



Universidade Federal de São João del-Rei  
Coordenadoria do Curso de Química



# **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol.**

**Regiamara Ribeiro Almeida**

São João del-Rei – 2015

# **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol.**

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado no 2º semestre do ano de 2015 ao Curso de Química, Grau Acadêmico Bacharelado, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Química.

**Autor:** Regiamara Ribeiro Almeida

**Docente Orientador:** Prof. Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães

**Modalidade do Trabalho:** Revisão bibliográfica

São João del-Rei – 2015

## RESUMO

Os monoterpenos aromáticos timol e carvacrol são os principais constituintes de vários óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas. Atualmente encontram-se entre os constituintes de óleos essenciais mais estudados, sobretudo devido ao amplo espectro de ação, como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anticarcinogênico e por suas características favoráveis, por possuírem alguma solubilidade em água e baixa toxicidade. Contudo, para intensificar o uso destes compostos torna-se necessário um conhecimento mais abrangente sobre o seu modo de ação, para assim ser possível prever seus efeitos e a maneira que interagem no organismo. Com o intuito de abordar de forma sucinta as principais atividades biológicas destes monoterpenos e seus mecanismos de ação foi realizada uma análise sobre as possibilidades de ação destes compostos em cada tipo de sistema.

*Palavras-chave:* timol, carvacrol, mecanismos de ação, atividade biológica.

# SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Desenvolvimento	
2.1 Características gerais timol do e do carvacrol	02
2.2 Atividades antibacterianas	03
2.3 Atividades antifúngicas	07
2.4 Atividades inseticidas	08
2.5 Atividades sobre o sistema nervoso	09
2.6 Atividades anti-inflamatórias	10
2.7 Atividades apresentadas como promotores de permeação na pele	11
2.8 Atividades sobre o estresse oxidativo	12
2.9 Atividades anticancerígenas	13
4. Considerações finais	14
5. Referências bibliográficas	15

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas que apresentam papel no desenvolvimento de novos compostos com diferentes aplicações biológicas. Estas moléculas são sintetizadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que é capaz de gerar milhares de moléculas com uma grande diversidade e complexidade estrutural. Dentre estas moléculas encontram-se aquelas que fazem parte da constituição dos óleos essenciais (Figueiredo *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixo peso molecular e geralmente odoríficos. São obtidos por meio da destilação por arraste a vapor d'água de diversas partes dos vegetais. As análises físico-químicas dos óleos essenciais demonstram que estes são constituídos por diferentes compostos, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (Simões *et al.*, 2004). Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sequiterpenos (C<sub>15</sub>), que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (Dubey *et al.*, 2003).

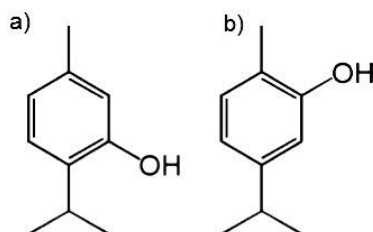
Dentre os milhares de compostos que podem estar presentes na composição dos óleos essenciais, o timol e o carvacrol se destacam devido suas pronunciadas atividades antimicrobiana. Estes monoterpenos aromáticos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanium compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (Peixoto-Neves *et al.*, 2010).

Estes compostos possuem várias propriedades biológicas importantes, sendo comumente utilizados como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico. Tendo em vista as diversas atividades biológicas apresentadas pelo timol e o carvacrol, alguns trabalhos têm sido realizados com intuito de esclarecer o mecanismo de ação destes compostos. No entanto, as informações encontradas são apresentadas de forma dispersa e ainda não foram sumarizadas, o que impede o estabelecimento de conclusões a cerca de seus mecanismo de ação.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Características gerais timol e carvacrol

O carvacrol 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e seu isômero timol 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol são monoterpenos encontrados em diversas plantas aromáticas sendo biossintetizados a partir do  $\gamma$ -terpineno e do  $p$ -cimeno (Nostro & Papalia, 2012). O timol foi sintetizado pela primeira vez por Caspar Neumann em 1719 (Friedrich, 2014); sendo estruturalmente muito semelhante ao carvacrol variando apenas a posição do grupo hidroxila no anel fenólico, como pode ser visto na Figura 1 (Lambert *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Estrutura molecular (a) timol e (b) carvacrol (Peixoto-Neves *et al.*, 2010).

O carvacrol também é conhecido como isopropil-*o*-cresol,  $p$ -cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol (De Vincenzi *et al.*, 2004). Ambos possuem fórmulas moleculares iguais a  $C_{10}H_{14}O$  e pesos moleculares de  $150,22 \text{ g mol}^{-1}$ . No entanto, o carvacrol apresenta-se na forma líquida em temperatura ambiente cuja solubilidade em água é de  $830 \pm 10 \text{ ppm}$  (Nostro & Papalia, 2012). Em contrapartida o timol em temperatura ambiente encontra-se na forma de cristais (Holland *et al.*, 2014).

### 2.2 Atividades antibacterianas

Existem vários estudos relacionados ao desenvolvimento e identificação de novos compostos que apresentem atividade antibacteriana, dentre eles destacam-se os diferentes tipos de óleos essenciais de plantas que possuem como seus principais constituintes químicos o timol e o carvacrol. Os estudos têm demonstrado que essa atividade está relacionada principalmente com a interação que estes compostos possuem com as membranas celulares dos diferentes microrganismos.

Helander *et al.* (1998) realizaram estudos avaliando a atividade antibacteriana do timol e do carvacrol frente a linhagens de bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157: H7 (*Gram-negativa*) e *Salmonella typhimurium* (*Gram-negativa*) com a finalidade de detectar alterações causadas na permeabilidade da membrana externa destas bactérias, após a incorporação destes compostos. Com este propósito foram realizados testes utilizando sondas hidrofóbicas fluorescentes de N-fenil-N-naftilamina (NPN). Observando-se um aumento na intensidade total da emissão da fluorescência proveniente das perturbações causadas na estrutura da membrana externa, a qual permite o acesso da NPN à membrana interna, o que não ocorre quando a célula da bactéria está intacta. Cristani *et al.* (2007) também empregaram marcadores fluorescentes para avaliar o mecanismo de ação destes compostos frente as bactérias *Escherichia coli* (*Gram-negativas*) e *Staphylococcus Aureus* (*Gram-Positiva*). Utilizaram a carboxifluoresceína encapsulada em vesículas unilamelares grandes (LUVs) com diferentes composições lipídicas (fosfatidilcolina, PC, fosfatidilcolina / fosfatidilserina, PC / PS; fosfatidilcolina / estearilamina, PC / SA). Nesse estudo, foi relatado que o mecanismo de ação do timol e do carvacrol estão associados com a capacidade que estes apresentam em atravessar a membrana celular causando uma perturbação na membrana plasmática do microrganismo, esta capacidade pode estar associada com as características físico-químicas destas moléculas, tendo em vista suas características lipofílicas, mas ao mesmo tempo, também apresentam uma certa solubilidade em água.

Xu *et al.* (2008) também atribuíram a atividade antibacteriana destes compostos com as suas capacidades em permeabilizarem e despolarizarem a membrana citoplasmática de *Escherichia coli*. Com esta finalidade foi realizada a quantificação da fluorescência utilizando o iodeto de 3,3'-dietiloxacarbocianina (DIOC<sub>2</sub>) como corante. De acordo com os ensaios realizados, foi demonstrada a diminuição da intensidade absoluta da fluorescência em consequência das alterações ocasionadas sobre a permeabilidade da membrana, devido a sua interação com estes compostos. Hammer & Heel (2012) também observaram por meio da utilização do corante (DIOC<sub>2</sub>) que o carvacrol despolariza a maioria das células das bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus*, de forma dependente do tempo e da concentração.

Com o propósito de avaliar se realmente a atividade antibacteriana do carvacrol estava relacionada com a sua capacidade de alterar a membrana externa, La Stora *et al.* (2011) realizaram análises de microscopia de força atômica da membrana externa de diferentes espécies bacterianas, *Brochothrix thermosphacta* 1R2, *Carnobacterium maltaromaticum* 9P, *Lactobacillus plantarum* 48M, *Listeria innocua* 1770, *E. Coli* 32,

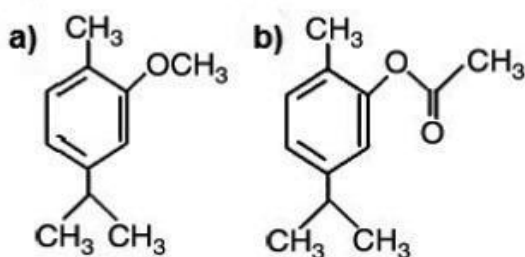
*Hafnia alvei* 53M, *Pseudomonas fragi* 25P, e *Serratia proteamaculans* 42M, todas tratadas com carvacrol. Perante este estudo, foi possível comprovar que este composto realmente afeta a membrana externa das bactérias, visto que as imagens de todas as linhagens de células tratadas exibiram alterações significativas na estrutura de sua superfície celular, seguidas da diminuição de seus comprimentos e diâmetros.

Embora tenha sido verificado que o carvacrol e o timol afetem tanto a membrana externa quanto a interna, outros estudos mostraram que o seu principal local de ação é a membrana citoplasmática. Helander *et al.* (1998) submetem células de *E. coli* e *Photobacterium leiognathi*, bactérias Gram negativas, à presença do timol e do carvacrol e constataram que estes compostos ocasionaram a desintegração da membrana citoplasmática, resultando na liberação de lipopolissacarídeos, redução dos níveis de ATP<sub>intracelular</sub> e aumento dos níveis de ATP<sub>extracelular</sub>. Gill & Holley (2006) também observaram através de experiências em membranas isoladas que o mecanismo secundário de ação do carvacrol frente à *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157H7 está associado com a capacidade inibitória da atividade da enzima ATPase, uma vez que a inibição ocorre no mesmo intervalo de concentração necessário para acontecer a ruptura da membrana. No entanto, os autores citam que a inibição da enzima pode desempenhar uma função significativa na redução da taxa de crescimento das bactérias em concentrações subletais. Di Pasqua *et al.* (2007) também verificaram que a ação antimicrobiana do composto carvacrol e do seu isômero timol frente as bactérias *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* e células de *Brochothrix thermosphacta* no invólucro celular, está relacionada com perda da integridade da membrana e liberação de prótons, que foram confirmadas por alterações consideráveis do perfil de ácidos graxos das células destes microrganismos e também devido a ocorrência de modificações estruturais das células. Diferentemente do que foi observado por Helander *et al.*, 1998, Ultee *et al.*, 1999 ao avaliar como o carvacrol causava alterações na membrana das bactérias de *Bacillus cereus* por ensaios de luminescência e de fotometria de chama, verificaram-se que a exposição ao carvacrol leva a uma diminuição da concentração ATP<sub>intracelular</sub>, mas não um aumento proporcional de ATP<sub>extracelular</sub>. Sendo assim, o carvacrol não aumenta a permeabilidade da membrana para o ATP, mas possibilita apenas a passagem para prótons K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> através das membranas, intensificando assim a sua permeabilidade e consequentemente prejudicando os processos essenciais para as células.

As atividades antimicrobianas dos monoterpenos também estão associadas aos seus grupos funcionais. Os estudos de Ultee *et al.* (2002) com bacterias *B. cereus*, mostraram que o efeito antibacteriano do timol e do carvacrol é devido a grande parte,



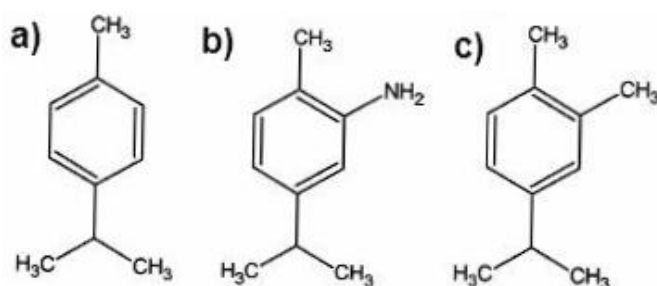
ao seu grupo hidroxila, o qual funciona como um transportador transmembranar de cátions monovalentes, responsáveis pelo crescimento das células. O mesmo foi demonstrado por Ben Arfa *et al.* (2006) ao analisarem a relação entre a estrutura química e a capacidade antimicrobiana do carvacrol e de seus dois derivados, carvacrol metil éter e o acetato de carvacrila (Figura 2), frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus plantarum*, em que a presença do grupo OH livre se mostrou fundamental para a atividade antibacteriana do composto, visto que os compostos sintetizados não foram eficazes como agentes antibacterianos para os microrganismos testados. Os autores sugeriram que o carvacrol possui atividade antimicrobiana relacionada com as suas características hidrofóbicas adequadas, permitindo a acumulação do composto na membrana celular, devido a sua capacidade em fazer ligação de hidrogênio e liberar prótons, induzindo a modificação da conformação da membrana e resultando assim na apoptose celular. No entanto, a ausência do grupo hidroxila livre na estrutura do carvacrol metil éter e o acetato de carvacrila não permite que ocorra a troca de prótons entre os compostos e a membrana, e assim não modifiquem sua permeabilidade.



**Figura 2:** Estrutura molecular (a) carvacrol metil éter e (b) acetato de carvacrila (Ben Arfa *et al.* 2006).

No entanto, no mesmo ano, estudos realizados por Veldhuizen *et al.* (2006) tendo como base a remoção e substituição do grupo hidroxila (OH) da estrutura do carvacrol, inferiram que este grupo não é essencial para a sua atividade antibacteriana, mas possui características especiais que favorecem a sua ação. Os resultados demonstraram uma variação da atividade antimicrobiana do carvacrol frente às bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 6538) com a troca do ligante hidroxila. Ao remover o grupo hidroxila da molécula de carvacrol originando o p-cimeno, os autores observaram que este perdeu totalmente a sua capacidade antibacteriana, provavelmente devido a possível perda da solubilidade. Porém, ao se

substituir a OH a hidroxila por um grupamento amino, formando o 2-amino-*p*-cimeno, este apresentou perda parcial de sua atividade, uma vez que não foi afetada a estrutura espacial e a solubilidade do composto. No entanto, quando realizaram a substituição do grupo hidroxila do carvacrol dando origem ao 3,4-dimetilcumeno, este perdeu parcialmente a sua capacidade antibacteriana, provavelmente devido à redução da solubilidade em meio aquoso por estas moléculas o que limita a capacidade de permeação da membrana bacteriana. A Figura 3 mostra as diferentes moléculas sintetizadas a partir da substituição e da retirada do grupamento hidroxila da molécula de carvacrol.



**Figura 3:** Estutura molecular (a) *p*-cimeno, (b) 2-amino-*p*-cimeno e (c) 3,4-dimetilcumeno (Veldhuizen *et al.*, 2006).

A atividade antibacteriana que os óleos essenciais apresentam pode ter relação com apenas um dos seus principais constituintes químicos como já foi descrito anteriormente, porém estudos demonstram que está atividade não dependem apenas dos seus principais constituintes ativos, mas também das interações entre eles. Alguns testes realizados por Michiels *et al.* (2007) relataram atividades antimicrobianas sinérgicas da combinação carvacrol + timol quando testados em simulações de fermentação *in vitro* no tubo digestivo dos suínos. Os resultados demonstraram que a combinação carvacrol + timol possui um maior efeito antibacteriano que a soma dos efeitos de cada agente separado contra *E. coli* e *Lactobacillus spp.* García-García *et al.* (2011) também observaram que atividade antibacteriana das misturas binárias carvacrol e timol frente a *Listeria innocua* apresentam sinergismo, atribuídos a uma maior interação entre os compostos e a membrana plasmática do microrganismo, ocasionando um aumento significativo da permeabilidade da membrana e conseqüentemente, a perda de lipopolissacarídeos essenciais para o funcionamento celular do microrganismo.

## 2.3 Atividades antifúngicas

Há uma grande necessidade em saber os mecanismos de ação dos compostos timol e carvacrol frente aos fungos, devido à resistência que estes estão apresentando aos antibióticos e antifúngicos convencionais, favorecendo a utilização destes produtos naturais. Sendo assim, Braga *et al.* (2008) realizaram testes com o propósito de observar como o timol interfere na formação do biofilme fúngico frente às estirpes de *Candida albicans*. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência demonstraram que o principal mecanismo de ação antifúngica do composto se deve a este alterar as estruturas 3D dos biofilmes de forma dependente da concentração (CMI de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os autores observaram que quase todas as células de controle possuíam emissão fluorescente verde, enquanto que após a incubação com timol a  $1/2 \times$  CMI,  $1 \times$  CMI e  $2 \times$  CMI houve a redução da quantidade de células e alterações em suas formas filamentosas com a presença de glóbulos vermelhos, restando apenas poucas células verdes viáveis. De forma similar Romero *et al.* (2009) também atribuíram a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho perante os fungos fitopatogênicos *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium moniliforme* aos seus compostos carvacrol e o timol que apresentam a capacidade em causar danos à membrana citoplasmática. Juven *et al.* (1994) atribuíram esta capacidade as ligações que estes compostos podem realizar por meio de suas OH com os grupos amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas, o que ocasiona uma alteração da permeabilidade destas membranas, levando a liberação do conteúdo celular.

Rao *et al.* (2010) também avaliaram os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, observando que além destes compostos possuírem a capacidade em facilitar a troca de íons no meio celular dos fungos, como a entrada de  $\text{H}^+$  e  $\text{K}^+$ , aumentando assim a permeabilidade da membrana e dificultando a sobrevivência da célula por atrapalhar os processos essenciais como o transporte de elétrons, estes também impedem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos compartimentos celulares. Ahmad *et al.* (2011) também estudaram os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol, em relação as alterações causadas na permeabilidade da membrana celular de espécies de *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, bem como cepas padrão de *Candida albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos exibem atividade fungicida

através da alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, como resultado da inibição da biossíntese do ergosterol de um modo semelhante ao fluconazol. Recentemente, Chavan *et al.* (2014) também verificaram com marcações de iodeto de propídio (IP) que o mecanismo fungicida destes compostos contra as leveduras naturais das uvas, *Metchnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Dekkera bruxellensis*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Debaryomyces hansenii* se deve a ocorrência de danos à membrana e a redução do ergosterol da membrana celular.

De forma semelhante ao verificado para as bactérias, Ben Arfa *et al.* (2006) observaram que a atividade antifúngica dos monoterpenos também está relacionada com a presença do grupo OH livre, em que os derivados carvacrol metil éter e o acetato de carvacrila, não foram eficazes como agentes antifúngicos para quase todas as concentrações avaliadas frente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando apenas uma pequena inibição pelo composto carvacrol metil éter na concentração máxima testada de 3,00 g. L<sup>-1</sup>.

## 2.4 Atividades inseticidas

Estudos têm demonstrado que o timol e o carvacrol apresentam atividades não apenas contra microrganismos, mas também apresentam efeitos sobre insetos. Estudos *in vitro* realizados por Lindberg *et al.* (2000) demonstraram que o timol apresenta elevada eficiência no controle do ácaro *Varroa jacobsoni* causando mortalidade em (> 70%) e baixa toxicidade às abelhas (<30%), um fator importante para utilização do composto. Por essa razão torna-se necessário saber o modo de ação destes compostos, que estão sendo estudados quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), o principal mecanismo de ação de muitos pesticidas químicos sintéticos pertencentes as classes dos organofosforados e carbamatos.

Dessa forma, a inibição da AChE foi avaliada como possível mecanismo de ação do carvacrol em artrópodes por Anderson & Coats (2012), demonstrando que este composto possui atividade inibitória desta enzima em moscas, carrapatos e baratas. Além do carvacrol, estudos também indicam a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo composto timol. Jukic *et al.* (2007) por meio de seus estudos observaram que o composto timol apresenta a capacidade de inibir a AChE, porém em níveis menores que os observados para o carvacrol, sugerindo que a posição do grupo hidroxila na estrutura molecular do composto desempenha papel importante para o efeito inibidor da AChE.

Outros estudos também foram realizados para investigar a atividade inseticida do carvacrol. Tong *et al.* (2013), realizaram seus ensaios levando em consideração a hipótese de ligação do carvacrol com os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) em insetos, onde os resultados demonstraram que o composto apresenta uma inibição da ligação [ $^{14}\text{C}$ ]-nicotina de forma dependente da concentração numa preparação de membranas de mosca contendo os receptores neuronais da acetilcolina nAChR.

## 2.5 Atividades sob o sistema nervoso

Os compostos timol e o carvacrol vêm apresentando significativa atividade ansiolítica e antidepressiva. Em que o principal modo de ação destes compostos estão sendo relacionados com uma ação nos neurônios GABAérgicos através do receptor do tipo GABA A, de forma similar aos benzodiazepínicos que possuem alta afinidade por estes receptores. Melo *et al.* (2010) observaram por meio de testes realizados em camundongos que a administração por via oral do carvacrol favorece a diminuição da ansiedade, visto que de forma similar ao diazepam ocorreu um aumento significativo de todos os parâmetros analisados pelo teste da cruz elevada (número de entradas e total de entradas nos braços abertos e fechados) e sem promover efeitos na atividade locomotora. Os resultados demonstraram que o efeito ansiolítico do composto está relacionado com ação que este apresenta no receptor GABA<sub>A</sub> de forma similar os benzodiazepínicos. Outros estudos realizados sugerem que a ação farmacológica dos dois isômeros estão relacionadas com a capacidade que estes possuem em modular os receptores inotrópicos GABAérgicos juntamente com canais de Cl<sup>-</sup>. Uma vez que a ligação dos monoterpenos ao GABA no sistema nervoso aumentaram significativamente a absorção de  $^{36}\text{Cl}^-$ . (Tong & Coats, 2010) A avaliação dos efeitos antidepressivos da administração do carvacrol em camundongos, demonstraram que o composto apresenta atividade antidepressiva associada ao sistema dopaminérgico, provavelmente pelo estímulo dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. (MELO *et al.*, 2011)

Além disso, o carvacrol e o timol foram capazes de diminuir a excitabilidade no sistema nervoso periférico por meio do bloqueio do potencial de ação composto (PAC). Gonçalves *et al.* (2010) relacionaram este efeito inibitório dos compostos com a capacidade de bloqueio dos canais de sódio dependentes da voltagem (NaV) no nervo ciático. Os autores observaram que essa capacidade de bloqueio varia em relação à estrutura dos compostos, visto que os isômeros carvacrol e timol apresentaram efeito inibitório maior em relação ao limoneno que não possui oxigênio ou hidroxila. A

capacidade que estes compostos possuem em alterar as suas características por meio da modificação de seus ligantes aumentam a sua aplicabilidade, uma vez que através da alteração dos substituintes de suas estruturas químicas, pode-se conduzir os fármacos diretamente ao alvo sem afetar outros organismos. Apesar dos estudos realizados por estes autores levantarem a suposição que a redução da excitabilidade induzida pelo carvacrol, ocorre através da inibição dos NaV de forma semelhante a um anestésico local, os autores não realizaram testes para comprovar tal ação. Tendo em vista tal suposição, estudos adicionais foram conduzidos de forma a avaliar os mecanismos pelos quais o carvacrol promove este efeito sobre o sistema nervoso periférico. Para tal, foram realizados vários testes por meio dos quais pôde se demonstrar que o carvacrol é capaz de bloquear reversivelmente, e de forma dependente da concentração a excitabilidade dos neurônios, e que essa redução ocorre devido ao bloqueio da geração dos potenciais de ação ao mesmo tempo em que ocorre um aumento inicial de corrente (Joca *et al.*, 2012).

## 2.6 Atividades anti-inflamatórias

Vários estudos estão sendo realizados para elucidar os mecanismos de ação dos compostos timol e carvacrol, que já são utilizados para o tratamento da dor e inflamação. Guimarães *et al.* (2012) ao avaliarem o mecanismo de ação anti-inflamatória do carvacrol no organismo de camundongos com hipernocicepção induzida pela carragenina, atribuíram sua atividade anti-inflamatória a inibição da formação do mediador inflamatório citocina inflamatória TNF- $\alpha$  e a modulação das vias centrais de óxido nítrico NO, não sendo observado nenhum efeito por prostaglandina E2 (PGE2) e dopamina. Nos estudos realizados por Liang & Lu (2012) também ficou demonstrado que o principal mecanismo de ação anti-inflamatória do timol está relacionado com a sua capacidade de inibir a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que estão associados com a via colinérgica, uma vez que a liberação da acetilcolina favorece a inibição das citocinas inflamatórias (De Simone *et al.*, 2005), além da modulação realizada nas vias centrais de óxido nítrico NO e pela eliminação da expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Hotta *et al.* (2010) também comprovaram que o carvacrol possui atividade anti-inflamatória associada em supressão da enzima COX-2 e ativação dos receptores proliferadores de peroxissoma (PPARs)  $\alpha$  e  $\gamma$ .

Entretanto, estudos realizados por Lima *et al.* (2013) demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios que o carvacrol apresenta estão associados com a diminuição da

produção dos mediadores inflamatórios, interleucina-1  $\beta$  (IL- 1  $\beta$ ) e (PGE2) e provavelmente por meio do estímulo à liberação de interleucina-10 (IL-10), que atua como uma citocina anti-inflamatória eficaz, ocultando a ativação da função das células imunológicas, impedindo seletivamente a manifestação de citocinas pró-inflamatórias.

## 2.7 Atividades apresentadas como promotores de permeação na pele

Estudos recentes estão avaliando a capacidade que os compostos possuem em promover a permeação na pele quando incorporados numa formulação transdérmica, diminuindo assim a resistência da pele em incorporar o fármaco. O timol e o carvacrol têm se destacados como potenciadores de permeação na pele, e devido ao fato de serem eficazes e seguros, por possuírem bons perfis toxicológicos e pouca irritação cutânea em baixas concentrações, o interesse da aplicação destes compostos tem sido cada vez maior. Diante disso estudos buscam investigar os mecanismos de ação do timol e do carvacrol como promotores de permeação. Chantasart *et al.* (2009) perceberam que estes compostos possuem a capacidade de passar pelos caminhos lipoidais da membrana do epidérmico humano (HEM) utilizando a via lipoidal no extrato córneo (EC), melhorando o seu potencial ( $E_{HEM}$ ) sobre o transporte do hormônio corticosterona. Verificou-se também que os valores de absorção do timol e o carvacrol foram semelhantes no HEM e no EC. Além disso, foi observado que os compostos foram melhores em comparação aos potenciadores de alcanos de cadeia ramificada e apresentaram potencial semelhante ao induzido pelo o  $\beta$ -estradiol, comparando com estudos anteriores realizados por Williams & Barry (1991a) e Williams & Barry (1991b).

Vaddi *et al.* (2002) também atribuíram o aumento da permeação por carvacrol no fármaco haloperidol (HP) a um aumento gradual da permeabilidade da membrana, devido à redistribuição lenta de carvacrol dentro estrato córneo (EC). Ao analisar o espectro infravermelho do EC tratado com o carvacrol, os autores observaram uma diminuição da altura e da área das bandas relacionadas aos estiramentos  $CH_2$ , que ocorrem devido às vibrações de hidrocarbonetos de cadeia longa, se comparado com o EC que não foi tratado com carvacrol, indicando que os lipídios foram extraídos a partir do EC pelo composto, sendo que a altura e a área destas bandas são proporcionais à quantidade de lipídios presentes, quaisquer extrações de lipídios do EC resultam em uma diminuição na altura ou na área das bandas.

De forma semelhante ao carvacrol o timol também tem sido relatado quanto as suas funções como promotor da permeação de fármacos na pele. Estudos realizados

por Soliman et al. (2014) analisaram o poder de mediação da administração transdérmica do fármaco anti-inflamatório meloxicam por timol. Sendo demonstrado que o timol apresenta uma significativa potencialidade para a permeação e absorção pela pele de meloxicam relacionado com o aumento da solubilidade lipídica da mistura em relação ao fármaco sozinho.

## 2.8 Atividades sobre o estresse oxidativo

Segundo Kielland *et al.* (2009) espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e óxido nítrico (NO) são produzidas normalmente pelo organismo e liberadas no espaço extracelular por enzimas com a função de sinalização celular e regulação de diversos processos fisiológicos. Entretanto, a produção excessiva destas espécies podem perturbar a sinalização celular e ocasionar danos oxidativos a lipídeos, proteínas e ao DNA, comprometendo assim as suas funções normais. Horváthová *et al.* (2006) ao avaliarem a citotoxicidade dos constituintes carvacrol e timol ou de suas combinações com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em células de hepatoma HepG2 e de carcinoma de cólon (Caco-2) utilizando a técnica de exclusão de azul de tripano e de eletroforese em gel de célula única, perceberam que o carvacrol e o timol isoladamente possuem a capacidade de causar rupturas nas fitas de DNA das células. Entretanto, em combinação com  $H_2O_2$  estes apresentam a capacidade de proteger o DNA dos danos causados por  $H_2O_2$ . Assim, os autores sugeriram que o carvacrol e o timol não exibem efeitos toxicológicos relacionados com a ruptura das fitas de DNA. Colaborando com os resultados observados anteriormente Horváthová et al. (2007) também avaliaram a citotoxicidade do timol e do carvacrol e de suas combinações com  $H_2O_2$  contra outro tipo de células, as leucêmicas K-562, em que os resultados comprovaram que os compostos, carvacrol e timol isoladamente são tóxicos as estas células com  $CI_{50}$  de aproximadamente 150-200  $\mu M$  e 400-500  $\mu M$ , respectivamente. No entanto, também foi verificado que estes compostos combinados com  $H_2O_2$  conduzem a uma proteção significativa das células para os danos induzidos pela espécie reativa de oxigênio ao DNA.

Similarmente, Slamenova *et al.* (2007) também comprovaram pelo ensaio de exclusão do azul de tripano que os compostos timol e carvacrol oferecem proteção as linhagens de células de hepatoma humano HepG2, cólon humano Caco-2 e de fígado V79 contra o estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio, visto que em concentrações  $CI_{20-40}$  timol (25, 50, 100, 150, 200  $\mu M$ ; HepG2) e (50, 100, 150, 200 e



300  $\mu\text{M}$ ; Caco-2); timol (100, 250, 450 e 500  $\mu\text{M}$ ; HepG2) e (100, 250, 450, e 600  $\mu\text{M}$ ; Caco-2) os compostos estudados não apresentaram nenhum efeito prejudicial ao DNA, mas reduziram o nível de lesões causadas por peróxido de hidrogênio (250  $\mu\text{M}$ ), sendo que ao analisar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  isoladamente houve um aumento da indução de ruptura das cadeias de DNA de todas as células analisadas. Ao encontro a estes resultados, Aydin *et al.* (2005) verificaram que os compostos timol e o carvacrol induzem lesões ao DNA em concentrações acima de 0,1 mM para o timol e de 0,05 mM para o carvacrol, quando comparado com o controle negativo (DMSO a 1%) e que o número de células danificadas foram significativamente reduzidas quando os linfócitos foram incubadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  / timol e  $\text{H}_2\text{O}_2$  / carvacrol em concentrações de 0,0005 mM a 0,1 mM.

Aristatile *et al.* (2010) analisaram o efeito protetor do carvacrol contra o estresse oxidativo e o dano de DNA causado por irradiação ultravioleta em linfócitos de sangue humano, e constataram que a irradiação UVB diminui significativamente os níveis da enzima glutathiona (GSH), vitamina C e vitamina E, quando comparados com linfócitos normais. No entanto, nos grupos pré-tratados com o carvacrol ocorreu um aumento significativo dos níveis de GSH, vitamina C e vitamina E. Constatando que estes compostos conferem proteção à radiação UVB, diminuindo a peroxidação lipídica através da análise de substância TBA-reactiva, o estresse oxidativo e danos no DNA em células linfocitárias humanas.

## 2.9 Atividades anticancerígenas

Além da capacidade destes compostos de prevenir os danos oxidativos causados por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao DNA, vários estudos foram realizados com a finalidade de analisar a capacidade e os mecanismos de ação destes compostos contra diferentes células tumorais. Yin *et al.* (2012) observaram que o carvacrol induz a apoptose de células de hepatoma HepG2 de humanos pela ativação da caspase-3, clivagem da proteína PARP e diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Além disso, observou-se que o composto aumenta os níveis de fosforilação da proteína quinase MAPK, sugerindo que o seu mecanismo de ação pode ocorrer pela ativação direta da proteína quinase ativada por mitógeno MARK. De forma similar Arunasree (2010) investigaram o mecanismo de apoptose celular induzida por carvacrol em outro tipo de células, as de câncer de mama MDA-MB 231, demonstrando que este composto induz a apoptose celular pela interrupção do ciclo celular na fase S, aumento das células positivas anexina V, decréscimo no potencial de membrana mitocondrial, aumento na liberação

de citocromo c nas mitocôndrias, diminuição da relação das proteínas Bcl2 / Bax, aumento da atividade da caspase, clivagem da proteína PARP e fragmentação do DNA.

De forma similar ao carvacrol estudos indicam que o seu isômero timol também apresenta toxicologia para algumas células cancerígenas. Estudos realizados por Satooka & Kubo (2012) demonstraram que o timol apresenta citotoxicidade moderada em células de melanoma B16-F10 devido à capacidade que este composto apresenta em produzir um intermediário estável, o radical fenoxilo, que fornecem radicais livres e derivados oxidados de quinonas, que estão associados com a morte de células de melanoma. Os autores conseguiram reverter esta toxicologia utilizando a L-cisteína, que funcionou como um nucleófilo capaz reagir como um receptor por adição de Michael. Assim, tanto a formação de radicais quanto de óxidos tóxicos podem estar envolvidos no mecanismo de toxicidade do timol. Deb Dipanwita *et al.* (2011) também avaliaram o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade do timol contra outro tipo de célula, as leucêmicas HL-60 e as células não tumorais humanas PBMCs. Os resultados demonstraram que timol apresentou citotoxicidade para células HL-60 e não para as de PBMC, sendo o mecanismo de ação devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ) pelas mitocôndrias, alteração do potencial de membrana mitocondrial, redução dos níveis da proteína Bcl-2, aumento nos níveis da proteína Bax e ativação das caspases 8, 9 e 3.

Com o intuito de avaliar os mecanismos de ação dos compostos timol e o carvacrol Jaafari *et al.* (2012) realizaram seus estudos frente às células de tumor P-815 (mastocitoma murino), K-562 (leucemia mieloide crônica humana), CEM (leucemia *linfoblástica* aguda T), MCF-7 (denocarcinoma *mamário* humano) e a sua resistência a gemcitabina (MCF-7 gem). Os resultados demonstraram que os efeitos dos compostos ocorrem no bloqueio da progressão do ciclo celular, sendo o do carvacrol na fase S e do timol na fase G0 / G1, sugerindo que o mecanismo molecular de citotoxicidade observada pelos compostos é mais complexo e não estão apenas associados ao ciclo celular.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos timol e carvacrol são uma alternativa promissora para diversas aplicações biológicas. As características destes compostos, como por exemplo, a baixa toxicidade, solubilidade e a facilidade de obtenção, são os principais fatores responsáveis pelo destaque dado a esses monoterpênicos aromáticos.

Devido a grande importância destes compostos, um grande número de artigos que avaliam os seus mecanismos de ação utilizando diversas técnicas e metodologias têm sido publicadas. Nota-se um maior número de estudos, relacionados à atividade antimicrobiana destes constituintes, uma vez que há uma maior preocupação com os possíveis danos à saúde e a resistência em que os microrganismos estão apresentando aos fármacos tradicionalmente utilizados. Os estudos mostram que o principal mecanismo de ação antimicrobiano destes compostos se deve aos efeitos prejudiciais a membrana celular dos microrganismos.

O timol e o carvacrol também estão sendo descritos como vantajosos no controle de pragas, não apenas de insetos, mas também de artrópodes, em que o principal modo de ação está relacionado com a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).

Os dados relatados também sugerem um bom potencial terapêutico para estes monoterpenos, apresentando significativa atividade ansiolítica e antidepressiva, relacionadas com a capacidade que estes apresentam em modular os receptores GABAérgicos.

Os efeitos benéficos desses compostos também estão associados ao tratamento de condições dolorosas, como as inflamações, em que foram demonstrados que os compostos são vantajosos em estimular a liberação de citocinas anti-inflamatórias, que suprimem a ativação dos mediadores inflamatórios das células do sistema imunológico, além de modular as vias centrais que controlam a dor, a de óxido nítrico.

Esses compostos por possuírem bons perfis toxicológicos e pouca irritação cutânea, em baixas concentrações, estão sendo preferidos em relação aos materiais sintéticos, utilizados tradicionalmente como promotores da absorção percutânea de formulações de diferentes drogas e para o tratamento de câncer. Sendo capazes de facilitar a permeação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, devido ao aumento da permeabilidade da membrana que esses oferecem ultrapassando assim a barreira do estrato córneo e por possuírem propriedades relacionadas à proteção aos danos causados ao DNA de células tumorísticas.

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ahmad, A.; Khan, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 30, 41-50, **2011**.

Anderson, J.A.; Coats, J.R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pestic. Biochem. Phys.*, 102,124 – 128, **2012**.

Aristatile, B.; Al-Numair, K.S.; Veeramani, C. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 00, 1-11, **2010**.

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

Aydın, S.; Basaran, A.A.; Basaran, N. Modulating Effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 1299–1305, **2005**.

Ben Arfa, A.. Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gonterd, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 149-154, **2006**.

Braga, P.C.; Culici, M.; Alferi, M.; Dal Sasso, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 31, 472–477, **2008**.

Chantasart, D.; Pongjanyakul, T.; Higuchi, W. I.; Li, S. K.; Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. *J. Pharm. Sci.*, 98, 3617–3632, **2009**.

Chavan, P.S.; Tupe, S.G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food. Control*, 46, 115–120, **2014**.

Cristani, M.; d'Arrigo, M.; Mandalari, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Micieli, D.; Venuti, V.; Bisignano, G.; Saija, A.; Trombetta, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6300-6308, **2007**.

De Simone, R.; Ajmone-Cat, M. A.; Carnevale, D.; Minghetti, L. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. *J. Neuroinflammation*, 2, 4, **2005**.

De Vincenzi, M.; Stamatii, A.; De Vincenzi, A.; Silano, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75, 801-804, **2004**.

Deb Dipanwita, D.; Parimala, G.; Devi, S.; Chakraborty, T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem. Biol. Interact.*, 193, 97–106, **2011**.

Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D.; Mauriello, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4863–4870, **2007**.

Dubey, V.S.; Bhalla, R.; Luthra, R.; An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.*, 28, 637–646, **2003**.

Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Scheffer, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag J*, 23, 213–226, **2008**.

Friedrich, C. Pharmacists in German Cultural History. *An. Real Acad. Farm.*, 80, 600-613, **2014**.

García-García, R.; López-Malo, A.; Palou, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *J. Food Sci.*, 76, 95-100, **2011**.

Gill, A.O.; Holley, R.A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 170–174, **2006**.

Gonçalves, J.C.R.; Alves, A.M.H.; Araújo, A. E. V.; Cruz, J.S.; Araújo, D.A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 645, 108–112, **2010**.

Guimarães, A.G.; Xavier, M.A.; Santana, M.T.; Camargo E.A.; Santos, C.A; Brito, F.A.; Barreto, E.O.; Cavalcanti, S.C.H.; Antonioli, A.R.; Oliveira, R.C.M. Quintans-Júnior, L.

J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 385, 253–263, **2012**.

Hammer K.A.; Heel K.A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in *Staphylococci* and *Enterococci*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 40, 239-45, **2012**.

Helander, I.M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M.; Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food. Chem.*, 46, 3590–3595, **1998**.

Holland, R.D.; Wilkes, J.G.; Cooper, W.M.; Alusta, P.; Williams, A.; Pearce, B.; Beaudoin, M.; Buzatu, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 28, 2617–2626, **2014**.

Horváthová, E.; Sramková, M.; Lábaj, J.; Slamenová, D. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27, 44–47, **2006**.

Horváthová, E.; Turcaniova, V.; Slamenova, D. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54, 478–483, **2007**.

Hotta, M.; Nakata, R.; Katsukawa, M.; Hori, K.; Takahashi, S.; Inouem, H.J. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma, and suppresses COX-2 expression. *Lipid Res.*, 51, 132–139, **2010**.

Jaafari, A.; Tilaoui, M.; Ait Mouse, H.A. Rakib. M.; M'barek, L.A.; Tilaoui, M.; Benbakhta, C.; Boulli, A.; Abbad, A.; Zyad, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis, *Rev. Bras. de Farmacogn.*, 22, 534–540, **2012**.

Joca, H.C.; Cruz-Mendes, Y.; Oliveira-Abreu, K.; Maia-Joca R.P.; Barbosa, R.; Lemos, T.L.; Beirão, P.S.L.; Leal-Cardoso, J.H. Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. *J. Nat. Prod.*, 75,1511–1517, **2012**.

Jukic, M.; Politeo, O.; Maksimovic, M.; Milos, M.; In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.*, 21, 259–61, **2007**.

Juven, B.J.; Kanner, J.; Schued, F.; Weisslowicz, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 626-631, **1994**.

Kielland, A.; Blom, T.; Nandakumar, K.S.; Holmdahl, R.; Blomhoff, R.; Carlsen, H. In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 760–766, **2009**.

La Stora, A.; Ercolini, D.; Marinello, F.; Di Pasqua, R.; Villani, F.; Mauriello, F. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Res. Microbiol.*, 162, 164-172, **2011**.

Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.; Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453–462, **2001**.

Liang, W.Z.; Lu, C.H. Carvacrol-induced  $[Ca^{2+}]$  rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sci.*, 90, 703–11, **2012**.

Lima, M.S.; Quintans-Junior, L.J.; De Santana W.A.; Kaneto, C.M.; Soares, M.B.P.; Villarreal, C.F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur. J. Pharmacol.*, 699, 112–117, **2013**.

Lindberg, C. M.; Melathopoulos, A. P.; Winston, M. L. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.*, 93, 189-198, **2000**.

Melo F.H.C.; Venâncio E.T.; De Sousa D.P.; Fonteles M.M.F.; De Vasconcelos S.M.M.; Viana G.S.B.; De Sousa F.C.F. Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 437–443, **2010**.

Melo, F.H.C.; Moura, B.A.; De Sousa, D.P.; De Vasconcelos, S.M.M.F; Macedo, D.S.; Fonteles M.M.; Viana G.S.B.; De Sousa, F.C.F. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 25, 362–367, **2011**.

Michiels, J.; Missotten, J.; Fremaut, D.; De Smet, S.; Dierick, N. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livest. Sci.*,109, 157–160, **2007**.

Nostro, A.; Papalia, T.; Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 7, 28-35, **2012**.

Peixoto-Neves D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-De-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 341-350, **2010**.

Rao, A.; Zhang, Y.; Muend, S.; Rao, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 5062–5069, **2010**.

Romero, A.L.; Specian, V.; Oliveira, R.C.; Diniz, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 11,15-8, 2009.

Satooka, H.; Kubo, I.; Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2746–2752, **2012**.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P; Mentz, L.A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, **2004**.

Soliman, M.S.; Gholamhossein, Y.; Farhad, M.; Fatemeh, A. Meloxicam transdermal delivery: effect of eutectic point on the rate and extent of skin permeation. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 17, 112-8, **2014**.



Slamenova, D.; Horvathova, E.; Sramkova, M.; Marsalkova, L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, 54, 108–12, **2007**.

Tong, F.; Coats, J.R. Effects of monoterpenoid insecticides on [<sup>3</sup>H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake in American cockroach ventral nerve cord, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 98, 317–324, **2010**.

Tong, F.; Gross, A.D.; Dolan M.C.; Coats J.R. The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. *Pest. Manag. Sci.*, 69, 775–780, **2013**.

Ultee, A.; Bennink, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568, **2002**.

Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Smid, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4606–4610, **1999**.

Vaddi, H.K.; Ho, P.C., Chan, S.Y. Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Sci.*, 91,1639–1651, **2002**.

Veldhuizen, E.J.A.; Bokhoven, J.L.M.T.-v.; Zweijtzer, C.; Burt, S.A.; Haagsman, H.P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1874–1879, **2006**.

Xu, J.; Zhou, F.; Ji, B.P.; Pei, R.S.; Xu, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 174–179, **2008**.

Williams, A.C.; Barry, B.W. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm. Res.*, 817–24, **1991 (a)**.

Williams, A.C, Barry, B.W. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (estradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. *Int. J. Pharm.*, 74, 157–168, **1991 (b)**.

Yin, Q.H.; Yan, F.X.; Zu, X.Y.; Wu, Y.H.; Wu, X.P.; Liao, M.C.; Deng, S.W.; Yin, L.I.; Zhuang, Y.Z. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64: 43–51, **2012**.