudos revelam que óleos essenciais de *L. pedunculosa* apresenta atividade amebicida, repelente contra forma larvária de *Aedes Aegypti*, analgésica nos modelos de nocicepção química, bem como capacidade antiinflamatória. Em função de uma melhor aplicação e durabilidade dos óleos essenciais técnicas de encapsulamento forma sendo desenvolvidas, as vantagens oferecidas por processos de microencapsulação permite melhor eficiência de alguns compostos apolares. Assim como é de extrema importância à avaliação da ação biológica na triagem de estudo de um vegetal, são também os ensaios toxicológicos, que acrescenta informações para garantir devida segurança na sua aplicação. Ensaio *in silico* e *in vitro* foram realizados, foi avaliada a citotoxicidade em eritrócitos humanos, investigado o perfil oxidante e a propriedade antioxidante na presença de espécies reativas de oxigênio e de agente oxidante, e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica. OELP atendeu aos requisitos preconizados pela —Regra dos cinco de Lipinski, apresentando na abordagem *in silico*, nos testes *in vitro* apresentou forte atividade hemolítica e limitada atividade antihemolítica. OELP-ME induziu baixa hemólise e protegeu os eritrócitos na presença de solução hipotônica (NaCl 0,24 %). O OELP assim como o OELP-ME não induziu oxidação da hemoglobina, porém, não apresentou efeito antioxidante na presença de fenilhidrazina. Entretanto apenas o OELP-ME apresentou efeito antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio. Quanto à atividade antimicrobiana apenas o OELP mostrou-se efetivamente ativo contra microorganismos com comprovado efeito bacteriostático.

**Palavra chave:** *Lippia pedunculosa*, óleo microencapsulado, *in silico*, citotoxicidade, hemólise, antimicrobiano

## **Abstract:**

Since the existence of humanity the resources of the vegetable kingdom are of undeniable importance for the development of society. Modern, well-developed medicine, most of the world's use of medicinal plants in primary health care. Faced with this great and professional and academic interest in researching with natural products as to their pharmacological, toxicological activity, their chemical and botanical characterization in order to regulate their demands regarding the quality efficacy and safety to then reach clinical trials and development of drugs. Studies show that essential oils of *L. pedunculosa* present amebicidal activities, repellent against larval form of *Ae. Aegypti*, analgesic in the models of chemical nociception, as well as anti-inflammatory capacity. Due to better application and durability of the essential oils form and developed encapsulation techniques, as advantages offered by microencapsulation processes allow better efficiency of some nonpolar countries. Just as it is extremely important to evaluate the biological action in the screening of a vegetable, it is also the toxic tests, which adds information to ensure proper safety in its application. In silico and in vitro assays, the cytotoxicity in human erythrocytes was investigated, investigating the oxidant profile and antioxidant properties in the presence of reactive oxygen species and oxidizing agent, and determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against Gram-positive bacterial strains and Gram-negative diseases of clinical importance. OELP met the requirements recommended by -Law of the five of Lipinski, presenting in the in silico approach, in the in vitro tests showed strong hemolytic activity and limited antihemolytic activity. OELP-ME induced low hemolysis and protected erythrocytes in the presence of hypotonic solution (NaCl 0.24%). OELP as well as OELP-ME did not induce hemoglobin oxidation, however, it did not present an antioxidant effect in the presence of phenylhydrazine. However, OELP-ME presented an antioxidant effect against hydrogen peroxide. As for the antimicrobial activity, only OELP has been shown to be effectively active against microorganisms with a proven bacteriostatic effect.

**Keywords:** *Lippia pedunculosa*, microencapsulated oil, in silico, cytotoxicity, hemolysis, antimicrobial

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Lippia pedunculosa</i> .....	21
Figura 2 – Terpenos e fenilpropanóides comuns em óleos essenciais.....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades moleculares do Monoterpenos rotundifolona e (R)-limoneno, calculadas no software Molinspiration.....	39
<b>Tabela 2:</b> Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para rotundifolona (piperitenona óxida), R-(+)-Limoneno.....	40
<b>Tabela 3:</b> Algumas das prováveis atividades farmacológicas calculadas no software Molinspiration, para o OELP contendo seu marcadores rotundifolona (piperitenona óxida) e R-(+)-Limoneno.....	40
<b>Tabela 4:</b> Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para rotundifolona.....	41
<b>Tabela 5:</b> Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para R-(+)-Limoneno.....	43
<b>Tabela 6 -</b> Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos.....	46
<b>Tabela 7-</b> Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP-ME em eritrócitos humanos.....	48
<b>Tabela 8-</b> Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	52
<b>Tabela 9-</b> Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	55
<b>Tabela 10.</b> Atividade antibacteriana do OELP frente a linhagens Gram-positivas e Gram-negativas.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo A induzida pelo OELP.....	44
<b>Gráfico 2.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo B induzida pelo OELP. .....	45
<b>Gráfico 3.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo O induzida pelo OELP.....	45
<b>Gráfico 4.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo AB induzida pelo OELP.....	46
<b>Gráfico 5.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo A induzida pelo OELP-ME.....	47
<b>Gráfico 6.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo B induzida pelo OELP-ME.....	47
<b>Gráfico 7.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo O induzida pelo OELP-ME.....	48
<b>Gráfico 8.</b> Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo AB induzida pelo OELP-ME.....	48
<b>Gráfico 9.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo A, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	50
<b>Gráfico 10.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo B, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	50
<b>Gráfico 11.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo O, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	51
<b>Gráfico 12.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo O, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	51
<b>Gráfico 13.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo A, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	53
<b>Gráfico 14.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo B, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	53
<b>Gráfico 15.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo A, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	54

<b>Gráfico 16.</b> Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo A, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%).....	54
<b>Gráfico 17:</b> Efeito oxidante do OELP em eritrócitos humanos.....	56
<b>Gráfico 18:</b> Efeito antioxidante do OELP em eritrócitos humanos.....	57
<b>Gráfico 19:</b> Efeito oxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos.....	58
<b>Gráfico 20:</b> Efeito antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos.....	59
<b>Gráfico 21:</b> Atividade antioxidante do OELP frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo O.....	60
<b>Gráfico 22:</b> Atividade antioxidante do OELP-ME frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo O.....	61

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADME – Absorção, distribuição, metabolização e excreção  
ADME/T – Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade  
ATCC – American Type Culture Collection  
BBB - blood-brain barrier  
BHI - Brain Heart Infusion  
Caco-2 - células de carcinoma do cólon humano  
CBM – Concentração Bactericida Mínima  
CCS – Centro de Ciências da Saúde  
CCT – Coleção de Culturas Tropicais  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CYP - Citocromo P  
DL<sub>50</sub> – Dose Letal mediana  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
e.p.m. – Erro padrão da media  
EI - inibidores enzimáticos  
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio  
EUA - Estados Unidos da América  
FDA - Food and Drug Administration  
GPCR - receptores acoplados a proteína G  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
Hb - Hemoglobina  
HERG - gene codificador de canais de potássio  
HIA - absorção intestinal  
I - Inibidor  
ICM - Moduladores de Canais Iônicos  
IF - Inibidor Fraco  
KI - inibidores de quinase  
LABETOX-Laboratório de Ensaios Toxicológicos  
LANEF/UFS - Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológico

LPS - Lipopolissacarídeos  
MD - Dinâmica Molecular  
MetHb – Metahemoglobina  
milog P- Coeficiente de partição octanol-água  
MM - Massa Molecular  
NaCl – Cloreto de sódio  
nALH - número de grupos aceptores de ligação hidrogênio  
NC - Não Carcinogênico  
nDLH - número de grupos doadores de ligação hidrogênio  
NI - Não inibidor  
NRL - ligandos de receptores nucleares  
NRs - receptores nucleares  
NS - Não substrato  
NT - Não tóxico  
OCT - transportador de cátions orgânico  
OELP - óleos essenciais das folhas de *Lippia pedunculosa*  
OELP-ME - Óleo essencial de *Lippia pedunculosa* L. microencapsulada  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBS – Tampão fosfato salino 20  
PD - farmacodinâmica  
P-gp - Glicoproteína-P  
Ph - Fenilhidrazina  
PI - Inibidores de protease  
PK - Farmacocinética  
QSAR - Quantitativa da relação estrutura-atividade  
r.p.m. – Rotações por minuto  
ROO - Radicais peróxil  
ROS - Espécies reativas de oxigênio

ROS – Reactive Oxygen species

S - Substrato

s.d. – Desvio padrão

SAR – Relação Estrutura Atividade

SARs - relações estrutura-atividade

SINITOX- Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNC - Sistema Nervoso Central

T - Tóxico

TPSA – área superficial polar topológica

UBS - Unidades Básica de Saúde

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

Resumo.....	4
Abstract.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE GRÁFICOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Produtos naturais, saúde e ciência.....	18
2.2 Espécie Botânica.....	19
2.2.1 <i>Lippia</i> .....	19
2.2.2 <i>Lippia pedunculosa</i> .....	20
2.3 Óleos essenciais.....	22
2.4 Óleos essenciais microencapsulado.....	23
2.5 Avaliações toxicológicas.....	24
2.5.1 Ensaio in silico.....	25
2.5.2 Citotoxicidade.....	27
2.6 Estresse oxidativo e o potencial antioxidante.....	28
2.7 Atividade Antimicrobiana.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Local da Pesquisa.....	31
4.2 Material.....	31
4.2.1 <i>Lippia pedunculosa</i> L.....	32
4.2.2 Eritrócitos humanos.....	32
4.2.3 Espécies bacterianas.....	32
4.2.4 Meio de Cultura.....	33
4.2.5 Preparação do inóculo bacteriano.....	33

<b>4.3 Métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1 Ensaios <i>in silico</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1.1 Molinspiration.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1.2 AdmetSAR.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2 Ensaios de citotoxicidade.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2.1 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.3 Ensaios de atividade oxidante e antioxidante.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.3.1. Avaliação do potencial oxidante e antioxidante de <i>Lippia pedunculosa</i> em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.3.2. Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.4 Atividade antibacteriana.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Análise estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Ensaios <i>in silico</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.1. Molinspiration.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.2 AdmetSAR.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Ensaios de citotoxicidade.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.1 Avaliação do potencial hemolítico do OELP em eritrócitos humanos.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.2 Avaliação do potencial hemolítico do OELP-ME em eritrócitos humanos.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.3 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao OELP.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.4 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao OELP-ME.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Ensaios de atividade oxidante e antioxidante.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do OELP em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....</b>	<b>55</b>

<b>5.3.2 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....</b>	<b>57</b>
<b>5.3.3 Avaliação do potencial antioxidante do OELP em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.4 Avaliação do potencial antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.....</b>	<b>60</b>
<b>5.4 Atividade antibacteriana.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>61</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>8.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO 1- Certidão do Comitê de ética em Pesquisa (CEP).....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a existência da humanidade o reino vegetal é de importância inegável para o desenvolvimento da sociedade. Conhecimentos foram sendo adquiridos e as plantas passaram a ter bastante relevância para nutrição e saúde do homem (DIAS et al., 2017). A necessidade por parte do ramo farmacêutico na descoberta de novos fármacos eficazes para diversas doenças aumenta dia após dia, o reino vegetal nesse ponto torna-se “fonte” por conter plantas com atividades farmacológicas variadas, potentes e eficazes ressaltando dessa forma a importância do estudo das plantas medicinais (OMBITO, et al., 2014).

O Gênero *Lippia* pertence à família *Verbenaceae* é um tipo de arbusto, erva ou árvore de pequeno porte (STASHENKO, et al., 2013). É usado na medicina popular por apresentar atividades analgésicas, antiinflamatórios e antipiréticos, antimicrobiano, antibacteriano, antifúngico, antioxidante, larvicida e atividades inseticidas (STASHENKO, et al., 2013; OMBITO, et al., 2014).

Estudos revelam que óleos essenciais de *Lippia pedunculosa* apresentam atividade amebicida (DE AMORIM SANTOS, et al., 2016), atividade repelente contra forma larvária de *A. aegypti* (NASCIMENTO, et al., 2016), atividade antinociceptiva (BRAGA, R. M., 2016), entre outras.

Em função de uma melhor aplicação e durabilidade dos óleos essenciais técnicas de encapsulamento são desenvolvidas a fim de obter mudanças positivas em suas propriedades. Tal metodologia conferiu aos óleos a capacidade de dissolução em meio aquoso, proteção contra oxidação proveniente do calor, luz, umidade, contato com outras substâncias. Além de permitir a formação de partículas com vários tamanhos, espessura e permeabilidade do invólucro, auxiliam no ajuste da taxa de liberação do princípio ativo (MARTINS et al., 2014).

Assim como é de extrema importância a avaliação da ação biológica na triagem de estudo de um vegetal, são também os ensaios toxicológicos, que acrescentam informações para garantir a devida segurança

na sua aplicação. Os experimentos toxicológicos têm por objetivo pré-dizer os níveis de ingestão das substâncias e os possíveis efeitos colaterais, que podem aparecer no homem após sua administração (MOURA et al., 2012).

A inserção de um novo medicamento no mercado pode ser demorada e dispendiosa até que se prove sua eficácia e segurança. O desenvolvimento de abordagens *in silico* otimiza o tempo e os gastos necessários para trazer um medicamento para o mercado. Tornando os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) previsíveis, resultando em um processo rápido de descoberta de medicamentos (WANG, et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

A citotoxicidade em eritrócitos é um dos modelos experimentais da toxicidade *in vitro* usado como método de triagem (screening) para toxicidade de substâncias, permitindo estimar o nível de dano que pode ser induzido *in vivo* (Ansira et al., 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o maquinário de defesa antioxidante, gerando moléculas reativas derivadas do oxigênio, sua reatividade está correlacionado com mais de 100 doenças, como fonte ou resultado (LUSHCHAK, 2014; KIM et al., 2015; HE & ZUO, 2015).

Devido à capacidade de transporte de oxigênio dos eritrócitos, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, metais de transição e moléculas de hemoglobina redox ativa (Hb) os eritrócitos têm sido utilizado em metodologias de toxicidade *in vitro* como modelo simples para avaliar os efeitos de compostos que geram ROS (ANSARI et al., 2015; DEEBA et al., 2017) .

A descoberta de medicamentos antimicrobianos é difícil, devido à penetração fraca de compostos em células bacterianas. No entanto, produtos naturais evoluíram para romper as barreiras de penetração das bactérias alvo, e a maioria dos antibacterianos introduzidos na clínica foram desenvolvidos inicialmente a partir de metodologias *in vitro* (BALOUIRI et al., 2016; LING et al., 2017). Este trabalho pretende avaliar a toxicidade *in silico* e as atividades hemolíticas, antioxidante e antibacteriana do óleo essencial de *L. pedunculosa in vitro*.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Produtos naturais, saúde e ciência**

Desde a existência da humanidade os recursos do reino vegetal são de importância inegável para o desenvolvimento da sociedade. Com o passar do tempo através de tentativas e erros, conhecimentos foram sendo adquiridos e as plantas passaram a ter bastante relevância para nutrição e saúde do homem (DIAS et al., 2017).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, nos países em desenvolvimento 80% da população utilizam práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS. Além disso, cerca de 1/3 dos medicamentos prescritos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (THOMPSON e PASCALICCHIO, 2012).

A popularidade dos produtos de origem vegetal se dissemina na sociedade decorrente a cultura e os relatos sobre respostas positivas frente à doença com baixa ocorrência de efeitos colaterais negativos e, portanto, passam a ser reconhecidos quanto a sua eficácia. (DE CARVALHO et al., 2013). Em contraproposta o custo dos medicamentos industrializados, as dificuldades da população em receber assistência médica e a tendência de uso de produtos de origem natural têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal (ROSSATO et al., 2012).

Diante disso grande é o interesse profissional e acadêmico na pesquisa com produtos naturais quanto a sua atividade farmacológica, toxicológica, sua caracterização química e botânica a fim de regulamentar suas exigências quanto à qualidade eficácia e segurança para então alcançar ensaios clínicos e o desenvolvimento de drogas (PENNAFORT et al., 2012).

Tais resultados científicos podem estar diretamente relacionado com a aplicação de fitoterápicos na saúde básica, pois é desses estudos que podem sair às informações necessárias ao conhecimento por parte dos profissionais de saúde que atuam diretamente com os pacientes nas Unidades

Básica de Saúde - UBS, em relação às propriedades terapêuticas das plantas que são usadas por essa população. Conhecimentos técnicos, que vão desde o preparo para fins terapêuticos, indicações, cuidados e dosagem (RIBEIRO BRUNING et al., 2012).

A necessidade por parte do ramo farmacêutico na descoberta de novos fármacos eficazes para as mais diversas doenças aumenta dia após dia, o reino vegetal nesse ponto torna-se “fonte” por conter plantas com atividades farmacológicas variadas, potentes e eficazes para atender aos requisitos de terapias, ressaltando dessa forma a importância do estudo das plantas medicinais (OMBITO, et al., 2014).

## **2.2. Espécie Botânica**

### **2.2.1 *Lippia***

O Gênero *Lippia* pertence à família *Verbenaceae* é um tipo de arbusto, erva ou árvore de pequeno porte. É assim nomeado devido seu descobridor o historiador e viajante francês, Augustin Lippi (1678-1701) (STASHENKO, et al., 2013). O gênero é constituído por aproximadamente 250 espécies distribuídos por toda a África tropical, América Central e do Sul (figura 1), onde os principais centros de diversidades específicas estão localizados no México e Brasil, sendo este último estimado hospedar 70-75% das espécies conhecidas de forma que, aproximadamente, 120 espécies estão distribuídas no cerrado e caatinga (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013; OMBITO, et al., 2014).

Em estudos realizados a partir dos óleos essenciais (voláteis) obtidos do gênero *Lippia* foram elucidados os perfis de metabolitos secundários encontrados, como os terpenos (alguns sesquiterpenos, di- e triterpenos), fenóis, fenilpropanóides, glicósidos iridóides, naftoquinonas, esteroides e flavonoides, sendo este último um dos grupos fenólicos de maior abundância, todos com histórico de propriedades medicinais. Podendo ainda está presente

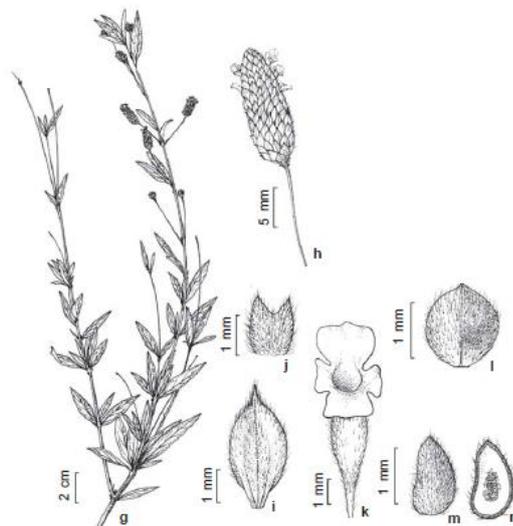
sob a forma de glicósidos, nos quais o composto está ligado a uma ou mais porções de açúcar. (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013; STASHENKO, et al., 2013; OMBITO, et al., 2014).

Devido *Lippia* ser fonte de óleos essenciais e extratos com várias propriedades distintas, desperta sobre está o interesse econômico no ramo alimentício, indústria de cosméticos e perfumaria, e indústria farmacêutica, sendo este último de maior interesse, uma vez que, seu uso é mais comum na medicina popular como terapia alternativa para queixas gastrointestinais (disenteria e diarreia, dores estomacais) e queixas respiratórias (infecções pulmonares, tosse, asma, resfriado), apresentando atividades como analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas, antimicrobiano, antibacteriano, antifúngico, antioxidante, larvicida e atividades insecticidas, entre outras (STASHENKO, et al., 2013; OMBITO, et al., 2014).

### **2.2.2 *Lippia pedunculosa***

*Lippia pedunculosa* é uma espécie herbácea rara subarborescente de 0,7 a 1,5 m de altura. Segundo GIULIETTI et al. 2009 espécies raras ocorrem no Brasil, em média, a cada 3.730 km<sup>2</sup>. A família *Verbenaceae* é albergada no Brasil nas regiões Sudeste (SP) e nordeste (AL e SE). Na região nordeste *L. pedunculosa* distribui-se na caatinga, ambiente seco, de solo areno-argiloso ou pedregoso (SANTOS, et al., 2009; SILVA, et al., 2013; SANTOS, 2014).

Esta espécie é facilmente reconhecida por suas folhas concolores, limbo laceolado, pecíolo pubescente, inflorescências com pedúnculo maior que 3 cm, cálice viloso e corola lilás de tubo alvo. Distingue-se das demais por apresentar longas e solitárias inflorescências espiciformes com até 1,8 cm de comprimento, associadas a pedúnculos de até 7,3 cm comprimento (Figura 1). Floresce e frutifica entre os meses de abril e setembro (SANTOS, et al., 2009).



**Figura 1:** *Lippia pedunculosa* – g. aspecto geral do ramo; h. inflorescência; i. bráctea; j. cálice; k. corola; l. aspecto geral do fruto; m. parte externa do fruto; n. parte interna do fruto (SANTOS, et al., 2009).

Monoterpenos rotundifolona (71,7%), (R)-limoneno (21,8%) e a piperitenona (1,2%) foram revelados como componentes majoritários nos óleos essenciais das folhas de *Lippia pedunculosa* (OELP) por Cromatografia Gasosa e identificado por análise espectrométrica, a importância dessa identificação está ligada a suas propriedades farmacológicas como descrito por SANTOS, et al., 2014 referente a sua eficácia tripanocida contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, contra macrófagos infectados por *T. cruzi* diminuindo moderadamente sua percentagem e o número de parasitas intracelulares em concentrações não tóxicas para os macrófagos (MENEZES, et al., 2014).

Estudos revelam que óleos essenciais de *L. pedunculosa* apresentam atividade amebicida contra ameba de vida livre, mais uma vez atribuída a rotundifolona e limoneno como responsáveis por interagir com componentes ativos da parede celular do parasita ou por mecanismo de penetração através de canais presentes na membrana do mesmo, levando a sua morte. Óleos essenciais de *L. pedunculosa* são, portanto, potenciais candidatos à produção de fármacos para a prevenção ou tratamento de infecções por *Acanthamoeba* (DE AMORIM SANTOS, et al., 2016).

Piperitenona um dos principais constituintes químicos presente em óleo de *L. pedunculosa* mostrou ser um eficaz repelente de mosquitos adultos e apresentou atividade contra forma larvária de *A. aegypti* o principal vetor de dengue, chikungunya e zika no Brasil (NASCIMENTO, et al., 2016).

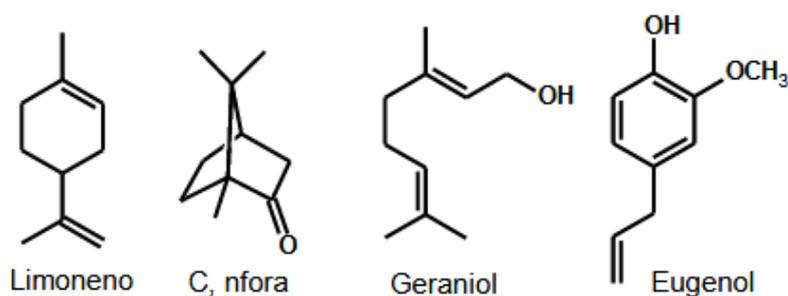
Em estudos mais recentes com OELP observou-se analgesia nos modelos de nocicepção química (atividade antinociceptiva) comprovada através dos testes das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina, no entanto, nos modelos de nocicepção térmica analisados por testes em placa quente não foi constatado essa mesma atividade antinociceptiva. *L. pedunculosa* mostra também capacidade anti-inflamatória ao induzir a diminuição de leucócitos que migram para cavidade peritoneal no modelo da peritonite induzida por carragenina (BRAGA, R. M., 2016).

### **2.3 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais também denominados óleos voláteis, óleos etéreos ou essências são misturas voláteis, lipofílicas, odorífera e líquidas extraídas de plantas aromáticas. Óleos essenciais podem ser definidos em concordância as metodologias de extração que lhe são específicas como “produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d’água”, bem como “produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos”, por exemplo, a laranjeira, o limoeiro, a tangerineira ou a toranjeira (FIGUEIREDO, et al., 2014).

Os óleos essenciais são produzidos por plantas da classe dicotiledôneas principalmente nas famílias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Liperaceae, Rutaceae, entre outras, sendo constituídos por metabólitos terpenoides (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanoides que conferem suas características organolépticas, que por aliarem o seu perfume às propriedades antimicrobianas e antioxidantes, junto às características de produto biodegradável e de baixa toxicidade para os mamíferos, despertaram o interesse das indústrias cosméticas, farmacêutica e alimentícia (DE ANDRADE, et al., 2014; FIGUEIREDO, et al., 2014).

Terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais oriundas da via metabólica do ácido mevalônico, nos óleos essenciais são encontrados predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos. São hidrocarbonetos que possuem em seu esqueleto carbônico múltiplos de cinco átomos de carbono: 10 átomos de carbono (monoterpenos), 15 átomos de carbono (sesquiterpenos), a volatilidade dos terpenos está associada ao tamanho da cadeia carbônica, concluindo-se que monoterpenos são muito voláteis, os sesquiterpenos apresentam média volatilidade. Já os fenilpropanóides também referidos como fenólicos, são geralmente derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, sintetizados através via bissintética do ácido chiquímico, possuem como característica molecular um anel fenil ligado a uma cadeia lateral com três átomos de carbono. Alguns exemplos de terpenos e fenilpropanóides na figura 2 (ALMEIDA, et al., 2015; JESUS, et al., 2016).



**Figura 2:** Terpenos e fenilpropanóides comuns em óleos essenciais (ALMEIDA, et al. 2015).

Além de odores agradáveis provenientes dos óleos essenciais que os fazem indispensáveis nas indústrias de perfumaria e de cosmética, apresentam valiosas propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antimicrobiana, inseticida, analgésica e antiinflamatória. Sendo a atividade antimicrobiana que compreende maior número de estudos na pesquisa científica, especialmente referente ao controle de fungos causadores de doenças em plantas (Almeida, et al., 2015).

## 2.4 Óleos essenciais microencapsulado

Em função de uma melhor aplicação e durabilidade dos óleos

essenciais técnicas de encapsulamento vêm sendo desenvolvidas desde a década de 30 a fim de obter mudanças positivas em suas propriedades. Tal metodologia conferiu aos óleos a capacidade de dissolução em meio aquoso, proteção contra oxidação proveniente do calor, luz, umidade, contato com outras substâncias. Além disso, permite gerar partículas com vários tamanhos, espessura e permeabilidade do invólucro, auxiliam no ajuste da taxa de liberação do princípio ativo (MARTINS et al., 2014).

A microencapsulação trata-se de um método no qual um material seja ele, líquido, sólido ou gás é revestido e aprisionado no núcleo de um invólucro, que por sua vez irá conferir propriedades exclusivas para sua resistência e liberação controlada. Este artifício ocorre através de técnicas como a coacervação complexa, gelação externa / interna ionotrópica, inclusão molecular, extrusão, liofilização, resfriamento (DIMA et al., 2014; MARTINS et al., 2014; XIAO et al., 2014)

As microesferas são partículas minúsculas de 1 a 1000 nm e diferem quanto a sua morfologia umas são mais frágeis, ou mais robustas a depender muito do polímero invólucro usado, diferindo também nas características da liberação do ativo envolvido, podendo ser por ação mecânica, dissolução, difusão, variação do pH e biodegradação (MARTINS et al., 2014; DIMA, et al., 2014).

Segundo MARTINS et al. 2014 muitas são as possibilidades de utilizar a microencapsulação como uma técnica para obter produtos com alto valor agregado. O setor com maior nível de aplicação é o de medicamentos (68%), seguido dos alimentos (13%) e cosméticos (8%) (MARTINS et al., 2014).

As vantagens oferecidas por processos de microencapsulação permite melhor eficiência de alguns compostos apolares, desperta o interesse da pesquisa voltada à descoberta de novas formulações para produtos naturais amplamente utilizados pelo homem (DIMA, et al., 2014; MARTINS, et al., 2014; XIAO et al., 2014)

## **2.5 Avaliações toxicológicas**

A terminologia dada como produto 'natural' cria uma crença de naturalidade inócua, o que acaba por contribuir para popularidade de uso sem que ocorra certa preocupação quanto aos riscos associados à utilização exacerbada (SILVA, 2016). Já dizia Paracelso (1493- 1541) *“Todas as substâncias são venenos; não existe uma que não seja veneno. A dose certa diferencia um veneno de um remédio”*.

A ausência de informações sobre as características das plantas medicinais (principalmente das exóticas), seu uso simultâneo com os medicamentos tradicionais (alopáticos) sem informar ao médico e, finalmente, a falta de entendimento dos efeitos farmacológicos e toxicológicos das plantas, são aspectos críticos da automedicação podendo causar efeitos sinérgicos e interações não esperadas pelo médico (SILVA, 2016; NUNES, 2017).

Portanto, assim como é de extrema importância à avaliação da ação biológica na triagem de estudo de um vegetal, são também os ensaios toxicológicos, que acrescentam informações para garantir a devida segurança na sua aplicação. Os experimentos toxicológicos têm por objetivo pré-dizer os níveis de ingestão das substâncias e os possíveis efeitos colaterais, que podem aparecer no homem após sua administração. Por este motivo, que tais estudos são indispensáveis nos processos investigativos (MOURA et al., 2012).

### **2.5.1 Ensaio in silico**

A modelagem quantitativa da relação estrutura-atividade (QSAR) é um campo computacional que permite o rastreamento eficiente de um grande número de atividades farmacológicas através de uma associação da simulação da dinâmica molecular (MD), farmacóforos tridimensionais e aptidão computacional (CHERKASOV et al., 2014; RAKERS et al., 2016).

A prática da modelagem QSAR ficou marcada com a publicação de Corwin Hansch em 1962 seu artigo representou o ponto crucial de uma luta de 15 anos para desvendar a base das relações estrutura-atividade (SARs)

desde então melhorias contínuas, avanços interdisciplinares foram tornando o QSAR uma abordagem bem-sucedida e comumente empregada para modelar as propriedades físicas e biológicas dos produtos químicos em uso nesta era (CHERKASOV et al., 2014).

A procura por descobertas de novas estruturas biológicas ativas e o impacto que as mesmas podem trazer a saúde humana faz da modelagem uma técnica bem empregada na academia, indústria e instituições governamentais em todo o mundo, culminando na crescente especialização por parte da ciência médica e produção de ferramentas e bancos de dados (CHERKASOV et al., 2014; DIRAR et al., 2016).

A inserção de um novo medicamento no mercado pode ser demorada e dispendiosa até que se prove sua eficácia e segurança, para tanto modelos animais são usados para comprovar propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e toxicidades (T) ou efeitos secundários adversos. Os métodos de avaliação atuais para as propriedades ADME / T são dispendiosos e demorados, e muitas vezes requerem uma grande quantidade de testes em animais, o que muitas vezes é inadequado ao gerenciar um grande lote de produtos químicos (WANG, et al., 2015).

O desenvolvimento de abordagens *in silico* otimiza o tempo e os gastos necessários para trazer um medicamento para o mercado. Tornando os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) previsíveis, resultando em um processo rápido de descoberta de medicamentos. Estes parâmetros farmacocinéticos são confiavelmente avaliados pelo Admet-SAR (WANG, et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

Ferramentas para estudos *in silico* como o Molinspiration, podem dizer sobre sua ligação a receptores acoplados a proteína G (GPCR), moduladores de canais iônicos (ICM), inibidores de quinase (KI), ligandos de receptores nucleares (NRL), inibidores de protease (PI) e inibidores enzimáticos (EI), assim como classifica as propriedades moleculares e a semelhança do fármaco com base na —Regra dos Cincoll de Lipinski, a qual estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral, sendo eles: peso molecular  $\leq 500$  daltons (Da),

coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP)  $\leq 5$ ; número de aceptores de ligação de hidrogênio (nALH)  $\leq 10$  e número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH)  $\leq 5$  (PARAMASHIVAM et al., 2015; MOHAMED, et al. 2017).

A bioinformática e quimioinformática têm se tornando cada vez mais necessárias para a exploração do potencial farmacológico das substâncias, através da seleção de alvos de ancoragem, por exemplo, para identificar relações entre as ações reveladas nos alvos e os efeitos terapêuticos (LAGUNIN et al., 2014).

Os modelos *in silico* são utilizados como um procedimento de triagem (screening), investigando o efeito de um fármaco / estímulo em células / tecidos, norteando a investigação experimental e os estudos clínicos, no entanto são dados teóricos até serem validados. Os modelos *in silico* são úteis, mas não possuem as características biofísicas humanas (UD-DIN, BAYAT, 2017).

### **2.5.2 Citotoxicidade**

Os eritrócitos, também conhecidos por hemácias ou glóbulos vermelhos são células com bicamada lipídica de forma discoidal bicôncava. A membrana dos eritrócitos apresenta uma constituição diferenciada que produz elasticidade, esta característica juntamente ao fato de não possuírem núcleo e organelas permite que os eritrócitos se deformem reversivelmente para suportar as condições a qual são submetidas ao passar por microvasos (PAGANO AND FAGGIO, 2015).

Os eritrócitos são as células mais abundantes no sistema circulatório, regem o bom funcionamento do organismo orquestrando de forma direta ou indireta, vários outros sistemas. O transporte de oxigênio e nutrientes aos diferentes tecidos do organismo, o funcionamento adequado do sistema imune pelo transporte de células e anticorpos para o combate às infecções, a circulação de mensageiros químicos e proteínas no processo de equilíbrio hidroeletrólítico, até mesmo os próprios medicamentos dependem da

integridade dos glóbulos vermelhos na circulação. Danos nestas células são, portanto, uma ameaça em potencial à vida (MAĆCZAK et al., 2016).

A hemoglobina é a principal proteína presente no citosol dos glóbulos vermelhos, está é responsável por conferi à capacidade de transportar oxigênio e dióxido de carbono para os tecidos. A lise osmótica libera a hemoglobina contida nos eritrócitos e a concentração desta proteína no espaço extracelular é diretamente proporcional ao número de células que passaram por lise (PAGANO AND FAGGIO, 2015).

A citotoxicidade em eritrócitos é um dos modelos experimentais da toxicidade *in vitro* que mais se destaca na pesquisa, sendo usada como método de triagem (screening) para toxicidade de substâncias, permitindo estimar o nível de dano que pode ser induzido *in vivo* (Ansari et al., 2015).

## **2.6 Estresse oxidativo e o potencial antioxidante**

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o maquinário de defesa antioxidante. ROS são moléculas derivadas do oxigênio que apresentam elétrons desemparelhados na última camada de valência, conferindo sua reatividade (LUSHCHAK, 2014; KIM et al., 2015; HE & ZUO, 2015).

A formação de ROS se dá pela redução do oxigênio molecular em radical anion superóxido ( $O_2^-$ ), seguido da redução de um elétron com aceitação concomitante de dois prótons formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A molécula de peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e é dividida em radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ) e anion hidroxila ( $OH^-$ ). Por fim,  $HO^\cdot$  reage com mais um elétron e um próton, formando molécula de água.  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^\cdot$  coletivamente são chamadas de espécies reativas de oxigênio (LUSHCHAK, 2014).

O estresse oxidativo está correlacionado com mais de 100 doenças, como fonte ou resultado. A produção excessiva de ROS provoca danos na membrana celular, em proteínas e DNA, acelerando o envelhecimento e estimulando o desenvolvimento de doenças crônicas como

as neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica) enfisema, doenças cardiovasculares e inflamatórias, cataratas e câncer (HE & ZUO, 2015; PINGITORE et al., 2015; PISOSCHI, 2015).

Diante dos danos que espécies reativas de oxigênio podem desenvolver no organismo, a fisiologia humana possui sua própria “defesa” os antioxidantes biológicos, a exemplo superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase e outros antioxidantes não enzimáticos (por exemplo, vitamina C, vitamina E, caroteno, bilirrubina, etc.) que mantêm ROS nos níveis basais (PINGITORE et al., 2015; PISOSCHI, 2015).

Os antioxidantes são moléculas capazes de equilibrar a quantidade de ROS presente no corpo por retardo ou inibição da oxidação de outras moléculas, evitando assim o estresse oxidativo e os efeitos negativos produzidos por ROS. No entanto, a capacidade do sistema de defesa contra ROS pode ser superada, levando à ocorrência de doenças (PISOSCHI, 2015).

Diante dessa problemática, pesquisadores investigam antioxidantes exógenos que melhore a defesa do organismo para conter o estresse oxidativo, utilizando de metodologias *in vitro* ou *in vivo* (PINGITORE et al., 2015; PISOSCHI, 2015).

Devido à capacidade de transporte de oxigênio dos eritrócitos, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, metais de transição e moléculas de hemoglobina redox ativa (Hb) os eritrócitos têm sido utilizado em metodologias de toxicidade *in vitro* como um modelo simples para estudar os efeitos celulares de vários compostos, especialmente aqueles que geram ROS (ANSARI et al., 2015; DEEBA et al., 2017).

## **2.7 Atividade Antimicrobiana**

Bactérias são microorganismos unicelulares que compõe a microbiota humana, quando em grandes concentrações, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e de sua virulência são patogênicos

causando infecções cada vez mais difíceis de serem tratadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As bactérias são envoltas por uma parede celular que depende de sua constituição diferenciam-nas em Gram-positiva e Gram-negativa. As bactérias Gram-positivas possuem uma parede constituída de muitas camadas de peptidoglicana, ácidos teicoicos, e fosfato formando uma estrutura espessa e rígida. As Gram-negativas contem apenas uma fina camada de peptidoglicana, no entanto uma membrana externa constituída de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolípidos conferem as bactérias desse grupo maior resistência a agressões (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As bactérias Gram-negativas apresentam resistência de alto nível à maioria das classes de antibióticos, devido à expulsão rápida das moléculas que entram na célula por bombas de efluxo e / ou a impermeabilidade da membrana externa da bactéria. O risco crescente de resistência antimicrobiana entre bactérias gram-negativas é um problema mundial devido ao potencial de disseminação rápida de mecanismos de resistência e opções de tratamento limitadas, o que resulta na exigência de introdução constante de novos compostos (KAYE, POGUE, 2015; ZABAWA et al., 2016).

A descoberta de medicamentos antimicrobianos é difícil, devido à penetração fraca de compostos em células bacterianas. No entanto, produtos naturais evoluíram para romper as barreiras de penetração das bactérias alvo, e a maioria dos antibacterianos introduzidos na clínica foram desenvolvidos inicialmente a partir de metodologias *in vitro* (BALOUIRI et al., 2016; LING et al., 2015).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a toxicidade *in silico* e as atividades hemolíticas, antioxidante e antibacteriana do óleo essencial de *Lippia pedunculosa* L. *in vitro*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a toxicidade *in silico* dos constituintes majoritários de *L. pedunculosa*.
- Analisar sua atividade hemolítica em eritrócitos humanos oriundos de sangue dos tipos A, B, O e AB utilizando os modelos de hemólise e fragilidade osmótica eritrocitária.
- Investigar o perfil oxidante e a propriedade antioxidante na presença de espécies reativas de oxigênio e de agente oxidante.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica.
- Avaliar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- Comparar os resultados obtidos pelo óleo e óleo microencapsulado.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Local da Pesquisa**

Os ensaios ocorreram no Laboratório de Ensaio Toxicológicos II (*in vitro*) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

### **4.2 Material**

#### **4.2.1. *Lippia pedunculosa* L.**

Óleo essencial de *Lippia pedunculosa* L. (OELP) e Óleo essencial de *Lippia pedunculosa* L. microencapsulada (OELP-ME) foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior do Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológico (LANEF/UFS). A solubilização do produto teste foi realizada com o auxílio de água destilada para a forma ME e com dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% para o OELP.

#### **4.2.2 Eritrócitos humanos**

Os eritrócitos humanos (A, B, O e AB) foram obtidos de bolsas contendo concentrado de eritrócitos que não poderiam mais ser utilizadas para transfusão da Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade.

Para realização deste trabalho, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba, com o referido número de aprovação nº 1.658.669 (ANEXO 1).

#### **4.2.3 Espécies bacterianas**

Foram avaliadas tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas oriundas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT), American Type Culture Collection (ATCC) e de origem clínica, sendo elas:

- *Escherichia coli* ATCC 2536
- *Escherichia coli* ATCC 8539
- *Escherichia coli* ATCC 25619
- *Escherichia coli* 108
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25925
- *Staphylococcus aureus* 108

- *Staphylococcus aureus* 862

#### **4.2.4. Meio de Cultura**

As bactérias foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizadas em autoclave, a 121 °C por 15 minutos. Para a obtenção do meio de cultura sólido, adicionou-se ágar 1,5 %.

#### **4.2.5. Preparação do inóculo bacteriano**

Os micro-organismos foram inoculados em meio BHI e incubados a 37° C durante 24 h. Colônias foram suspensas em BHI e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo  $1-5 \times 10^8$  UFC/mL (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

### **4.3. Métodos**

#### **4.3.1 Ensaio *in silico***

##### **4.3.1.1 Molinspiration**

As propriedades moleculares foram calculadas, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software Molinspiration Online Property Calculation Toolkit ([www.molinspiration.com/](http://www.molinspiration.com/)). A investigação de Lipinski e colaboradores deu origem a chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofília, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio. A regra dos cinco de Lipinski estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade

oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área superficial polar topológica (TPSA) menor ou igual a 140 Å<sup>2</sup>. Moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

#### **4.3.1.2 AdmetSAR**

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se a substância possui as características essenciais para que possam ser considerados como possível fármaco e, dessa forma, evitar gastos desnecessários durante o processo de pesquisa & Desenvolvimento (AFONSO, 2008). Alguns parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta foi avaliada a metabolização utilizando algumas enzimas do citocromo P450, comparando se os compostos são substratos para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se são inibidores dos citocromos CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 e a promiscuidade de inibição dos citocromos.

#### **4.3.2 Ensaio de citotoxicidade**

##### **4.3.2.1 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos**

Uma parte de sangue humano foi misturado com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento repetiu-se por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi resuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. Foram adicionadas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000µg/mL da amostra em triplicata a 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e outra suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora a  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Decorrido este tempo as amostras passaram por centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Rangel *et al.*, 1997).

#### **4.3.2.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos**

Na avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos utilizou-se uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. As amostras em diferentes concentrações foram incubadas em tubos contendo 2 ml de uma suspensão de eritrócitos por 1h a  $22 \pm 2$  °C. Decorrido este tempo, as preparações passaram por centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então resuspenso em soluções hipotônicas de NaCl (0,24%) e agitados a 100 rpm, por uma hora a  $22 \pm 2$  °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Dacie, 2001).

#### **4.3.3 Ensaios de atividade oxidante e antioxidante**

##### **4.3.3.1. Avaliação do potencial oxidante e antioxidante de *Lippia***

### ***pedunculosa* em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina**

Para investigar o potencial oxidante foi preparada uma solução de eritrócitos a 30 % em PBS (11,35 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 24,36 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6. Em seguida, OELP e OELP-ME nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  foram adicionadas a 2 mL da solução de eritrócitos e incubados por um período de 1 hora sob agitação lenta e constante (100 rpm) a  $25 \pm 2$  °C. Decorrido o tempo preconizado, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 630 nm e 540 nm. A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (ARBOS et al., 2008).

Para investigar o potencial antioxidante, após o período de incubação de 1 hora referente à etapa descrita anteriormente, adicionou-se um 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina. As soluções foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a  $25 \pm 2$  °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 5,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 L) e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm.

Segundo Camargo et al., (2007), valores de metHb entre 1,9 e 2,0% são considerados normais enquanto que valores acima de 4%, elevados. A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a solução de ácido ascórbico 1000  $\mu\text{g/mL}$ , um comprovado agente antioxidante (ARBOS et al., 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em % de formação de metahemoglobina em função da hemoglobina - metHb (%Hb) - em comparação ao grupo controle positivo (Hb + Ph) (ARBOS et al., 2008).

#### **4.3.3.2. Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na**

## **presença de Espécies Reativas de Oxigênio**

O experimento foi realizado de acordo com o estudo de Bilton et al., (2012), com pequenas modificações, consistindo na incubação da substância nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL com 2 mL de uma solução de eritrócitos a 0,5% por 2h a  $25 \pm 2$  °C na presença de uma solução de peróxido de hidrogênio (40 mM). Foram utilizados os grupos controle negativo (solução de eritrócitos - 0 % de hemólise), controle positivo (solução de eritrócitos na presença da solução de peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 mM - 100 % de hemólise) e um padrão (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamina C 1000 µg/mL).

Decorrido 2h horas, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada fazendo-se a leitura de uma alíquota do sobrenadante por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em comparação ao controle positivo (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **4.3.4 Atividade antibacteriana**

#### **4.3.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação da CIM foi realizada por meio da técnica de microdiluição, utilizando-se placas de 96 poços e fundo em —Ull para cada uma das cepas testadas, conforme determinado por Gerhardt et al. (1994). Para isso, distribuiu-se 100 µL do meio BHI em todos os poços, exceto os da 1ª. linha que receberam 120 µL. Posteriormente, adicionou-se 80 µL da solução a 10 mg/mL de cada uma das amostras aos poços da 1ª. linha e a partir daí se deu a diluição seriada a metade, obtendo-se as concentrações finais de 400 µg/mL até 25 µg/mL. Por último, acrescentou-se 10 µL da suspensão de cada inóculo bacteriano (*E. coli* ATCC 2536, *E. coli* ATCC 8539, *E. coli* ATCC 25619, *E. coli* 108, *S. aureus* ATCC 25925, *S. aureus* 108, *S.*

*aureus* 862) nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se a uma cepa de micro-organismo, especificamente. Foi utilizado como controles o antimicrobiano Cloranfenicol e o veículo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior leitura, realizada com a adição de 20µL de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), um indicador colorimétrico de atividade metabólica.

Foi considerada como CIM para os produtos testados a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano quando comparado ao grupo controle, sendo verificado pela manutenção da cor azul da resazurina. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios.

#### **4.3.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para determinar se a atividade antibacteriana é bacteriostática ou bactericida, uma alíquota de 20 µL do poço que não apresentou crescimento foi plaqueada em meio BHI Ágar e em seguida incubada a 37 °C por 24h. A ocorrência de crescimento comprova o efeito bacteriostático e a ausência de crescimento evidencia o efeito bactericida do produto teste. A CBM foi considerada como a menor concentração do produto teste capaz de matar as linhagens (NOSTRO et al., 2004). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **4.4 Análise estatística**

O tipo de análise estatística será escolhida de acordo com cada metodologia acima descrita. Todos os resultados serão expressos como a média ± erro padrão da média (e.p.m), analisados com o software GraphPad® Prism 6.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio *in silico*

#### 5.1.1. Molinspiration

As propriedades moleculares dos componentes majoritários do óleo de *L. pedunculosa*, calculadas no software Molinspiration, são representadas na Tabela 1.

As substâncias majoritárias do OELP, rotundifolona (piperitenona óxida), R-(+)-Limoneno apresentaram boa biodisponibilidade teórica por via oral, uma vez que atendem aos requisitos preconizados pela — “Regra dos cinco” de Lipinski. No qual afirma que ao atender 3 dos 4 parâmetros (miLogP, MM, nALH e nDLH) provavelmente terá uma boa biodisponibilidade quando administrado por via oral.

**Tabela1:** Propriedades moleculares do Monoterpenos rotundifolona e (R)-limoneno, calculadas no software Molinspiration.

Substância	miLogP	MM	nALH	nDLH	nviolações	TPSA	nrotb
<b>Rotundifolona (piperitenona óxida)</b>	1.76	166.22	2	0	0	29.60	0
<b>R-(+)- Limoneno</b>	3.62	136.24	0	0	0	0.00	1

miLogP – coeficiente de partição octanol/água; MM- peso molecular nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; nviolações – número de violações; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis.

Possíveis atividades biológicas de rotundifolona (piperitenona óxida), R-(+)-Limoneno foram avaliadas. Rotundifolona mostrou considerável atividade biológica em ligante de receptor nuclear e inibidor de enzima, ao passo que nos demais receptores presume ser inativo. R-(+)-Limoneno aparenta ter moderada atividade ao interagir com o modulador de canal de íon, ligante de receptor nuclear e inibidor de enzima, frente aos demais receptores

presume ser inativo, como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para rotundifolona (piperitenona óxida), R-(+)-Limoneno.

<b>Substância</b>	<b>Ligante GPCR</b>	<b>Modulador de canal de íon</b>	<b>Inibidor de quinase</b>	<b>Ligante de receptor nuclear</b>	<b>Inibidor de protease</b>	<b>Inibidor de enzima</b>
<b>Rotundifolona (piperitenona óxida)</b>	-0.57	-0.59	-1.53	0.10	-0.64	0.12
<b>R-(+)-Limoneno</b>	-0.91	-0.27	-2.01	-0.34	-1.38	-0.21

Podemos observar na tabela 3 algumas das prováveis atividades terapêuticas produzidas por rotundifolona e R-(+)-Limoneno corroborando com as atividades descritas anteriormente e justificando a pesquisa quanto às atividades antioxidante e antibacteriana.

**Tabela 3:** Algumas das prováveis atividades farmacológicas calculadas no software Molinspiration, para o OELP contendo seu marcadores rotundifolona (piperitenona óxida) e R-(+)-Limoneno.

<b>Substância</b>	<b>Atividade</b>
<b>Rotundifolona</b>	Antibacterial
	Antiinflammatory
	Antinociceptive
	Antiparasitic
	Antiprotozoal
<b>R-(+)-Limoneno</b>	Antibacterial
	Antiinflammatory
	Antinociceptive
	Antioxidant
	Antiparasitic
	Antiprotozoal

### 5.1.2 AdmetSAR

As tabelas 4 e 5 a seguir abordam propriedades previstas para rotundifolona e R-(+)-limoneno referente à farmacocinética (ADME/Tox), tais como adsorção, distribuição, metabolismo e perfil de toxicidade.

Ao observar as propriedades de rotundifolona na tabela 4 podemos notar que a mesma apresenta a capacidade de sofrer absorção através da barreira hematoencefálica e do intestino humano, e é permeável ao Caco-2. Mostrou-se como um provável substrato da glicoproteína P e exerce atividade inibitória e não inibitória, sendo que a atividade não inibitória de glicoproteína P tem maior probabilidade, é também não inibidora do transporte renal de cátions orgânicos.

Metabolicamente rotundifolona é substrato apenas da CYP3A4, inibidora de CYP1A2 e não inibidora das demais CYP avaliadas, com baixa promiscuidade inibitória (Tabela 4).

Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que o composto avaliado é um fraco inibidor do gene codificador de canais de potássio (HERG), apresentou toxicidade pelo teste AMES, foi classificado como não carcinogênico, não biodegradável e a categoria de toxicidade oral aguda foi III, que inclui compostos com DL<sub>50</sub> de valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg (Tabela 4).

**Tabela 4:** Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para rotundifolona.

<b>Modelo</b>	<b>Rotundifolona</b>	<b>Probabilidade</b>
<b>Absorção</b>		
<b>Barreira Hematoencefálica</b>	BBB+	0.9004
<b>Absorção intestinal humana</b>	HIA+	1.0000
<b>Permeabilidade ao Caco-2</b>	Caco 2+	0.7055

<b>Substrato da glicoproteína P</b>	S	0.5979
<b>Inibidor da glicoproteína P</b>	I	0.7199
	NI	0.8601
<b>Transporte renal de cátions orgânicos</b>	NI	0.8418
<b>Distribuição</b>		
<b>Localização celular</b>	Mitocôndria	0.4955
<b>Metabolismo</b>		
<b>Substrato CYP450 2C9</b>	NS	0.8117
<b>Substrato CYP450 2D6</b>	NS	0.8258
<b>Substrato CYP450 3A4</b>	S	0.7059
<b>Inibidor CYP450 1A2</b>	I	0.5605
<b>Inibidor CYP450 2C9</b>	NI	0.8180
<b>Inibidor CYP450 2D6</b>	NI	0.9063
<b>Inibidor CYP450 2C19</b>	NI	0.6030
<b>Inibidor CYP450 3A4</b>	NI	0.8834
<b>Promiscuidade Inibitória do CYP</b>	Baixa	0.8923
<b>Excreção e Toxicidade</b>		
<b>HERG</b>	IF	0.9780
<b>Toxicidade no teste de AMES</b>	T	0.5383
<b>Carcinogênico</b>	NC	0.8651
<b>Biodegradação</b>	Não é biodegradável	0.5834
<b>Toxicidade aguda oral</b>	III	0.6419
<b>Perfil ADMET previsto - -- regressão</b>		
<b>Solubilidade aquosa</b>	-2.3641 (LogS)	
<b>Permeabilidade Caco-2</b>	2.0238 (LogPapp, cm/s)	
<b>Toxicidade</b>		
<b>Toxicidade Aguda em Ratos</b>	1.9113 (DL50, mol/kg)	

R-(+)-limoneno mostrou ser absorvido através da barreira hematoencefálica e do intestino humano, e é permeável ao Caco-2. Não é substrato, bem como não inibe glicoproteína P, nem o transporte renal de cátions orgânicos (Tabela 5).

No tocante avaliação metabólica de R-(+)-limoneno a ferramenta classificou como não substrato e não inibidor das enzimas do complexo citocromo analisadas, ainda, com baixa promiscuidade inibitória de enzimas do

complexo citocromo (Tabela 5).

Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que o composto avaliado é um fraco inibidor do gene codificador de canais de potássio (HERG), não apresentou toxicidade pelo teste AMES, foi classificado como não carcinogênico, biodegradável e a categoria de toxicidade oral aguda foi III, que inclui compostos com DL<sub>50</sub> de valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg (Tabela 5).

**Tabela 5:** Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para R-(+)-Limoneno.

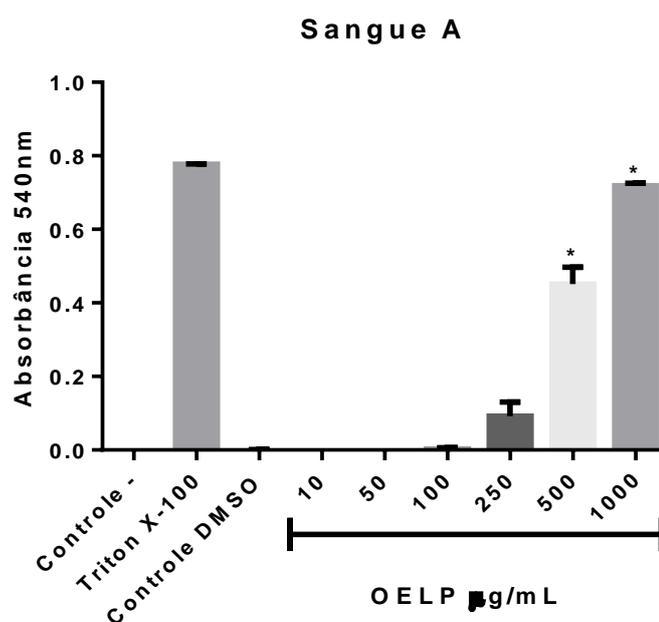
<b>Modelo</b>	<b>R-(+)-Limoneno</b>	<b>Probabilidade</b>
<b>Absorção</b>		
<b>Barreira Hematoencefálica</b>	BBB+	0.9444
<b>Absorção intestinal humana</b>	HIA+	0.9887
<b>Permeabilidade ao Caco-2</b>	Caco 2+	0.7667
<b>Substrato da glicoproteína P</b>	NS	0.6027
<b>Inibidor da glicoproteína P</b>	NI	0.7613
	NI	0.8697
<b>Transporte renal de cátions orgânicos</b>	NI	0.7484
<b>Distribuição</b>		
<b>Localização celular</b>	Lisossomo	0.6471
<b>Metabolismo</b>		
<b>Substrato CYP450 2C9</b>	NS	0.8776
<b>Substrato CYP450 2D6</b>	NS	0.8152
<b>Substrato CYP450 3A4</b>	NS	0.6142
<b>Inibidor CYP450 1A2</b>	NI	0.7497
<b>Inibidor CYP450 2C9</b>	NI	0.9308
<b>Inibidor CYP450 2D6</b>	NI	0.9398
<b>Inibidor CYP450 2C19</b>	NI	0.8906
<b>Inibidor CYP450 3A4</b>	NI	0.9257
<b>Promiscuidade Inibitória do CYP</b>	Baixa	0.7657
<b>Excreção e Toxicidade</b>		
<b>HERG</b>	IF	0.7745

<b>Toxicidade no teste de AMES</b>	NT	0.9356
<b>Carcinogênico</b>	NC	0.6913
<b>Biodegradação</b>	Biodegradável	0.7562
<b>Toxicidade aguda oral</b>	III	0.9069
<b>Perfil ADMET previsto - -- regressão</b>		
<b>Solubilidade aquosa</b>		-3.9372(LogS)
<b>Permeabilidade Caco-2</b>		1.7462 (LogPapp, cm/s)
<b>Toxicidade</b>		
<b>Toxicidade Aguda em Ratos</b>		1.4819 (DL50, mol/kg)

## 5.2 Ensaios de citotoxicidade

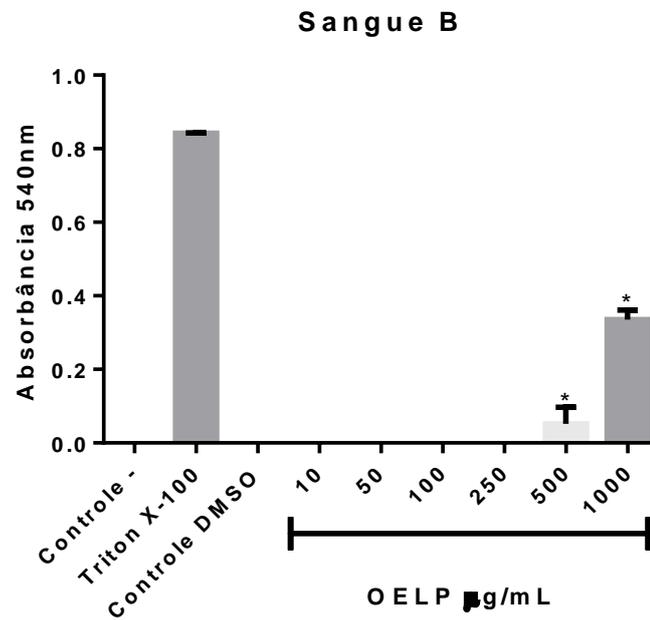
### 5.2.1 Avaliação do potencial hemolítico do OELP em eritrócitos humanos

O OELP apresentou atividade hemolítica dependente de concentração sobre os eritrócitos dos tipos sanguíneos A e O até a concentração de 250 µg/mL, assim como para B e AB até a concentração de 500 µg/mL.

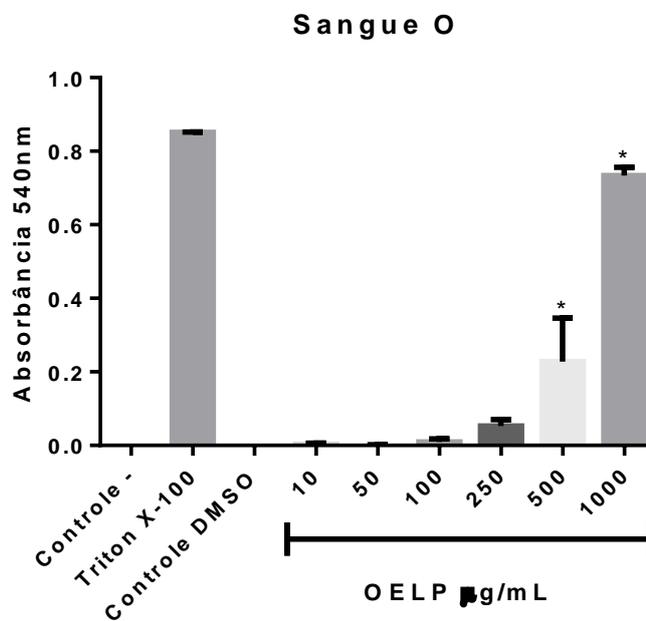


**Gráfico 1.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo A induzida pelo OELP. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de

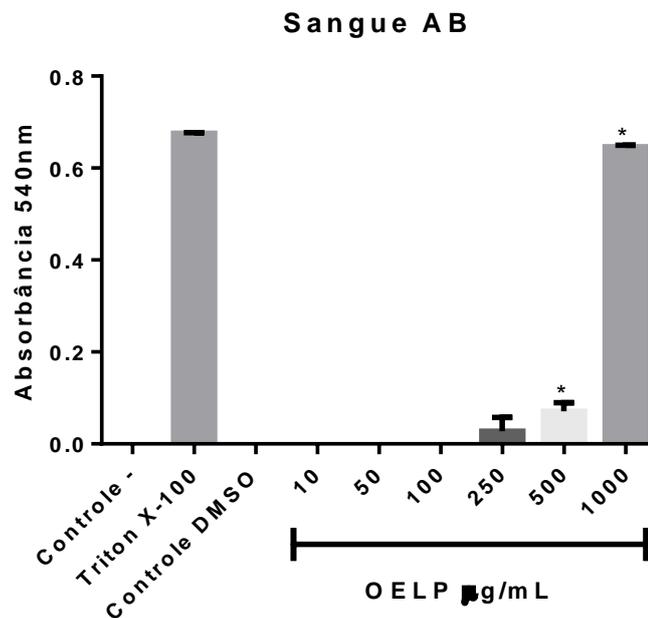
Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).



**Gráfico 2.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo B induzida pelo OELP. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).



**Gráfico 3.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo O induzida pelo OELP. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).



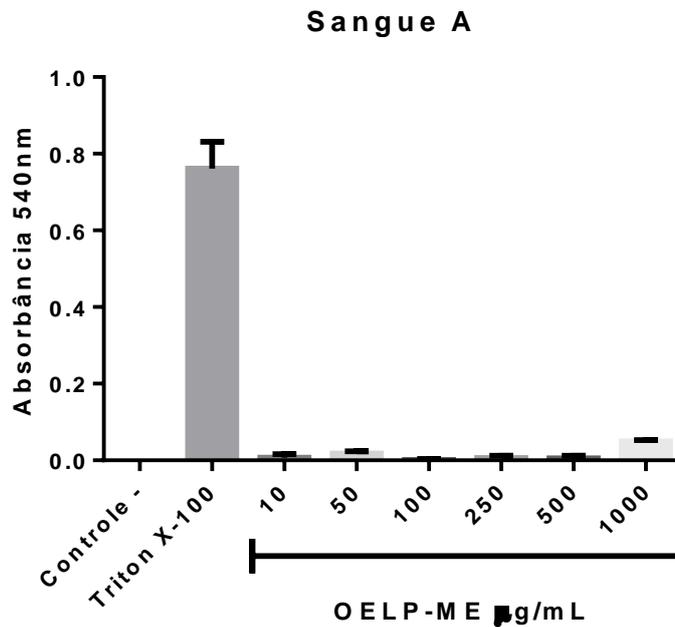
**Gráfico 4.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo AB induzida pelo OELP. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

**Tabela 6** - Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos.

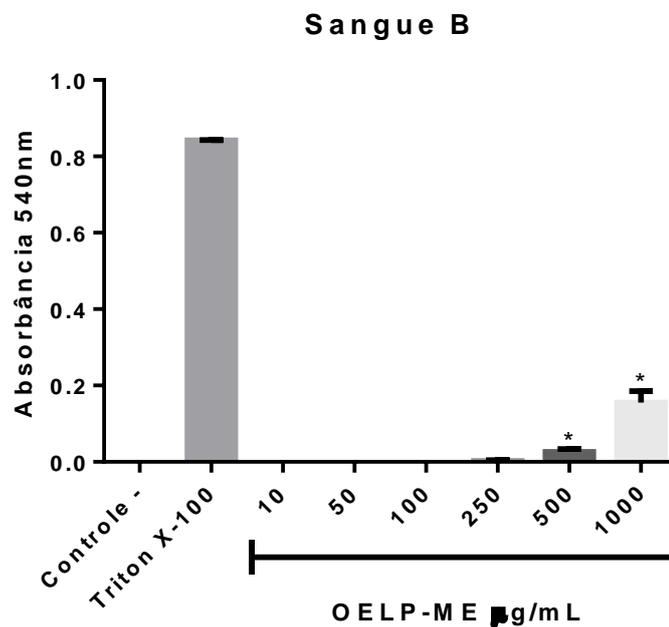
Tipo sanguíneo	Óleo essencial de <i>L. pedunculosa</i> (µg/mL)					
	10	50	100	250	500	1000
<b>A</b>	0,00%	0,00%	0,38%	11,79%	58,08%	92,53%
<b>B</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,21%	39,78%
<b>O</b>	0,31%	0,08%	1,13%	6,22%	26,75%	86,25%
<b>AB</b>	0,00%	0,00%	0,00%	4,09%	10,55%	95,61%

### 5.2.2 Avaliação do potencial hemolítico do OELP-ME em eritrócitos humanos

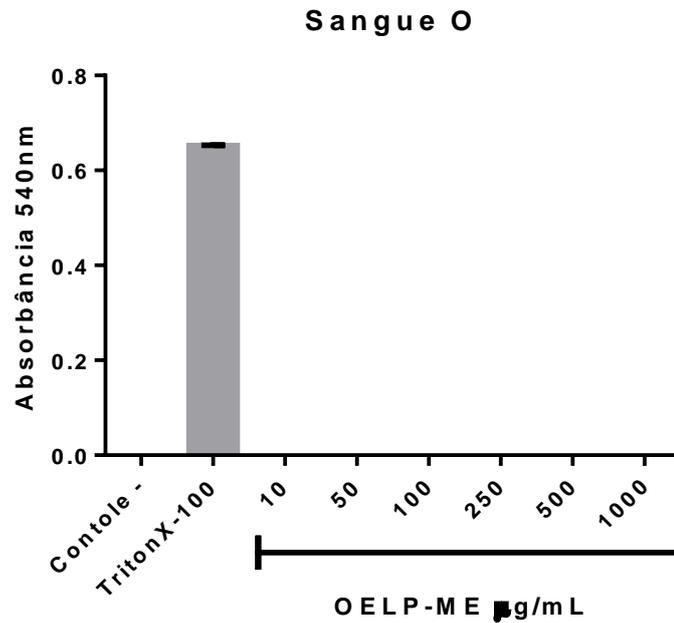
O OELP-ME induziu baixa atividade hemolítica, como demonstrado na Tabela 7 em todas as concentrações testadas.



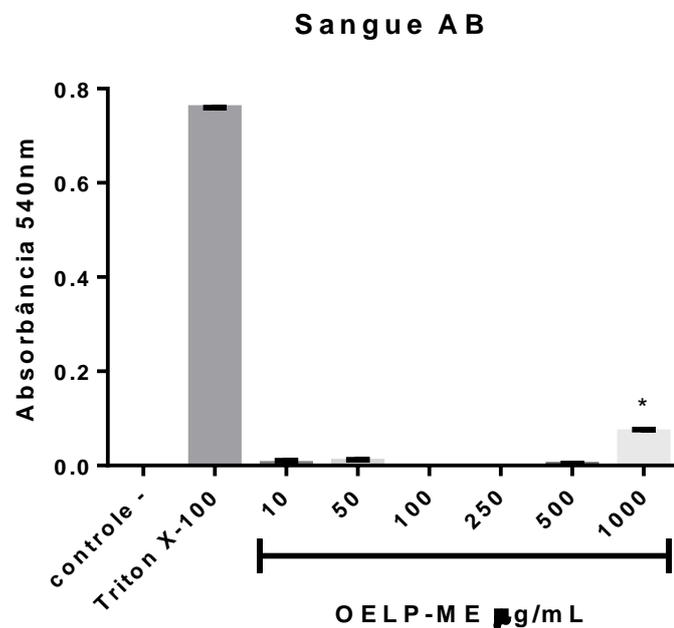
**Gráfico 5.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo A induzida pelo OELP-ME. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  (n=3).



**Gráfico 6.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo B induzida pelo OELP-ME. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  (n=3).



**Gráfico 7.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo O induzida pelo OELP-ME. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).



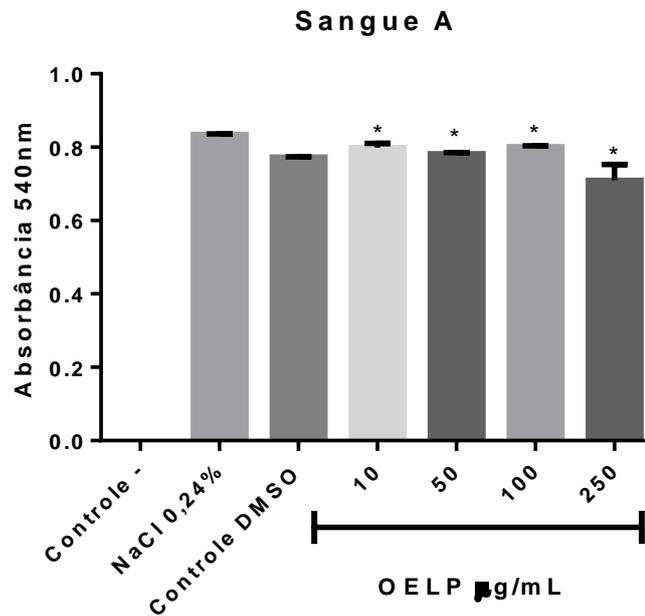
**Gráfico 8.** Avaliação hemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo AB induzida pelo OELP-ME. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

**Tabela 7-** Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP-ME em eritrócitos humanos.

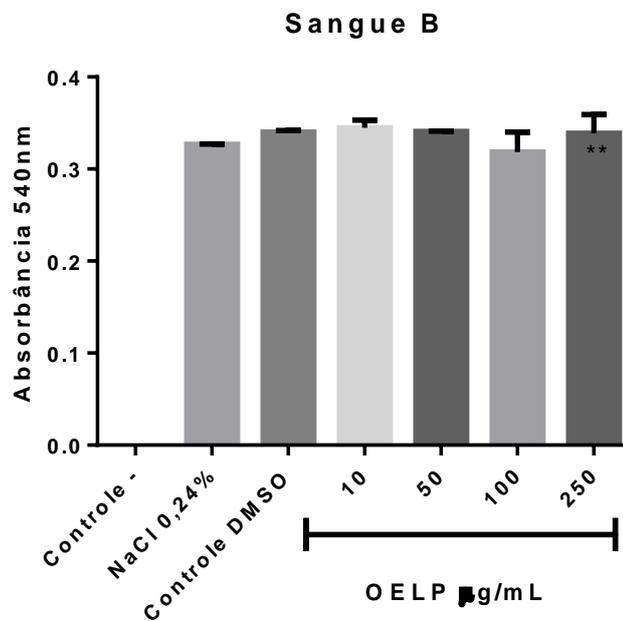
Tipo sanguíneo	Óleo essencial de <i>L. pedunculosa</i> Microencapsulado (µg/mL)					
	10	50	100	250	500	1000
<b>A</b>	0,92%	2,41%	0,17%	0,83%	0,74%	6,48%
<b>B</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,31%	3,13%	18,41%
<b>O</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>AB</b>	0,48%	1,10%	0,00%	0,00%	0,22%	9,35%

### 5.2.3 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao OELP

Na análise da fragilidade osmótica em meio hipotônico (solução NaCl 0,24%), observamos que o OELP promoveu pouca ou nenhuma redução desse índice nos sangues analisados. Ou seja, OELP não protegeu efetivamente as hemácias em nenhuma das concentrações testadas (10, 50, 100 e 250µg/mL) para os eritrócitos dos tipos B e AB, em comparação ao grupo controle positivo (solução NaCl 0,24 %), no qual constata-se o máximo de lise da membrana, apenas para o tipo sanguíneo A e O, algumas concentrações do OELP foi capaz de reduzir fracamente o estresse osmótico (Gráficos de 9-12).

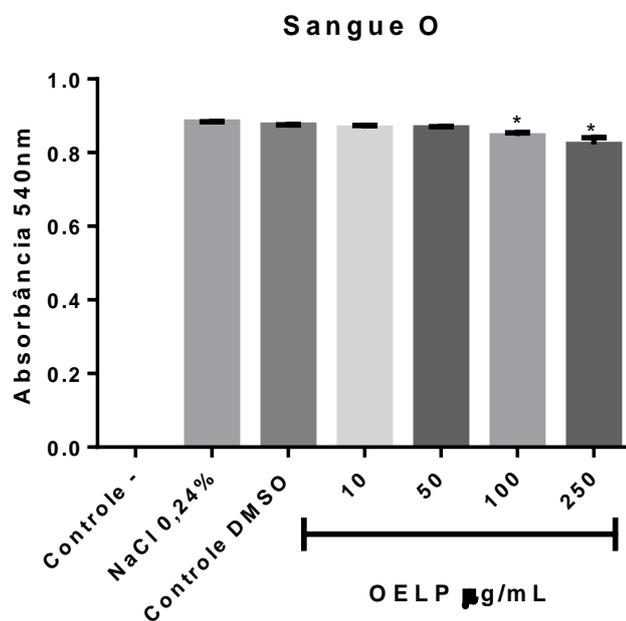


**Gráfico 9.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo A, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )

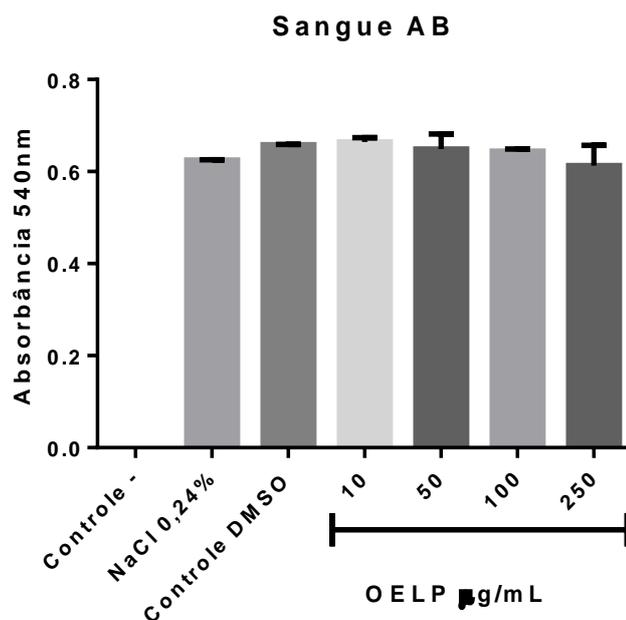


**Gráfico 10.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo B, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )

p<0,05)



**Gráfico 11.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo O, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  (n=3). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )



**Gráfico 12.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo AB, induzida pelo OELP, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$

e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )

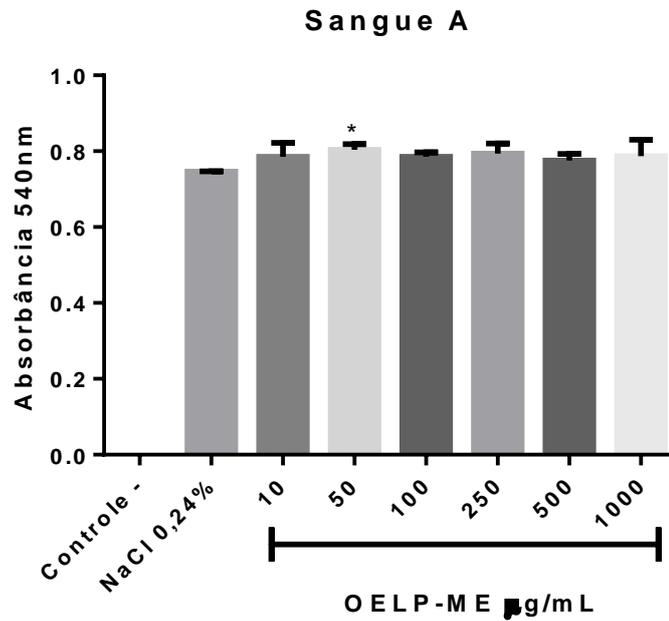
**Tabela 8-** Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).

Tipo sanguíneo	Óleo essencial de <i>L. pedunculosa</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	10	50	100	250
A	95,64%	93,69%	96,00%	85,03%
B	100%	100%	97,35%	100%
O	98,07%	98,15%	95,77%	93,13%
AB	100%	100%	100%	98,08%

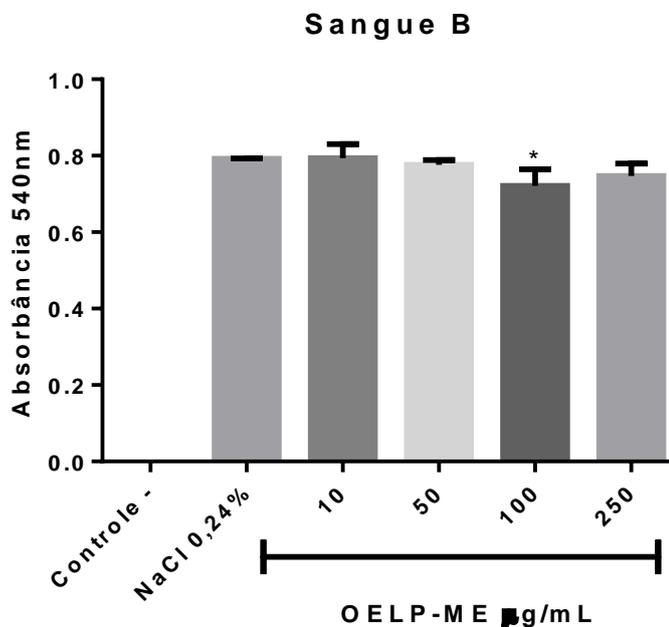
#### 5.2.4 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao OELP-ME

Na análise da fragilidade osmótica em meio hipotônico (solução NaCl 0,24%), observamos que o OELP-ME promoveu pouca ou nenhuma redução desse índice nos sangues A, B e O analisados (Gráficos 13-15).

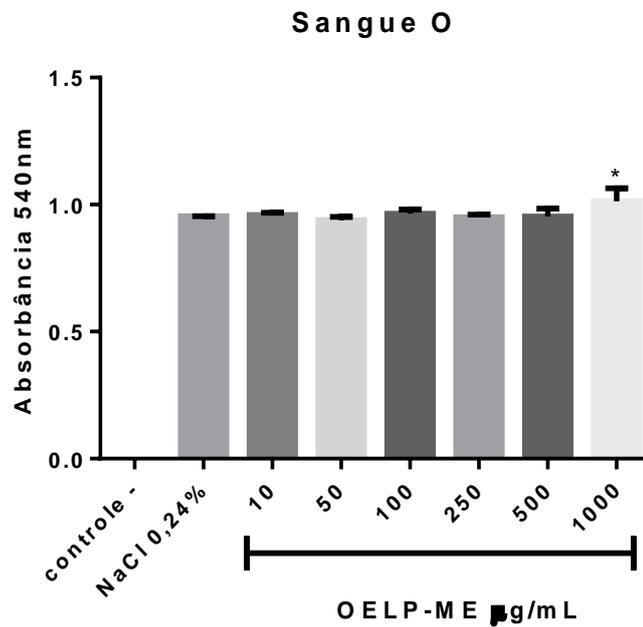
No tipo sanguíneo AB (Gráfico 16) todas as concentrações testadas, foram capazes de proteger os eritrócitos do estresse osmótico, em comparação ao grupo controle positivo (NaCl 0,24 %), reduzindo o percentual de hemólise como podemos verificar na Tabela 9.



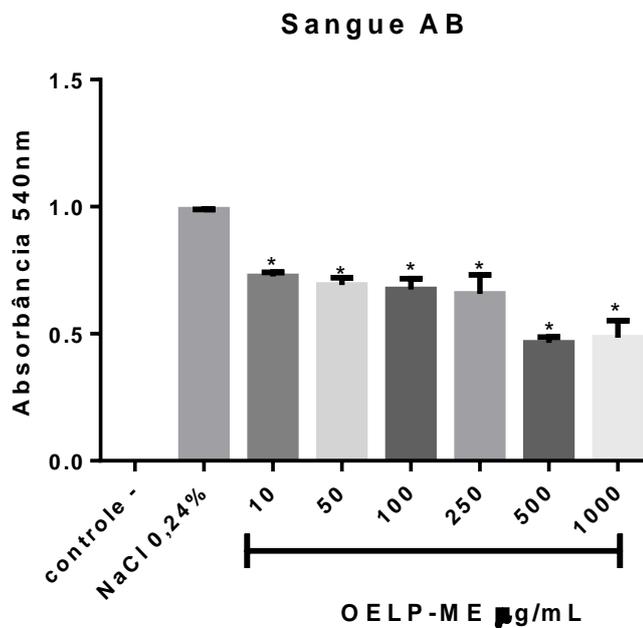
**Gráfico 13.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo A, induzida pelo OELP-ME, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )



**Gráfico 14.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo B, induzida pelo OELP-ME, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )



**Gráfico 15.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo O, induzida pelo OELP-ME, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )



**Gráfico 16.** Avaliação antihemolítica em eritrócitos do tipo sanguíneo AB, induzida pelo OELP-ME, quando em solução hipotônica (NaCl 0,24%). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ). (Legenda: \*  $p < 0,05$ )

p<0,05)

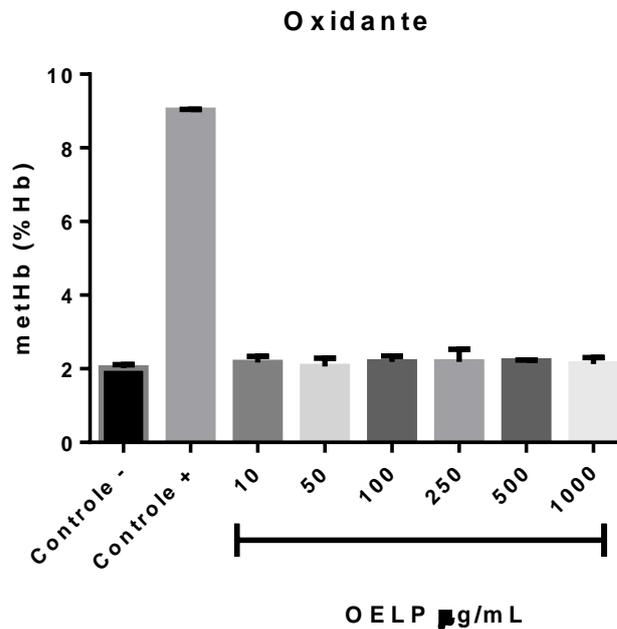
**Tabela 9-** Porcentagem de hemólise promovida pelo OELP em eritrócitos humanos, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl 0,24%).

Tipo sanguíneo	Óleo essencial de <i>L. pedunculosa</i> Microencapsulado (µg/mL)					
	10	50	100	250	500	1000
<b>A</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>B</b>	100%	98,02%	91,03%	94,27%	93,22%	85,52%
<b>O</b>	100%	98,43%	100%	99,68%	99,89%	100%
<b>AB</b>	73,42%	70,07%	68,29%	66,43%	47,00%	49,00%

### 5.3 Ensaio de atividade oxidante e antioxidante

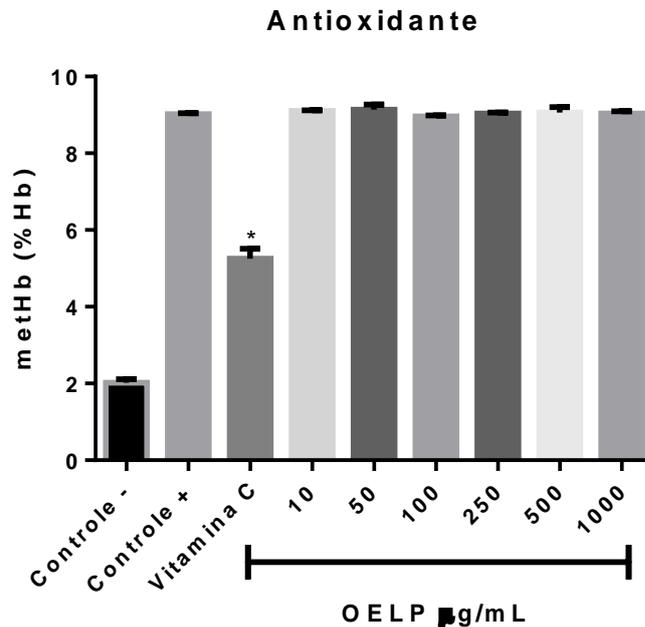
#### 5.3.1 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do OELP em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

O poder oxidante do OELP foi verificado por meio do percentual de formação de metahemoglobina/hemoglobina a partir da incubação com eritrócitos do tipo O. Foi constatado que o OELP não foi capaz de induzir oxidação em comparação ao grupo controle negativo (Hb - hemoglobina), como expressa nos gráfico 17.



**Gráfico 17:** Efeito oxidante do OELP em eritrócitos humanos. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle negativo. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.\*\*\*p< 0,001 (n=3).

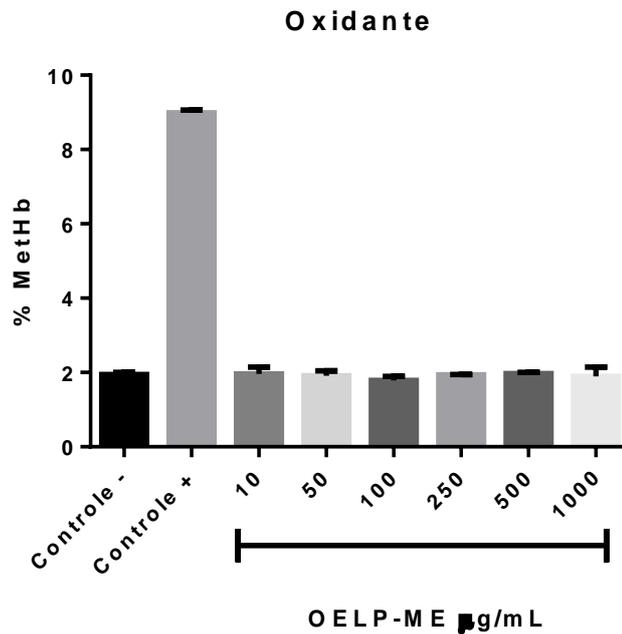
Quanto ao efeito antioxidante, este não foi constatado comparando-se ao grupo controle positivo (Hb + Ph) (Gráfico 18), fato observado apenas para o controle da vitamina C.



**Gráfico 18:** Efeito antioxidante do OELP em eritrócitos humanos. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle positivo. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.\*\*\* $p < 0,001$  (n=3).

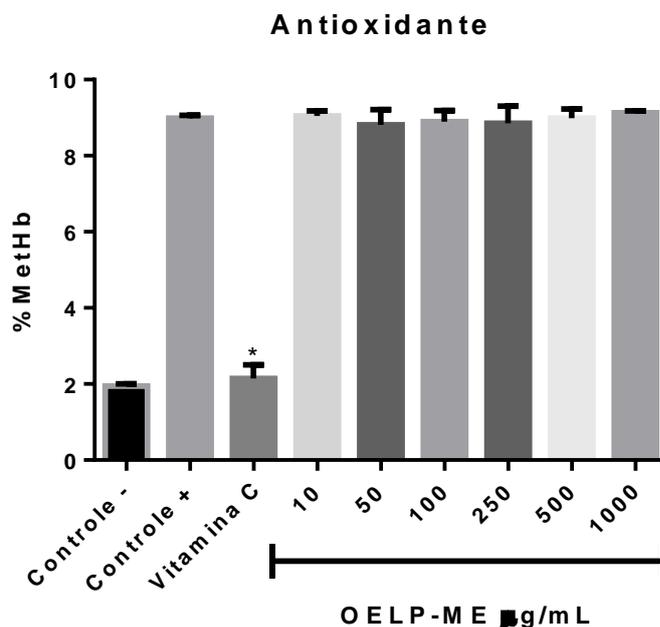
### 5.3.2 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

O poder oxidante do OELP-ME foi verificado por meio do percentual de formação de metahemoglobina/hemoglobina a partir da incubação com eritrócitos do tipo O. Foi constatado que o OELP-ME não foi capaz de induzir oxidação em comparação ao grupo controle negativo (Hb - hemoglobina), como expressa nos gráfico 19.



**Gráfico 19:** Efeito oxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle negativo. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.\*\*\* $p < 0,001$  (n=3).

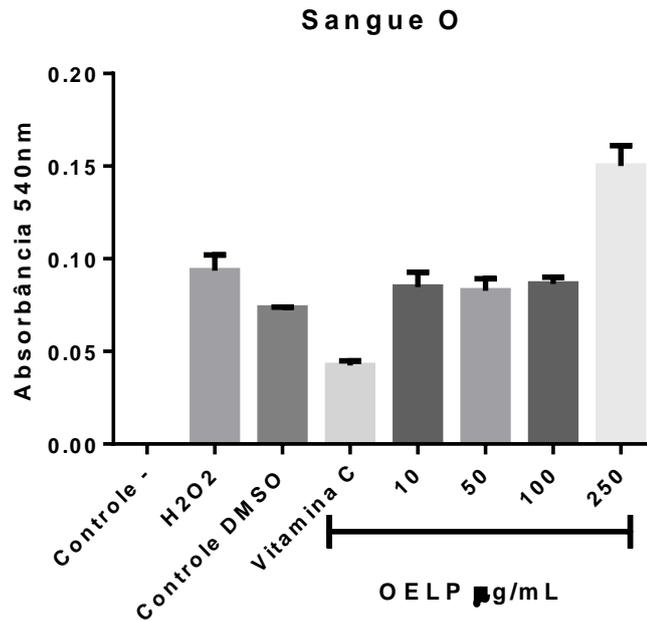
Quanto ao efeito antioxidante, este não foi constatado comparando-se ao grupo controle positivo (Hb + Ph) (Gráfico 20), fato observado apenas para o controle da vitamina C.



**Gráfico 20:** Efeito antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle positivo. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett.\*\*\*p< 0,001 (n=3).

### 5.3.3 Avaliação do potencial antioxidante do OELP em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

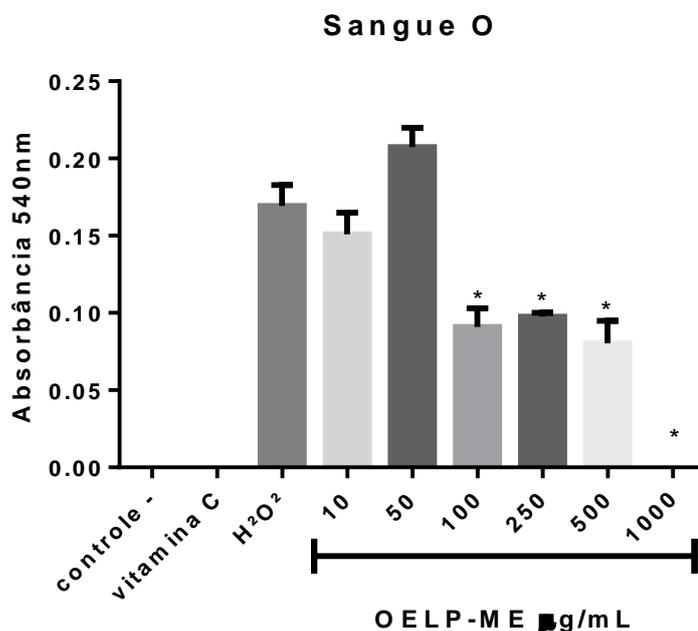
Ao submeter concentrações de 10, 50, 100 e 250 µg/mL do OELP a eritrócito humano do tipo sanguíneo O na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ficou claro que OELP não apresenta atividade antioxidante, uma vez que não houve redução da hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) quando comparado ao grupo controle positivo (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Gráfico 21:** Atividade antioxidante do OELP frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo O. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 (n=3).

#### 5.3.4 Avaliação do potencial antioxidante do OELP-ME em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

Ao submeter concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL do OELP-ME a eritrócito humano do tipo sanguíneo O na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), foi possível observar notável atividade antioxidante, com efeito, concentração dependente, uma vez que houve redução da hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) quando comparado ao grupo controle positivo (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Gráfico 22:** Atividade antioxidante do OELP-ME frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio em sangue do tipo O. Os resultados estão expressos como percentual da média em comparação ao grupo controle positivo (Hb + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 (n=3).

## 5.4 Atividade antibacteriana

### 5.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O OELP possui atividade antibacteriana forte a moderada, segundo Sartoratto et al., (2004), com ação bacteriostática, de amplo espectro, frente a: *Escherichia coli* ATCC 2536, *Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* ATCC 25619, *Escherichia coli* 108 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25925; sendo evidenciada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima 50 (CIM50), de 1000 - 250 µg/mL (Tabela 10).

A forma de OELP-ME foi exposta as mesmas cepas bacterianas para determinação da CIM, sob mesmas condições. Entretanto não apresentou atividade antibacteriana.

**Tabela 10.** Atividade antibacteriana do OELP frente a linhagens Gram-positivas e Gram-

negativas.

<b>Bactérias</b>	<b><i>S. aureus</i> ATCC 25925</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 108</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 2536</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 8539</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 25619</b>
<b>OELP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	250	500	500	500	1000

## 6 DISCUSSÃO

O modelo in silico previu computacionalmente as características farmacológicas dos marcadores químico do OELP, rotundifolona e r-(+)-limoneno, permitindo que houvesse planejamento para redução de gastos e tempo (MOHAMED, et al., 2017; UD-DIN et al., 2017)

O programa Molinspiration predisse as propriedades farmacocinéticas de rotundifolo e r-(+)-limone, ambas obedeceram aos requisitos preconizados pela — “Regra dos cinco” de Lipinski (PARAMASHIVAM et al., 2015).

A eficiência lipofílica das moléculas foi avaliada pelo valor de logP (partição octanol/água eficiente) e apresentou ótima hidrofobicidade ao cumprir com o intervalo  $\leq 5$  característica vital na biodistribuição do fármaco pelo organismo assim como o baixo peso molecular constatado (<500), que permite fácil transporte, difusão e melhor absorção através de membranas (PENG, et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

Uma absorção ou permeação fraca é mais provável quando há mais de 5 doadores de ligação H e/ou 10 aceitadores de ligação H, parâmetros definidos pelo número de nALH e nDLH, cuja estruturas estudadas não alcançaram se quer o valor de 3 ligações (DIRAR et al., 2016; MISHRA, et al., 2016).

TPSA (Área de Superfície Polarização Topológica) é um parâmetro físico-químico que fornece informações sobre a polaridade dos compostos. A área de superfície polar é a soma de todos os átomos polares principalmente oxigênio e nitrogênio, incluindo hidrogênio ligado. Um composto com TPSA menor ou igual a 140 Å<sup>2</sup> e com ligações rotativas  $\leq 10$  possui uma

boa biodisponibilidade (MISHRA, et al., 2016; PARAMASHIVAM et al., 2015).

Os parâmetros de lipinski previsto para o OELP ressalta sua capacidade de atingir a circulação sanguínea e chegar a tecidos ou órgãos específicos. Pode-se esperar que após sua administração, a substância se dissolva e solubilize no trato gastrointestinal para que possa ser absorvida no estômago ou através do intestino. Isso justifica a boa absorção intestinal, a capacidade de atravessar barreira hematoencefálica e de permear Caco-2 resultante nas tabelas 4 e 5 (PARAMASHIVAM et al., 2015; ROMERO & ROMERO, 2015).

A análise teórica *in silico* para absorção intestinal HIA evidencia a absorção do intestino na veia porta hepática, mas sem considerar os efeitos do metabolismo da primeira passagem. Possui boa HIA é necessária, mas não é suficiente para uma boa biodisponibilidade oral. Para tanto esta característica deve condizer com a regra de Lipinski que estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição do perfil de biodisponibilidade oral (ROMERO, ROMERO, 2015; ANDRADE-JORGE, et al., 2017)

As monocamadas celulares de células de carcinoma do cólon humano (Caco-2) exibem características semelhantes aos enterócitos e proporcionam um modelo que simula o epitélio intestinal humano. Nos últimos anos, este modelo monocamada tem sido amplamente utilizado como modelo *in vitro* de absorção através das células epiteliais intestinais, que está disponível, é prático para rastrear a permeabilidade intestinal dos constituintes ativos (WU, et al., 2015)

Modelos *in silico* dedicados na avaliação da capacidade de permear a barreira hematoencefálica baseiam-se no pressuposto de que os compostos são transportados através da BBB (blood-brain barrier) por difusão passiva e são classificados como um composto é BBB permeável (BBB +) ou não (BBB-) se o seu valor de log BB exceder um determinado limite (o limiar é tipicamente entre 0 e -1) (WANG et al., 2015).

A probabilidade de o OELP possuir atividade biológica frente à ligação de GPCR, como modulador de canal iônico (ICM), inibidor de quinase (KI), ligante de receptor nuclear (NRL), inibidor de protease (PI) e inibidor de

enzima (EI), foi analisada pelo programa Molinspiration. A molécula com pontuação de bioatividade superior a 0,00 é susceptível de possuir atividades biológicas consideráveis, valores de -0,50 a 0,00 devem ser moderadamente ativos e se o escore for inferior a -0,50, presume-se que está inativo (PARAMASHIVAM et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

Neste contexto, os resultados na tabela 2 demonstraram que rotundifolona apresentou alto índice de bioatividade em NRLs e Els, assim como o r-(+)-limoneno que também mostrou-se ativo frente a esses receptores porém com atividade consideravelmente moderada.

Os receptores nucleares (NRs) são alvos farmacêuticos importantes porque são reguladores fundamentais de muitas doenças metabólicas e inflamatórias, incluindo diabetes, dislipidemia, cirrose e fibrose. Então a atividade de rotundifolona e r-(+)-limoneno sobre esses receptores propõe uma hipótese promissora para continuidade de estudos a fim de testar a terapêutica para cura de distúrbios relevantes (Alexander et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

O R-(+)-limoneno exibiu moderada bioatividade como modulador de canais iônicos (tabela 2), um dos mais importantes alvos farmacológicos estudados. Tal atividade provavelmente está relacionada à sua atividade nociceptiva prevista na tabela 3. A modulação destes canais certamente proporcionará novas oportunidades terapêuticas em doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo dor, acidente vascular cerebral, epilepsia, ansiedade, depressão ou traumatismo, bem como em algumas patologias não neurológicas (ALEXANDER, et al., 2015; BARON AND LINGUEGLIA, 2015; SCHMIDT AND SCHMIDT, 2016).

A glicoproteína-P é uma importante proteína envolvida na absorção e biodisponibilidade de uma droga, pertence à superfamília das proteínas que se liga a ATP, presentes no lado apical das células epiteliais. Muitos pesquisadores relataram a contribuição do efluxo mediado por P-gp na farmacocinética e farmacodinâmica (PK / PD) de substratos P-gp, conseqüentemente, substratos dessa enzima tem a absorção afetada (GURUNATH, et al., 2015; ANDRADE-JORGE et al., 2017).

A rotundifolona mostrou-se como substrato de glicoproteína-P, isto significa dizer que pode apresentar uma pobre absorção por via oral ou uma disponibilidade na circulação sistêmica altamente variável. O R-(+)-limoneno por não ser substrato da P-gp, está isento deste efeito desfavorável.

Para superar este problema na absorção de substratos de P-gp, inibidores de bomba de efluxo são pesquisados, no entanto, até então os encontrados não foram aprovados para serem utilizados por via oral devido aos efeitos colaterais sistêmicos. Sua inibição aumenta a absorção e talvez seja exatamente esse efeito que faça com que a rotundifolona seja absorvida não só por membranas intestinais como em monocamadas de células Caco-2 e na barreira hematoencefálica, pois a mesma apresenta atividade inibidora parcial da glicoproteína-P (GURUNATH, et al., 2015).

Compreender as propriedades físicoquímicas e QSAR dos transportadores de drogas é fundamental para informar os design de medicamentos onde aperfeiçoar a depuração, bem como, a exposição do sítio-alvo, conforme necessário (VARMA, et al., 2017).

Os rins desempenham um papel importante na eliminação de drogas. A depuração renal é determinada pela interação de três processos, que são filtração glomerular, secreção ativa tubular e reabsorção (NIGAM, et al., 2015; VARMA, et al., 2017).

O transportador de cátions orgânico OCT2 tem importante papel na excreção renal de fármacos catiônicos, sua inibição possibilita a ocorrência de interações medicamentosas (drug-drug interactions - DDIs) em que um medicamento inibidor diminui a depuração renal dependente de OCT2 de um produto (substrato). Na verdade, existem vários exemplos clínicos de interações medicamentosas mediadas pela inibição de transportadores de cations (NIGAM, et al., 2015; VARMA, et al., 2017). A rotundifolona e o R-(+)-limoneno por sua vez não inibiram este sistema.

A maioria dos organismos vivos desenvolveram sistemas para evitar a absorção de xenobióticos e eliminá-los. A capacidade de nosso corpo para limpar os xenobióticos envolve vias enzimáticas específicas que produzem a oxidação, redução e hidrólise de fase 1 e reações de conjugação

de fase 2. As reacções da fase 1 são mediadas pelas enzimas do complexo citocromo P450, as enzimas CYP constituem uma grande superfamília de proteínas heme que metabolizam uma grande quantidade de compostos exógenos e endógenos. Das 57 formas CYP diferentes, cerca de 10 CYPs hepáticos são responsáveis pelo metabolismo oxidativo dos xenobióticos em seres humanos, e apenas sete CYPs são responsáveis pelo metabolismo de quase 90% de todas as drogas. O metabolismo geralmente converte compostos lipofílicos em mais derivados hidrofílicos que podem ser facilmente eliminados do corpo, geralmente através da urina (ZANGER e SCHWAB, 2013; RAUNIO, et al., 2015).

De acordo com o estudo *in silico* a rotundifolona é substrato da enzima CYP 3A4, a principal enzima metabolizadora de drogas no fígado humano, sendo responsável pela oxidação de 50% de todos os produtos farmacêuticos metabolizados por enzimas P450 humanas. Isso torna rotundifolona passível a uma melhor excreção renal (DENISOV, et al., 2016; RAUNIO, et al., 2015).

Rotundifolona apresentou também afinidade a CYP1A2, no entanto, com atividade inibitória. A inibição de CYPs pode levar a interações indesejadas de drogas devido às grandes variações de concentrações de fármaco dentro do paciente em local alvo e fora do alvo (RAUNIO, et al., 2015).

R-(+)-limoneno não é substrato e não inibe nenhuma das conformações enzimáticas testada no modelo *in silico*, ainda a ferramenta classificou ambos os compostos com baixa promiscuidade.

O HERG (*gene relacionado com o éter-a-go-go humano*) codifica canais de potássio, que são responsáveis pela repolarização normal do potencial de ação cardíaco. A morte súbita induzida por um bloqueio de canais de HERG K<sup>+</sup> (codificado pelo HERG) é geralmente considerada como a causa predominante do prolongamento do intervalo QT induzido por fármacos. Como uma variedade diversificada de estruturas de drogas pode causar toxicidade em HERG, a detecção regulatória precoce de compostos com este efeito colateral indesejável tornou-se outro objetivo importante. A análise *in silico* com rotundifolona e r-(+)-limoneno revelou fraca inibição, esta informação fornece a

chance de otimização estrutural para evitar esse efeito (BAUTISTA-AGUILERA, et al., 2014; WANG, et al., 2015).

A mutagenicidade deve ser testada nos estágios iniciais da pesquisa farmacêutica. O teste de Ames é o padrão para avaliar a mutagenicidade em sistemas de alerta precoce. Se um composto induz *Salmonella auxotrófica* a sintetizar a histidina novamente, este composto pode ser capaz de causar mutações genéticas (WANG, et al., 2015).

O teste de Ames foi considerado no rastreamento do r-(+)-limoneno não indutor de mutação (não tóxico), de forma contrária a rotundifolona apresentou potencial mutagênico, tóxico. A genotoxicidade é um fator importante nos testes de toxicidade pré-clínica do design da droga. As lições foram aprendidas com casos de genotoxicidade severa, como a crise da talidomida e o mau uso do estrogênio (WANG, et al., 2015).

Os conjuntos de dados de toxicidade genética importantes na modelagem incluem a pesquisa de carcinogênese química. Quando ocorrem mutações no material genético (DNA) de células, elas recebem instruções erradas para as suas atividades, dando origem a uma doença genômica conhecida como câncer. As alterações celulares são decorrentes de danos em genes específicos. Estas ocorrem no genoma celular por meio de metabólitos reativos endógenos, mutágenos ambientais e drogas terapêuticas que podem alterar sua integridade. Dessa forma, a carcinogênese pode ser espontânea ou induzida por agentes mutagênicos (DA SILVA E OLIVEIRA, 2017). Apesar da mutagenicidade apresentada pela rotundifolona no teste de toxicidade de AMES, a mesma não apresentou característica carcinogênica, bem como r-(+)-limoneno.

A importância da pesquisa do perfil biodegradável do fármaco tornou-se importante após a detecção de produtos farmacêuticos em sistemas terrestres e aquáticos. A biodegradação é um processo que determina a eliminação da maioria dos xenobióticos, incluindo fármacos, através de organismos que têm a capacidade de degradar uma vasta gama de poluentes, presentes nas águas residuais e os biotransformar recuperando a contaminação, contudo isto só ocorre se o composto não for capaz de inibir a

atividade microbiana devido ao seu ao poder de toxicidade (DOMARADZKA, et al., 2015; KIEL E ENGESSER, 2015).

A previsão precisa de toxicidade aguda é um grande desafio porque os mecanismos de ação são bastante diversos. Para os requisitos de rotulagem de precaução, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) estabeleceu categorias de toxicidade com base na dose letal média (DL<sub>50</sub>) ou na concentração letal média (CL<sub>50</sub>). Para toxicidade oral aguda, existem quatro categorias (categorias I, II, III e IV) para indicar o nível de toxicidade (LI, et al., 2014).

A rotundifolona e o r-(+)-limoneno foram classificados na Categoria III que inclui compostos com DL<sub>50</sub> valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg, fato confirmado com a estimativa da DL<sub>50</sub> teórica pela ferramenta que foi de 1.9113 e 1.4819 (LD<sub>50</sub>, mol/kg), respectivamente.

O desenvolvimento de agentes terapêuticos para combater doenças humanas é um processo longo e dispendioso, e a necessidade de novos agentes farmacológicos é crescente. Para proteger os pacientes, regulamentos estão em vigor para assegurar tratamentos de qualidade, eficazes e seguros. Esses regulamentos são complexos e requerem estudos pré-clínicos e clínicos, que aumentam o tempo e os custos associados à colocação de um medicamento no mercado. A fim de otimizar tempo, custo, evitar o uso desnecessário de indivíduos animais em estudos pré-clínicos e para diminuir o risco para pacientes em ensaios clínicos, abordagens *in vitro* são adotadas e desenvolvidas para prever resultados de toxicidade *in vivo* e clínica (PRADO, et al., 2015).

Muitas abordagens modernas de toxicologia *in vitro* empregam ensaios de citotoxicidade, esses ensaios estão correlacionados ao sucesso *in vivo*. A aplicabilidade desse ensaio em glóbulos vermelhos é uma ferramenta alternativa para a avaliação da toxicidade dos xenobióticos. Os glóbulos vermelhos como célula-alvo, são fáceis de encontrar, manusear, e sua toxicidade é correlacionada com a hemólise (PRADO, et al., 2015; PAGANO AND FAGGIO, 2015).

O ensaio hemolítico *in vitro* por método espectrofotométrico

fornece um método fácil e eficaz para a medição quantitativa da hemólise. Este método avalia o efeito de diferentes concentrações de biomoléculas nos eritrócitos humanos. OELP, não foi capaz de promover hemólise até a concentração de 500 µg/mL (tipos sanguíneos A e O) e 500 µg/mL (tipos sanguíneos B e AB) (gráficos 1-4). O OELP-ME induziu baixa atividade hemolítica como podemos verificar nos Gráficos 5-8.

A avaliação da citotoxicidade através de testes de atividade hemolítica provou ser um método alternativo de triagem para toxicidade simples. É rápido, reproduzível e barato para avaliar a atividade hemolítica dos eritrócitos contra muitos compostos; um fato que permite reduzir o uso de animais de laboratório para testes *in vivo*, ajudando a atingir o objetivo de diminuir, refinar e substituir estudos realizados com animais (JENNINGS, 2015; PAGANO AND FAGGIO, 2015).

A fragilidade osmótica dos eritrócitos depende do movimento da água nas células, e está relacionada à deformabilidade celular e ao grau de hemólise que ocorre quando os eritrócitos são submetidos ao estresse osmótico. Ao serem colocados em uma solução hipotônica mudanças na tonicidade podem predispor os glóbulos vermelhos para a hemólise. Este distúrbio pode ser avaliado por teste de fragilidade osmótica, um útil indicador para avaliar as interações de várias substâncias com a membrana celular *in vitro* (WAHHAB et al., 2017; HAI et al., 2015).

A intenção do estudo foi de investigar se OELP e o OELP-ME produziria efeito protetor na fragilidade osmótica de eritrócitos humanos, isto é, se reduziria a hemólise em função de uma solução hipotônica com teor de NaCl (0,24%).

Foi então constatado que o OELP reduziu a hemólise apenas nos sangues do tipo A e O, quando comparados com o controle positivo. No sangue A todas as concentrações testadas foram capazes de inibir a hemólise causada pela diferença osmótica, enquanto que o sangue O apenas nas concentrações de 100 µg/mL e 250 µg/mL como podemos verificar nos Gráficos 9-12 e Tabela 8. Já o OELP-ME reduziu a hemólise em todos os sangues testados em concentrações distintas para cada tipo sanguíneo como

podemos verificar nos Gráficos 13-16 e Tabela 9.

Os eritrócitos ou os glóbulos vermelhos estão entre as células mais predominantes no ser vivo e seu principal papel é o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos alvéolos pulmonares para todas as células do corpo, usando hemoglobina, grupos heme de metaloproteína cujo ferro os átomos ligam temporariamente  $O_2$ . Como eritrocitos são ricos em altas concentrações de  $O_2$  e íons ferrosos como constituintes de oxihemoglobina, suas atividades redox podem levar à formação de níveis tóxicos de ROS endógenos, como os radicais peróxido ( $ROO$ ), que podem danificar os componentes da membrana e promover a hemólise, com a conseqüente perda de sua função vital (CHISTÉ, et al., 2014; ANSARI, et al., 2015).

Embora glóbulos vermelhos possuam antioxidantes endógenos, como catalase, glutatona e enzimas de glutatona, para proteger as células contra ROS, os eritrócitos também contam com antioxidantes exógenos para evitar ou minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (CHISTÉ, et al., 2014).

Considerando os danos que podem ser produzidos por ROS em todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, levando a condições fisiopatológicas inflamatórias e de demais doenças crônicas cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer, crescente é o interesse em compostos bioativos antioxidantes para evitar a toxicidade mediada por  $ROO$  em eritrócitos humanos (CHISTÉ, et al., 2014; PINGITORE et al., 2015)

O OELP e OELP-ME não são capazes de oxidar os eritrócitos (Gráfico 17 e 19), quando comparados ao grupo controle positivo (Hb + Ph), não caracterizando poder oxidante. O mesmo pode-se dizer para a atividade antioxidante na presença da fenilhidrazina (gráficos 18 e 20).

Na avaliação do potencial antioxidante na presença de Espécies Reativas de Oxigênio, foi constatada a capacidade sequestradora de EROs apenas do OELP-ME em todas as concentrações testadas observando-se que na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  o poder antioxidante foi melhor/igual ao da vitamina C (Gráfico 22).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um grande problema de saúde mundial. Para resolver este problema, existe uma necessidade urgente de desenvolver novos antibacterianos (CRAFT & TOWNSEND, 2017).

Os produtos naturais são uma boa fonte de novos compostos bioativos, muitos pesquisadores se concentraram na investigação de extratos vegetais e microbianos, óleos essenciais, metabolitos secundários puros e novas moléculas sintetizadas como potenciais agentes antimicrobianos (BALOUIRI et al., 2016).

A capacidade antimicrobiana de *L. pedunculosa* foi avaliada, baseado na possibilidade da mesma apresentar atividade antibacteriana que é comprovada para demais plantas do gênero *Lippia*, e sua potência antimicrobiana foi classificada segundo SARTORATTO et al., (2004), produtos com CIM variando entre de 0,05 até 500µg/mL têm forte poder antimicrobiano; CIM entre 0,6 até 1500µg/mL possuem moderado poder antimicrobiano e CIM acima de 1600µg/mL, fraco poder antimicrobiano (STASHENKO et al., 2013; OMBITO, et al., 2014).

O OELP apresentou atividade antibacteriana de forte a moderada, do tipo bacteriostática, com efeito sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como pode ser visto na tabela 10. O interesse crescente na busca de novos agentes antimicrobianos de origem vegetal reside na variedade de produtos químicos pertencentes a diferentes classes de metabolitos que possuem especialmente os terpenoides presentes em alguns óleos essenciais (DE AMORIM SANTOS et al., 2016).

## 7 CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos, conclui-se que:

Os componentes químicos do OELP atendeu aos requisitos preconizados pela Regra dos cinco de Lipinski, apresentando na abordagem *in silico*, boa biodisponibilidade oral, absorção, distribuição sistêmica podendo atingir prontamente o SNC e produzir atividade a nível central. Trata-se de uma substância pouco metabolizada por enzimas hepáticas P450, com baixo risco

teórico de toxicidade, pois não expressou mutagênicidade, carcinogenicidade além de baixa toxicidade aguda oral.

Nos testes *in vitro* foi possível observar que o OELP foi citotóxico apresentando forte atividade hemolítica para todos os tipo sanguíneos testados e limitada atividade antihemolítica. Em comparação o OELP-ME que induziu baixa hemólise apenas nos tipos sanguíneo B e AB e protegeu os eritrócitos na presença de solução hipotônica (NaCl 0,24 %), indicando que não compromete a estrutura da membrana, contudo, interfere no funcionamento da membrana eritrocitária.

O OELP assim como o OELP-ME não induziu oxidação da hemoglobina e não apresentou efeito antioxidante na presença de fenilhidrazina, não interferindo nas ações dela sobre a formação da metahemoglobina. Entretanto apenas o OELP-ME apresentou efeito antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio, sugerindo uma ação sequestradora de radicais livres.

Pode-se concluir que o OELP-ME apresentou melhores resultados referente à citotoxicidade e ao efeito antioxidante.

Quanto à atividade antimicrobiana apenas o OELP mostrou-se efetivamente ativo contra microorganismos com forte ou moderado efeito bacteriostático de amplo espectro.

## **8 REFERÊNCIAS**

Abd-Al Wahhab I, Gany SN, Kadhim HA. Assessment of RBCs membrane protective activity of citicoline and eicosapentanoic-decosahexanoic acid in osmotic fragility model. AL-QADISIYAH MEDICAL JOURNAL. 2017 Jul 26;10(18):118-21.

Afonso, Ildio Ferreira. Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos *in silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008. 136p.

Alexander SP, Cidlowski JA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA. The concise

guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Nuclear hormone receptors. British journal of pharmacology. 2015 Dec 1;172(24):5956-78.

Almeida MP, Romero RB, Romero AL, Crespan ER. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. Lat. Am. J. Sci. Educ. 2015;2:22059.

Andrade-Jorge E, Bahena-Herrera JR, Garcia-Gamez J, Padilla-Martínez II, Trujillo-Ferrara JG. Novel synthesis of isoindoline/isoindoline-1, 3-dione derivatives under solventless conditions and evaluation with the human D 2 receptor. Medicinal Chemistry Research. 2017 Oct 1;26(10):2420-31.

Ansari FA, Ali SN, Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. Toxicology in Vitro. 2015 Oct 1;29(7):1878-86.

Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CA, Weffort-Santos AM. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. Nutrition Research. 2008 Jul 1;28(7):457-63.

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016 Apr 1;6(2):71-9.

Baron A, Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels—Physiological and therapeutical perspectives. Neuropharmacology. 2015 Jul 1;94:19-35.

Bautista-Aguilera OM, Esteban G, Bolea I, Nikolic K, Agbaba D, Moraleda I, Iriepa I, Samadi A, Soriano E, Unzeta M, Marco-Contelles J. Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezil–indolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. European journal of medicinal chemistry. 2014 Mar 21;75:82-95.

Braga, Renan Marinho. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo essencial de *lippia pedunculosa*. [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2016. 99p.

Camargo TM, Alves MI, Oliveira SD, Shitara ES, Oshima-Franco Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). Rev. bras. anal. clin. 2007;39(2):95-8.

Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, Dearden J, Gramatica P, Martin YC, Todeschini R, Consonni V. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?. Journal of medicinal chemistry. 2014 Jan 6;57(12):4977-5010.

Chisté RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. Carotenoids are effective inhibitors of in vitro hemolysis of human erythrocytes, as determined by a

practical and optimized cellular antioxidant assay. *Journal of food science*. 2014 Sep 1;79(9).

Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*. 1991;3:739-87.

Craft KM, Townsend SD. The Human Milk Glycome as a Defense Against Infectious Diseases: Rationale, Challenges, and Opportunities. *ACS infectious diseases*. 2017 Nov 15; 4 (2): 77–83.

da Silva MR, Oliveira RG. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. *Revista Perquirere*. Patos de Minas. 2017 Jan;14(1):200-17.

Dacie, J.V. and S.M. Lewis. *Practical Haematology*, 5th edition. J and A Churchill, London Eissa, I.A.M., 2001.

de Amorim Santos IG, Scher R, Rott MB, Menezes LR, Costa EV, de Holanda Cavalcanti SC, Blank AF, dos Santos Aguiar J, da Silva TG, Dolabella SS. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp.(Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitology research*. 2016 Feb 1;115(2):535-40.

de Andrade AM, dos Santos MS, de Andrade RS, de Andrade MR, da Silva Júnior CG. MAPEAMENTO TECNOLÓGICO DA UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA A PRODUÇÃO DE COSMÉTICOS. *Cadernos de Prospecção*. 2014;7(3):416.

de Carvalho JS, Martins JD, Mendonça MD, de Lima LD. Uso popular das plantas medicinais na comunidade da Várzea, Garanhuns-PE. 2013; 12(2): 58-65.

Deeba F, Raza I, Muhammad N, Rahman H, ur Rehman Z, Azizullah A, Khattak B, Ullah F, Daud MK. Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes: In vitro studies. *Toxicology and industrial health*. 2017 Apr;33(4):297-307.

Denisov IG, Mak PJ, Grinkova YV, Bastien D, Bérubé G, Sligar SG, Kincaid JR. The use of isomeric testosterone dimers to explore allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4. *Journal of inorganic biochemistry*. 2016 May 1;158:77-85.

Dias GT, Lima CM, Lira AB, Ramalho JA, Oliveira KM, Diniz MF. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. *Acta Brasiliensis*. 2017 Feb 15;1(1):8-12.

Dima C, Cotârlet M, Alexe P, Dima S. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex

coacervation method. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2014 Apr 1;22:203-11.

Dirar AI, Waddad AY, Mohamed MA, Mohamed MS, Osman WJ, Mohammed MS, Elbadawi MA, Hamdoun SA. In silico pharmacokinetics and molecular docking of three leads isolated from *Tarconanthus camphoratus* L. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2016;8:71-7.

Domaradzka D, Guzik U, Wojcieszynska D. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2015 Jun 1;14(2):229-39.

Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG. Plantas aromáticas e medicinais-óleos essenciais e voláteis. *Revista da APH N.º*. 2014;114:30.

Gerhardt P, Murray RG, Wood WA, Krieg NR. *Methods for General and Molecular Bacteriology*; American Society for Microbiology: Washington, DC, USA, 1994. ISBN.;1555810489:791.

Gurunath S, Nanjwade BK, Patil PA. Oral bioavailability and intestinal absorption of candesartan cilexetil: role of naringin as P-glycoprotein inhibitor. *Drug development and industrial pharmacy*. 2015 Jan 2;41(1):170-6.

Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*. 2000 May 1;11(3):137-47.

Hai A, Kizilbash N, Alrowaili M, Zaidi SH. Osmotic Fragility of Human Erythrocytes is Altered by Porphyrin Compounds. *International Journal of Research Studies in Biosciences*. 2015;3(4):125-30.

He F, Zuo L. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *International journal of molecular sciences*. 2015 Nov 20;16(11):27770-80.

Jennings P. The future of in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro*. 2015 Sep 1;29(6):1217-21.

Jesus, Daniel da Silva de. Estresse de metais na produtividade de compostos oriundos do metabolismo secundário de *martianthus leucocephalus* (mart. Ex benth.) Jfb Pastore. [Tese de Doutorado]. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; 2016. 111p.

Kaye KS, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2015 Oct 1;35(10):949-62.

Kiel M, Engesser KH. The biodegradation vs. biotransformation of fluorosubstituted aromatics. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015 Sep 1;99(18):7433-64.

Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*. 2015 Dec 1;24(4):325-40.

Lagunin AA, Goel RK, Gawande DY, Pahwa P, Glorizova TA, Dmitriev AV, Ivanov SM, Rudik AV, Konova VI, Pogodin PV, Druzhilovsky DS. Chemo-and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Natural product reports*. 2014;31(11):1585-611.

Li X, Chen L, Cheng F, Wu Z, Bian H, Xu C, Li W, Liu G, Shen X, Tang Y. In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. *Journal of chemical information and modeling*. 2014 Apr 16;54(4):1061-9.

Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015 Jan;517(7535):455.

Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014 Dec 5;224:164-75.

Maćczak A, Cyrkler M, Bukowska B, Michałowicz J. Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study). *Journal of hazardous materials*. 2016 Apr 15;307:328-35.

Martins IM, Barreiro MF, Coelho M, Rodrigues AE. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*. 2014 Jun 1;245:191-200.

Menezes LR, Santos NN, Meira CS, Santos JA, Guimarães ET, Soares MB, Nepel A, Barison A, Costa EV. A new source of (R)-limonene and rotundifolone from leaves of *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) and their trypanocidal properties. 2014 April;9 (6): 737-739.

Mishra SS, Sharma CS, Singh HP, Kumar N. In Silico Pharmacokinetic and Toxicity Evaluation of Some Selected Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antipyretic-Analgesic Agents. *International Journal of Pharmaceutical Technology and Biotechnology*. 2016;3(3):33-8.

Mohamed MA, Dirar AI, Elbadawi MA, Osman WJ, Mohammed MS, Hamdoun S. In silico assessment of the druggability of two novel germacranolides isolated from *Capparis decidua* (Forsk.) as carbonic anhydrase II inhibitors. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2017 Jan;7(01):093-7.

Moura, NS, Vasconcelos, ACM, Bernabé, BM, Teixeira, L JQ, Saraiva, SH. Ensaio toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. *enciclopédia biosfera*. Centro Científico Conhecer. 2012; 8(15): p.1945.

Nascimento AM, Maia TD, Soares TE, Menezes LR, Scher R, Costa EV,

Cavalcanti SC, La Corte R. Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. *Neotropical entomology*. 2017 Apr 1;46(2):223-30.

Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn SY, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W. The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiological reviews*. 2015 Jan;95(1):83-123.

Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Sudano Roccaro A, Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*. 2004 Jan 1;230(2):191-5.

Nunes JD, Maciel MV. A importância da informação do profissional de enfermagem sobre o cuidado no uso das plantas medicinais: uma revisão de literatura. *Revista Fitos*. 2017; 10(4): 375-547.

Ombito JO, Salano EN, Yegon PK, Ngetich WK, Mwangi EM. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *J Sci Innov Res*. 2014;3(4):460-6.

Pagano M, Faggio C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function*. 2015 Aug 1;33(6):351-5.

Paramashivam SK, Elayaperumal K, bhagavan Natarajan B, devi Ramamoorthy M, Balasubramanian S, Dhiraviam KN. In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. *Bioinformation*. 2015;11(2):73.

Peng W, Liu YJ, Zhao CB, Huang XS, Wu N, Hu MB, Xie DS, Wu CJ. In silico assessment of drug-like properties of alkaloids from *Areca catechu* L nut. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;14(4):635-9.

Pennaftort VP, Freitas CH, Jorge MS, Queiroz MV, Aguiar CA. Práticas integrativas e o empoderamento da enfermagem. *Revista Mineira de Enfermagem*. 2012;16(2):289-95.

Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015 Jul 1;31(7):916-22.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015 Jun 5;97:55-74.

Prado A, Petroianu GA, Lorke DE, Chambers JW. A trivalent approach for determining in vitro toxicology: Examination of oxime K027. *Journal of Applied Toxicology*. 2015 Feb 1;35(2):219-27.

Rakers C, Schumacher F, Meinl W, Glatt H, Kleuser B, Wolber G. In silico

prediction of human sulfotransferase 1E1 activity guided by pharmacophores from molecular dynamics simulations. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Jan 1;291(1):58-71.

Rangel M, Malpezzi EL, Susini SM, De Freitas J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. 1997 Feb 1;35(2):305-9.

Raunio H, Kuusisto M, Juvonen RO, Pentikäinen OT. Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Frontiers in pharmacology*. 2015 Jun 12;6:123.

Ribeiro Bruning MC, Bittencourt Gonzalez Mosegui G, Manso de Melo Vianna C. 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*. 2012;17(10).

Romero RB, Romero AL. Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. *Journal of Health Sciences*. 2015 Jul 1;16(4).

Rossato Badke M, Denardin Budó MD, Titonelli Alvim NA, Dolejal Zanetti G, Heisler EV. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & contexto enfermagem*. 2012;21(2).

Santos JS, Melo JI, Abreu MC, Sales MF. Verbenaceae sensu stricto in the region of Xingó: Alagoas and Sergipe, Brazil. *Rodriguésia*. 2009 Dec;60(4):985-98.

Santos, Israel Gomes de Amorim. "Atividade amebicida do óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) frente a trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*." [Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária]. São Cristóvão: Universidade Federal do Sergipe; 2014. 57p.

Sartoratto A, Machado AL, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MC, Rehder VL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004 Dec;35(4):275-80.

Schmidt AP, Schmidt SR. Behavior of ion channels controlled by electric potential difference and of Toll-type receptors in neuropathic pain pathophysiology. *Revista Dor*. 2016;17:43-5.

Silva AC, Prata AP, Mello AA. Flowering plants of the Grota do Angico Natural Monument, Caatinga of Sergipe, Brazil. 2013 Ago; 9(4): 733-739.

Silva NC. TUDO QUE É NATURAL NÃO FAZ MAL? INVESTIGAÇÃO SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS POR IDOSOS, NA CIDADE DE IAPU-LESTE DE MINAS GERAIS. *ÚNICA Cadernos Acadêmicos*. 2016 May 25;2(1).

Silva, Deisiane Aparecida da. *Screening* de produtos naturais com

potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo *in vitro* e *in silico*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2015. 108p.

Soares BV, Tavares-Dias M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota). 2013 Jul 8;3(1):109-23.

Souza, João Pedro de Albuquerque. *Estudo de ancoragem molecular de derivados de ácido cinâmico frente à enzimas do ciclo replicativo do HIV-1* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2015. 91p.

Stashenko EE, Martínez JR, Cala MP, Durán DC, Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of separation science*. 2013 Jan 1;36(1):192-202.

Thompson JB, Pascalicchio AA. O impacto da medicina tradicional: Brasil como potência verde mundial. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade*. 2012;7(1):62.

Tortora, Gerard J. *Microbiologia* [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Aristóbolo Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2012.

Ud-Din S, Bayat A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*. 2017 Apr 1;25(2):164-76.

Varma MV, Lai Y, El-Kattan AF. Molecular properties associated with transporter-mediated drug disposition. *Advanced drug delivery reviews*. 2017 Jul 1;116:92-9.

Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, Liu X, Luo X, Luo C, Chen K, Zheng M. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly reviews of biophysics*. 2015 Nov;48(4):488-515.

Wu S, Xu W, Wang FR, Yang XW. Study of the biotransformation of tongmai formula by human intestinal flora and its intestinal permeability across the Caco-2 cell monolayer. *Molecules*. 2015 Oct 15;20(10):18704-16.

Xiao Z, Liu W, Zhu G, Zhou R, Niu Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014 Jun 1;94(8):1482-94.

Zabawa TP, Pucci MJ, Parr Jr TR, Lister T. Treatment of Gram-negative

bacterial infections by potentiation of antibiotics. *Current opinion in microbiology*. 2016 Oct 1;33:7-12.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*. 2013 Apr 1;138(1):103-41.



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE

**Pesquisador:** Andressa Brito Lira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56343216.6.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.658.669

Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721929.pdf	06/07/2016 17:16:01		Aceito
Outros	CertidaoaprovacaCEUA.pdf	06/07/2016 17:13:56	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	CartaanuenciaLABETOX.pdf	06/07/2016 17:11:42	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Cartaresposta.pdf	06/07/2016 17:08:31	Andressa Brito Lira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetov.pdf	06/07/2016 17:05:20	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Declaracao.JPG	20/05/2016 17:07:36	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	formulario.pdf	20/05/2016 17:05:53	Andressa Brito Lira	Aceito
Outros	Unidadetransfusional.pdf	20/05/2016 17:04:56	Andressa Brito Lira	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	20/05/2016 17:01:19	Andressa Brito Lira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não