

ARTIGO ORIGINAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ESQUISTOSSOMICIDA DO CARVACROL EM
EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Neusa Araújo, Flavia Fernanda Bubula Couto, Carlos Leomar Zani e Naftale Katz

RESUMO

A atividade esquistossomicida do carvacrol e do acetato de carvacrol foi avaliada utilizando-se camundongos Swiss, com peso aproximado de 20g, infectados com cercarias de *Schistosoma mansoni*. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados conforme a metodologia descrita no tópico específico do presente artigo. Nos dois experimentos *in vitro*, as concentrações foram de 4 µg/mL ou 8µg/mL. Nas experiências *in vivo*, um grupo de dez animais foi tratado, por via oral, com 300mg/kg durante cinco dias consecutivos e, em outros dois grupos também de dez animais, foram administradas, por via oral, as doses únicas de 15 mg/kg ou 30 mg/kg. Os dois compostos mostraram-se ativos na concentração de 4µg/mL, causando a morte dos vermes adultos de *S. mansoni* em menos de 24 horas de contato, quando os testes foram realizados *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, considerados os três esquemas terapêuticos utilizados, não se observou diferença significativa na eficácia dos compostos. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que os compostos estudados são viáveis para estudos *in vitro*, mas não apresentam atividade *in vivo*, indicando que testes *in vitro* não são suficientes para caracterizar um agente esquistossomicida. A falta de atividade *in vivo* sugere que estes compostos, na forma utilizada, não podem ser considerados como esquistossomicidas para uso clínico. É importante ter em mente que, apesar de útil, a abordagem *in vitro* é uma simulação da realidade, mas, definitivamente, uma abordagem não substituirá a outra.

DESCRITORES: *Schistosoma mansoni*; esquistossomose; quimioterapia.

ABSTRACT

Evaluation of Schistosomal Activity of Carvacrol in *in vivo* and in *in vitro* experiments

The schistosomal activity of carvacrol and carvacrol acetate was studied using Swiss mice weighing about 20g and infected with *Schistosoma mansoni* cercariae, in *in vitro* and *in vivo* experiments, as described in this paper. Two *in vitro* experiments were performed using 4 or 8µg/mL. For the *in vivo* experiments, one group of 10 mice was treated orally with 300g/kg for five consecutive days. Two other groups with 10 mice each were treated orally with single doses of 15 and 30mg/kg respectively. Both compounds proved active, at the 4µg/mL

Centro de Pesquisa René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte. Minas Gerais, Brasil

Autor para correspondência: Neusa Araújo Pereira. Email: araujon@cpqrr.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 24/11/2015. Revisto em: 22/2/2016. Aceito em: 27/4/2016.

concentration, causing the death of adult *S. mansoni* worms in less than 24 hours for the *in vitro* tests. In the *in vivo* experiments no significant schistosomal activity was observed in the oral treatment with one 15 or 30mg/animal dose of carvacrol or carvacrol acetate or when treated with 300mg/kg during five consecutive days. In the *in vivo* experiments no significant schistosomal activity was noted considering all the chemotherapy regimens tested. We have, therefore, concluded that the compounds are effective considering *in vitro* trials, but do not present *in vivo* activity. These findings suggest that carvacrol and carvacrol acetate should not be considered schistosomicidal agents for clinical testing. It is important to bear in mind that *in vitro* trials are useful but they are a simulation of reality and one approach does definitely not replace the other.

KEY WORDS: *Schistosoma mansoni*; schistosomiasis; chemotherapy

INTRODUÇÃO

A esquistossomose, considerada pela Organização Mundial da Saúde como doença negligenciada, é uma das parasitoses humanas mais difundidas no mundo. Existem, aproximadamente, 600 milhões de pessoas vivendo em área de risco e, em 76 países, há pelo menos 210 milhões de pessoas infectadas por uma das diferentes espécies de *Schistosoma* que atingem o homem, especialmente na África, Ásia e América Latina (Steinmann et al., 2006). Há, mais ou menos, 35 anos o praziquantel é usado para o tratamento da esquistossomose e hoje ele é o único medicamento administrado no tratamento da doença. Entretanto, ele não previne reinfecções, logo existe a possibilidade do aparecimento de resistência em consequência de sua utilização em larga escala nos programas de controle. Já existem evidências de seleção de resistência ao praziquantel em laboratório e relatos de aumento de tolerância ao medicamento no campo, fatores esses que, aliados à dificuldade do tratamento em crianças e adultos com problemas de deglutição, evidenciam a necessidade urgente da descoberta de novos agentes esquistossomicidas (Doenhoff & Picca-Mattoccia, 2006). Muitos são os estudos com esta finalidade, nos quais se testam novos compostos naturais e sintéticos (Sayed et al., 2008), associação de medicamentos (Araújo et al., 2008a; Araújo et al., 2008b), formas mais adequadas de vetorização de medicamentos já existentes (Frezza et al., 2007; Silva et al., 2012) e se investigam os alvos apontados pelas informações geradas pela análise do genoma do *Schistosoma* (Bertrão et al.; 2012; Katz et al., 2013). Mas, até o momento, não foi encontrado um medicamento capaz de substituir o praziquantel no tratamento da esquistossomose.

O carvacrol é um fenil monoterpenoide quimicamente denominado 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, com fórmula molecular C₁₀H₁₄O e peso de 150,22 g/mol. Apresenta-se em forma líquida de coloração amarelo-clara, cuja densidade é de 0,975 g/ml (20°C). Possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, bem como pouca solubilidade em água. É considerado seguro para o consumo. Seu uso na alimentação foi aprovado

pela *Federal Drug Administration*. O Conselho da Europa incluiu-o na lista de aromas químicos que podem ser encontrados em diversos produtos de panificação, goma de mascar, condimentos, laticínios congelados, pudins, bebidas e doces (De Vicenzi et al., 2004).

A atividade dos monoterpenos está associada a seus grupos funcionais. Estudos com bactérias *B. cereus* mostraram que o efeito antibacteriano do carvacrol se deve, em grande parte, a seu grupo hidroxila que funciona como um transportador transmembranar de cátions monovalentes, responsáveis pelo crescimento das células (Ultee et al., 2002). Ben Arfa et al. (2006) analisaram a relação entre a estrutura química e a capacidade antimicrobiana do carvacrol e de seu acetato ante as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus plantarum*. A presença do grupo OH livre mostrou-se fundamental para a atividade antibacteriana do composto, uma vez 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, graças à sua capacidade de fazer ligação de hidrogênio e liberar prótons, induzindo a modificação da conformação da membrana, o que resulta na apoptose celular. No entanto, a ausência do grupo hidroxila livre na estrutura do acetato não permite que ocorra a troca de prótons entre os compostos e a membrana e, assim, não se modifica sua permeabilidade (Ben Arfa et al., 2006). Veldhuizen et al. (2006) removeram e substituíram o grupo hidroxila (OH) da estrutura do carvacrol e inferiram que este grupo não é essencial para a sua atividade antibacteriana, mas possui características especiais que favorecem sua ação. Os resultados demonstraram uma variação da atividade antimicrobiana do carvacrol ante as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 6538), com a troca do ligante hidroxila.

O acetato de carvacrol, um derivado acetilado do carvacrol, mostrou atividade esquistossomicida ao afetar a mobilidade, a viabilidade, a morfologia e a produção de ovos em experimentos realizados *in vitro*. A análise dos vermes em microscópio confocal revelou alterações no tegumento de superfície dos vermes como, por exemplo, alguns tubérculos dos quais emergiam numerosas bolhas. Experimentos com o uso do acetato de carvacrol em concentrações subletais (de 1,562 µg/mL a 6,25 µg/mL), realizados *in vitro*, inibiram a postura diária de ovos. Os autores concluíram que, por sua segurança e uso amplo na indústria, o acetato de carvacrol pode representar um passo à frente na busca por novos agentes esquistossomicidas (Moraes et al., 2013).

Oliveira et al. (2013) desenvolveram um estudo de prospecção tecnológica com ênfase em doenças negligenciadas, no qual o acetato de carvacrol constitui uma droga de comprovada atividade esquistossomicida e que pode colaborar para a erradicação das doenças negligenciadas. Os autores concluem: “Recentes avanços em compostos naturais têm sido relatados, e

nesse contexto, o acetato de carvacrolila, compreende muitas possibilidades de desenvolvimento de medicamentos potenciais às doenças que atingem as camadas sociais mais debilitadas” (p. 108). E mais: “Os achados contribuem para um crescente investimento em pesquisa com o acetato de carvacrolila no desenvolvimento de medicamentos eficazes, seguros e que permitam acesso às camadas com vulnerabilidade social” (p. 103).

Por conseguinte, este trabalho visou avaliar, experimentalmente, a atividade esquistossomicida do carvacrol e do acetato de carvacrol em experimentos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Com isso, objetivou esclarecer alguns dos aspectos controversos acerca desses dois compostos relativamente ao tratamento das doenças negligenciadas, sobretudo, a esquistossomose.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação das amostras utilizadas nos experimentos

O carvacrol foi adquirido da Sigma-Aldrich® com a seguinte identificação: W224502 _ Sampe K –Lote mkbj6205v P code1001310631.

O acetato de carvacrol foi obtido a partir de 1g de carvacrol ao qual foram adicionados 2 mL de anidrido acético e 0,5mL de piridina. A mistura foi aquecida em frasco selado a 120° C, sendo a formação do acetato monitorada por cromatografia em camada delgada. Após duas horas de reação, todo o material de partida havia sido convertido em acetato de carvacrol. O excesso de anidrido acético e piridina foram removidos a 100° C sob fluxo de nitrogênio. O rendimento da reação foi de 99%. A pureza (>99%) e a identidade do produto foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (massa calculada para C₁₂H₁₆O₂ = 192.2542Da, massa experimental 192.2539Da) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Boner & McNamar, 1968).

Experimentos in vitro

Os vermes adultos foram coletados de camundongos com 45 dias de infecção por cercárias da cepa LE de *S. mansoni*, submetidos à eutanásia utilizando-se pentobarbital sódico a 3% (300µL/camundongo) e perfundidos segundo a técnica de Pellegrino & Siqueira (1956). Cinco pares de vermes foram distribuídos em cada poço de uma placa de seis poços e mantidos em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino e 100µg/mL de penicilina/estreptomicina. Os vermes foram expostos ao carvacrol e ao acetato de carvacrol, diluídos em meio de cultura RPMI-1640 nas concentrações de 4 µg/mL e 8 µg/mL por 24 horas, e mantidos em estufa a

37°C e 5% de CO₂. Paralelamente, foram feitos dois grupos-controle, um com vermes que foram mantidos nas mesmas condições, excetuando-se a presença dos compostos em estudo, e outro com a adição de 10% de DMSO ao meio de cultura, uma vez que este foi utilizado, no mesmo percentual, como auxiliar na diluição dos compostos em teste.

Após este período, os vermes foram lavados com meio de cultura e mantidos sob as mesmas condições anteriores, porém sem adição dos produtos em teste durante o restante do ensaio. Foram realizadas observações em microscópio invertido e feitas fotografias diárias no período de 24 horas até sete dias após o início do cultivo.

Experimentos in vivo

Camundongos albinos fêmeas com o peso médio de 20 gramas (cerca de três semanas) foram infectados por via subcutânea com 100 ± 10 cercárias da cepa LE de *S. mansoni*. Aos 45 dias de infecção, foram separados em grupos constituídos por dez animais. Num primeiro experimento, considerado piloto, grupos de camundongos foram tratados durante cinco dias consecutivos, por via oral, com 300mg/kg de peso de carvacrol (1º grupo) ou acetato de carvacrol (2º grupo) e sacrificados três dias após o término do tratamento. Em outro experimento, os animais foram tratados, por via oral com carvacrol nas doses únicas de 15mg (3º grupo) ou 30mg (4º grupo) e sacrificados 15 dias após o tratamento. Um quinto grupo de dez animais foi infectado e, com exceção do medicamento, foi mantido nas mesmas condições dos grupos experimentais, como o grupo-controle da infecção. Concluído cada experimento, os animais (grupos experimentais e controle) foram submetidos à eutanásia por fratura cervical e perfundidos para a coleta e contagem dos vermes recuperados no mesentério e no fígado. Fez-se a contagem dos vermes mortos no fígado por meio de esmagamento do órgão entre duas placas de vidro, exame em microscópio estereoscópico (Pellegrino & Siqueira, 1956) e observação do oograma. Tal observação consiste em retirar um centímetro da parte distal do intestino delgado, esmagar entre lâmina de vidro e laminula de plástico e observar em microscópio óptico para classificação dos ovos em seus respectivos estádios.

Considerou-se alterado o oograma no qual estavam ausentes um ou mais estádios de desenvolvimento dos ovos viáveis (Pellegrino et al., 1962). A avaliação da atividade dos compostos baseou-se na média de vermes, na percentagem de distribuição dos vermes no mesentério e fígado, na presença de vermes mortos no fígado e no percentual de alteração do oograma nos grupos experimentais em comparação com o grupo-controle (Pellegrino & Katz, 1968).

Análise estatística

Os dados apresentados pelos grupos tratados foram comparados com os respectivos controles por meio do teste t de Student, considerando-se $p \leq 0,05$ como nível de significância.

As Normas Regimentais da FIOCRUZ para o uso de animais em experimentos foram seguidas e os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz sob o número L-018/09.

RESULTADOS

Experimentos in vitro

Os resultados apresentados no Quadro 1 mostram diferenças significativas na observação dos vermes em contato com carvacrol e acetato de carvacrol (4 e 8 $\mu\text{g/mL}$), quando comparados com o grupo-controle. Nota-se que o fármaco estudado age sobre os vermes adultos de *S. mansoni* logo nas primeiras horas de contato, uma vez que, após 24 horas, eles se apresentavam escuros, retraídos ou enrolados, imóveis. Foi também observada a ausência de ovos, ao contrário das placas do grupo-controle em que os vermes apresentavam morfologia e movimentos normais, sendo observados ovos de 1º estágio. Observações feitas até sete dias após a retirada do fármaco não mostraram recuperação dos vermes nos grupos experimentais, que foram considerados mortos. Os vermes adultos do grupo-controle ou do meio de cultura acrescido de DMSO, colocados na mesma placa de seis poços onde foram colocados os grupos experimentais (carvacrol e acetato de carvacrol), mostravam-se escuros, enrolados e imóveis, não sendo observados ovos durante todo o experimento. Repetiu-se o experimento desta vez com os vermes adultos do grupo-controle e meio de cultura mais DMSO, colocados em uma placa de seis poços diferente daquela na qual estavam os grupos experimentais, cuidando-se para que os vermes não tivessem contato com as substâncias ativas. Eles se mostraram com morfologia e movimentos normais e com ovos de 1º estágio ainda nas primeiras 24 horas de observação e, sete dias após o início do experimento, foram observados ovos em todos os estágios de desenvolvimento (Quadro 1).

As fotografias diárias feitas no período de 24 horas até sete dias após o início do cultivo podem se vistas na Figura 1.

Quadro 1. Resultados apresentados pelo carvacrol e seu acetato em ensaios *in vitro*, utilizando vermes adultos de *S. mansoni*.

Caracterização da placa	Início	24 horas após contato	24 horas após retirada	7 dias após retirada
Controle placa separada	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios.
DMSO placa separada	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios.
Carvacrol (4 e 8µg/mL)	Vermes normais	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.
Acetato de Carvacrol (4 e 8µg/mL)	Vermes normais	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.
Controle - placa de Carvacrol	Vermes normais	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.	Vermes escuros, encurtados ou enrolados. Sem movimento. Sem ovos.
DMSO – placa de carvacrol	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio.	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios.

Controle e DMSO em placa separada significa que estes grupos foram realizados em placas diferentes daquelas nas quais foram colocados os grupos experimentais.

Controle e DMSO em placa de carvacrol significa que os grupos-controle e DMSO foram colocados na mesma placa dos grupos experimentais, mas em poços diferentes.

No grupo-controle, os vermes foram colocados em contato somente com o meio de cultura.

No grupo DMSO, os vermes foram colocados em contato com o meio de cultura acrescido de DMSO, substância usada para a diluição do carvacrol.

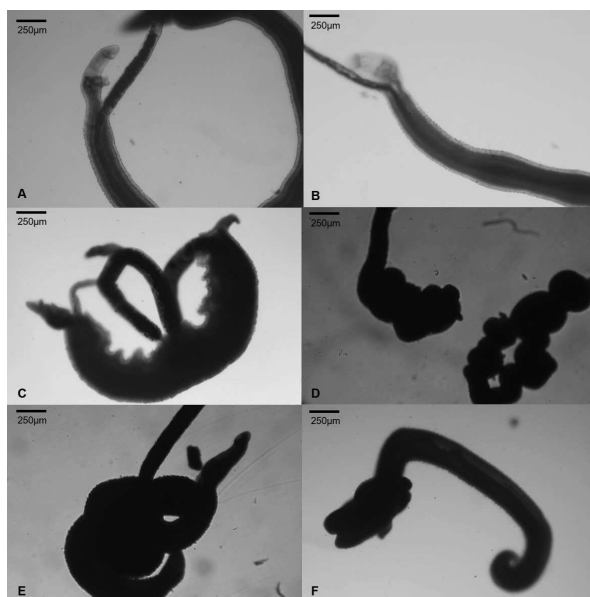


Figura 1. Experimentos *in vitro*. (A) controle em placa diferente daquela do experimento: vermes vivos, movimento e morfologia normais; (B) controle com 10% de DMSO em placa diferente daquela do experimento: vermes vivos, movimento e morfologia normais; (C) controle na mesma placa do experimento: vermes mortos, morfologia alterada; (D) controle com 10% de DMSO da mesma placa do experimento: vermes mortos, morfologia alterada; (E) carvacrol 4ul/mL: vermes mortos, morfologia alterada; (F) acetato de carvacrol: vermes mortos, morfologia alterada.

Experimentos in vivo

Os resultados das médias de vermes, distribuição, mortalidade e alteração do oograma obtidos de camundongos tratados por via oral com carvacrol e acetato de carvacrol podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2. O carvacrol, quando administrado na dose única de 30 mg por via oral, apresentou 16,3% de vermes mortos, porém com o aumento da dose para 300mg/kg/dia, durante cinco dias consecutivos, a taxa de mortalidade ficou em 5,9%. Não houve diferença significativa nos outros parâmetros considerados em estudos de atividade esquistossomicida, tais como: média de vermes, deslocamento dos vermes para o fígado e alteração do oograma.

Tabela 1. Resultados obtidos de camundongos infectados experimentalmente com 100 ± 10 cercárias da cepa LE de *Schistosoma mansoni*, tratados, aos 45 dias da infecção, por via oral, com 300mg/kg administrados durante cinco dias consecutivos, e sacrificados três dias após o término do tratamento

Fármaco	Número de animais*		Média de Vermes (\pm DP)	Distribuição de vermes (%)		Vermes mortos no fígado (%)	Alteração do oograma (%)
	Tratados	Examinados		Mesentério	Fígado		
Carvacrol	10	9	24,7(5,3)	79,7	20,3	5,9**	0,0
Acetato de carvacrol	10	9	22,0(4,8)	87,8	12,2	0,0	0,0
Controle	-	10	31,7(6,2)	88,9	11,1	0,0	0,0

* A diferença entre o número de animais tratados e o número de animais examinados corresponde ao número de animais mortos.

** $p = 0,38$

Tabela 2. Resultados obtidos de camundongos infectados experimentalmente com 100 ± 10 cercárias da cepa LE de *Schistosoma mansoni*, tratados, aos 45 dias da infecção, com carvacrol em dose única e por via oral, e sacrificados 15 dias após o tratamento

Dose (mg)	Número de animais*		Média de Vermes (\pm DP)	Distribuição de vermes (%)		Vermes mortos no fígado (%)	Alteração do oograma (%)
	Tratados	Examinados		Mesentério	Fígado		
30	5	4	25,8(5,2)	69,8	30,2	16,3**	0,0
15	5	5	28,3(5,0)	61,9	37,2	0,9	0,0
Controle	-	5	34,2(5,3)	96,5	3,5	0,0	0,0

* A diferença entre o número de animais tratados e o número de animais examinados corresponde ao número de animais mortos.

** $p = 0,13$

DISCUSSÃO

O praziquantel é, atualmente, o único medicamento disponível para o tratamento da esquistossomose e mostra eficácia alta e toxicidade baixa (Lescano et al., 2004). Entretanto, nos últimos anos, têm sido relatadas cepas de *S. mansoni* resistentes ou, pelo menos, tolerantes ao praziquantel (Botros & Bennett, 2007). Em vista disso, torna-se importante o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença. Pesquisadores vêm estudando substâncias provenientes de plantas como tratamentos alternativos para a esquistossomose (El Shenawy et al., 2008; Moraes, 2011; Sanderson et al., 2002). Experimentos realizados *in vitro* têm evidenciado diversas substâncias com atividade esquistossomicida: dermaseptina, piplartina, epiisopiloturina, lignana, piperina, entre outras (Moraes, 2011). No presente estudo, foi feita uma avaliação da atividade do carvacrol e acetato de carvacrol em experimentos *in vitro* e *in vivo* sobre o verme adulto e a postura do *S. mansoni*. Os dados apresentados mostram que tanto o carvacrol como o acetato de carvacrol, nas doses de 4 µg/mL e 8µg/mL, agiram sobre os vermes de *S. mansoni* nos experimentos realizados *in vitro*, causando a morte dos vermes em, no máximo, 24 horas de contato com os fármacos, nas duas doses utilizadas. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Moraes et al. (2013), nos quais o acetato de carvacrol na dose de 6,25µl/mL afetou a mobilidade e a viabilidade do verme adulto de *S. mansoni*, levando-o à morte. Fato interessante e digno de relato é que os vermes do grupo-controle morreram todos quando colocados na mesma placa, porém em poços diferentes daqueles onde estavam os grupos experimentais. Quando o experimento foi repetido com os vermes do grupo-controle colocados em outra placa, diferente daquela onde estavam os grupos experimentais, eles apresentaram morfologia e movimentos normais e ovos de 1º estágio ainda nas primeiras 24 horas de observação. Além disso, sete dias após o início do experimento, foram observados ovos em todos os estágios de desenvolvimento, indicando que os produtos testados são voláteis e atingem o verme em doses mínimas.

In vivo, o carvacrol e seu acetato não mostraram atividade esquistossomicida quando administrados a camundongos infectados com *S. mansoni*, na dose de 300mg/kg/dia durante cinco dias consecutivos. Neste esquema, o carvacrol apresentou 5,9% de vermes mortos no fígado, dado não significativo quando comparado com o grupo-controle (Tabela 1). Com a administração da dose única de 30mg de carvacrol, houve um pequeno deslocamento dos vermes do mesentério para o fígado e verificou-se um índice de 16,3% de vermes mortos, diferença também não significativa se comparada com o grupo tratado com 15mg do composto e com o grupo-controle (Tabela 2).

A atividade do medicamento *in vivo* depende de processos biológicos específicos do organismo, biodisponibilidade, absorção, trânsito gastrointestinal, mudança de pH e permeabilidade no trato gastrointestinal.

Os dados apresentados permitem concluir que o carvacrol e o acetato de carvacrol apresentam resultados ótimos nos experimentos *in vitro*, com 100% de mortalidade dos vermes. Entretanto, os resultados apresentados nos esquemas experimentais *in vivo* não permitem afirmar que as substâncias testadas possuem atividade esquistossomicida.

Este estudo é mais um dos que mostram que, embora os testes *in vivo* sejam responsáveis por polêmicas que envolvem a ética, é inegável que eles são necessários, pois diferenças entre a ação de compostos esquistossomicidas quando os testes são feitos *in vitro* e *in vivo* são comuns. Araújo et al. (2008a) mostraram que o clonazepam age sobre os vermes adultos de *S. mansoni* em experimentos *in vitro*, causando 100% de mortalidade. Entretanto, nos experimentos *in vivo*, o medicamento não apresentou atividade. Da mesma forma, Katz et al. (2013) mostraram atividade esquistossomicida cabal do imatinibe em ensaios biológicos realizados *in vitro* e ausência de atividade quando os ensaios foram realizados *in vivo*. Experimentos *in vivo* devem sempre ser realizados para confirmação dos resultados apresentados por testes *in vitro*. O organismo vivo tem a sua complexidade e até mesmo experimentos *in vivo* apresentam riscos: os resultados podem ser influenciados pelas condições de realização dos testes. Além disso, deve-se ter em mente os processos biológicos quando se trata de experimentos *in vivo*. É importante ressaltar que nos processos *in vitro*, o composto não sofre metabolização pelo hospedeiro, o que pode, em parte, justificar resultados tão diferentes quando os dois processos são comparados, como é o caso dos resultados aqui apresentados.

Após a descoberta de um novo fármaco promissor, por meio de estudos preliminares *in vitro* que incluem informações sobre suas propriedades físico-químicas como solubilidade, estabilidade, peso molecular, estrutura química e incompatibilidades, é obrigatória a realização de uma bateria de ensaios de triagem antes de serem iniciados estudos em humanos. Entre estes ensaios, denominados pré-clínicos, consta o estudo *in vivo* em diferentes espécies animais para a avaliação de farmacodinâmica e farmacocinética e do potencial de eficácia clínica. Estes estudos devem ser submetidos a testes toxicológicos pré-clínicos com a finalidade de avaliar a segurança de utilização do novo fármaco.

Ensaio biológicos *in vitro* e *in silico* fornecem dados para identificação da toxicidade do produto, o que é importante para a avaliação de risco. Porém, eles podem gerar dúvidas por várias razões, entre elas a ausência de formação de metabolitos ativos que somente ocorrerão após a absorção pela mucosa intestinal e metabolização *in vivo*. Este fato poderia explicar a atividade do carvacrol e seu acetato *in vitro*, mas não *in vivo* apresentada no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Araujo N, Mattos ACA, Coelho PMZ, Katz N. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 781-785, 2008a.
2. Araújo N, Mattos ACA, Sarvel AK, Coelho PMZ, Katz N. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 450-454, 2008b.
3. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gonterd N, Chalié P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* 43: 149-154, 2006.
4. Bertão HG, Silva RAR, Rádis-Baptista G, Albuquerque MCPA. Miltefosine, an alkylphosphocholine originally developed as an antitumoral, is an effective compound against *Schistosoma mansoni*. *Int J Pharm Med Bio Sc* 1: 8-20, 2012.
5. Bonner TG, McNamar p. The pyridine-catalyzed acetylation of phenols and alcohols by acetic anhydride. *J Chem Soc Phy Org* 7: 795-797, 1968.
6. Botros S, Bennett J. Praziquantel resistance. *Expert Opin Drug Discov* 2: 535-554, 2007.
7. De Vincenzi M, Stammati A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* 75: 801-804, 2004.
8. Doenhoff M, Pica-Mattoccia L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4: 199-210, 2006.
9. El Shenawy NS, Soliman MF, Reyad SI. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50: 29-36, 2008.
10. Frezza TF, Madi RR, Banin TM, Pinto MC, Souza ALR, Gremião MPD, Allegretti SM. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28: 209-214, 2007.
11. Katz N, Couto FFB, Araujo N. Imatinib activity on *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 850-853, 2013.
12. Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Amato Neto V. Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Rev Saúde Pública* 38: 71-75, 2004.
13. Moraes J. *Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em Schistosoma mansoni*. São Paulo [Tese de Doutorado em Biotecnologia – ICB/USP], 2011.
14. Moraes J, Carvalho AAL, Nakano E, Almeida AAC, Marques THC, Andrade LN, Freitas RM, Sousa DP. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 112: 603-610, 2013.
15. Oliveira FRAM, Oliveira GAL, Oliveira GLS, Freitas RM. Prospecção tecnológica do acetato de carvacrolila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas. *Rev GEINTEC* 3:103-110, 2013.
16. Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cabaías experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malar* 8: 589-597, 1956.
17. Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansoni* in mice. *Am J Trop Med Hyg* 11: 201-215. 1962.
18. Pellegrino J, Katz, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol* 6: 233-290, 1968.
19. Sanderson L, Bartlett A., Whitfield PJ. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extracts towards adults schistosomes and their egg production. *J Helminthol* 76: 241-247, 2002.

20. Sayed AA, Simeonov A, Thomas CJ, Austin CP, Williams DL. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of Schistosomiasis. *Nat Med* 14: 407-412, 2008.
21. Silva KER, Silva RMF, Costa SPM, Rolim LA, Lima MCA, Rolim-Neto PJ. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose mansônica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 33: 9-16, 2012.
22. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6: 411-442, 2006.
23. Ultee A, Bennink MHJ, 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.
24. Veldhuizen EJA, Bokhoven JLMT, Zweijtzer C, Burt SA, Haagsman HP. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J Agric Food Chem* 54: 1874-1879, 2006.