

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

THAMIRIS SILVA DOS SANTOS VARGAS

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DO MYRTENAL

**Campos dos Goytacazes - RJ
2025**

THAMIRIS SILVA DOS SANTOS VARGAS

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DOMYRTENAL

Dissertação de mestrado apresentada ao centro de Ciência e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito do grau de Mestra em Medicina Veterinária na área de concentração de Medicina Veterinária

Orientadora: D.Sc. Professora Fernanda Antunes
Coorientador: D.Sc. Professor Arnoldo Rocha Façanha

Campos dos Goytacazes
2025

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V297 Vargas, Thamiris Silva dos Santos.

Avaliação dos mecanismos de toxicidade do myrtenal / Thamiris Silva dos Santos Vargas.

- Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

68 f.: il.

Bibliografia: 63 - 68

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026.

Orientadora: Fernanda Antunes.

1. Myrtenal. 2. Toxicidade. 3. Farmacologia. 4. Monoterpenos. 5. Melanoma. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD -
637.2

THAMIRIS SILVA DOS SANTOS VARGAS

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DO MYRTENAL

Dissertação de mestrado apresentada ao centro de Ciência e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito do grau de Mestra em Medicina Veterinária na área de concentração de Medicina Veterinária

Aprovação em 4 de novembro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



FERNANDA ANTUNES
Data: 26/01/2026 12:28:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

D.Sc. Profa. Fernanda Antunes (D.Sc. Medicina Veterinária – UENF)

Documento assinado digitalmente



ARNOLDO ROCHA FAÇANHA
Data: 28/01/2026 09:38:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

D.Sc. Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc. Química Biológica – UFRJ)

Documento assinado digitalmente



ADRIANA JARDIM DE ALMEIDA
Data: 27/01/2026 07:29:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

D.Sc. Profa. Adriana Jardim de Almeida (D.Sc. Medicina Veterinária –

UNESP)

Documento assinado digitalmente



MARILIA GABRIELE PRADO ALBUQUERQUE FERREIRA
Data: 28/01/2026 18:27:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

D.Sc. Profa. Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira (D.Sc. Clínica Médica Veterinária – UNESP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço profundamente a Deus pela oportunidade de realizar mais uma etapa da minha vida. Aos meus pais pelo apoio incondicional e ajuda nos momentos em que mais precisei. À minha orientadora pela paciência, compreensão e oportunidade de fazer parte da equipe;

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF por ser minha segunda casa e por fornecer os meios para que eu pudesse crescer como pesquisadora e como ser humano;

Ao meu amigo Willians que tornou possível a minha volta para Campos ao me acolher em sua casa e por ser alguém com quem sei que sempre posso contar; Aos meus amigos de laboratório: Daniela, Yury e Deivison que fizeram parte de todo o processo e foram imprescindíveis em todas as fases do experimento e depois no momento da escrita;

Aos meus amigos Caetano e Letícia por me ajudarem a manter a calma e a lidar com os desafios da vida;

Agradeço aos meus amigos de agronomia e biologia pela companhia, pelas conversas e pelas trocas durante todo o período do mestrado;

E por fim, agradeço a companhia dos meus gatos: Margot, Agnes e Dexter que estavam sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

RESUMO

VARGAS, Thamiris Silva dos Santos; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; novembro de 2025; AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DO MYRTENAL; Orientadora: D.Sc. Fernanda Antunes; Coorientador: D. Sc. Arnoldo Rocha Façanha.

O myrtenal, um monoterpeneo, foi descrito como um inibidor da V-ATPase, bomba de prótons presente nos tecidos de origem animal, principalmente em órgãos fisiologicamente dependentes de acidificação adequada para seu funcionamento. As células neoplásicas, principalmente células metastáticas de melanomas apresentam uma hiperexpressão dessa enzima e sua inibição leva a célula a entrar em apoptose, impedindo a sobrevivência e a invasão tumoral. No entanto, a inibição sistêmica da V-ATPase pode repercutir sobre tecidos saudáveis e levar a alterações locais e sistêmicas. Diante disso, o presente estudo avaliou o perfil toxicológico agudo do myrtenal em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) com enfoque em parâmetros neurofuncionais, cardiovasculares e histopatológicos. Os camundongos receberam doses crescentes de 10, 30, 50, 60 e 100 μmol e foram avaliados quanto ao desempenho no teste de rotarod, assim como submetidos à avaliação histopatológica de coração, rim, fígado, pâncreas e testículo. A avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca foi realizada em ratos Wistar nas doses de 30, 60 e 300 μmol . Foi observada uma relação dose-dependente entre a administração do composto e as alterações funcionais e teciduais, compatíveis com toxicidade progressiva em concentrações mais elevadas. A dose de 10 μmol foi a mais bem tolerada no experimento. Doses intermediárias, como 20 μmol , podem potencialmente apresentar uma margem de segurança semelhante, embora estudos adicionais sejam necessários para confirmação.

Palavras-chave: Melanoma; Myrtenal; Farmacologia; Toxicidade; Monoterpenos;

ABSTRACT

VARGAS, Thamiris Silva dos Santos; M.Sc.; State University of Northern Fluminense Darcy Ribeiro; November 2025; EVALUATION OF THE TOXICITY MECHANISMS OF MYRTENAL; Advisor: D.Sc. Fernanda Antunes; Co-supervisor: D. Sc. Arnaldo Rocha Façanha.

Myrtenal, a monoterpene, has been described as an inhibitor of the V-ATPase, a proton pump present in animal tissues, especially in organs physiologically dependent on proper acidification for their functioning. Neoplastic cells, particularly metastatic melanoma cells, exhibit overexpression of this enzyme, and its inhibition triggers apoptosis, impairing tumor cell survival and invasion. However, systemic inhibition of V-ATPase may affect healthy tissues and lead to local and systemic alterations. Therefore, the present study evaluated the acute toxicological profile of myrtenal in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*), focusing on neurofunctional, cardiovascular, and histopathological parameters. Mice received escalating doses of 10, 30, 50, 60, and 100 μmol and were evaluated for performance in the rotarod test, as well as subjected to histopathological assessment of the heart, kidneys, liver, pancreas, and testes. Blood pressure and heart rate assessment was performed in Wistar rats at doses of 30, 60, and 300 μmol . A dose-dependent relationship was observed between compound administration and functional and tissue alterations, consistent with progressive toxicity at higher concentrations. The dose of 10 μmol was the best tolerated in the experiment. Intermediate doses, such as 20 μmol , may potentially present a similar safety margin, although additional studies are required for confirmation.

Keywords: Melanoma; Myrtenal; Pharmacology; Toxicity; Monoterpenes;

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Plantas que dão origem ao myrtenal e suas respectivas concentrações, modificado por Barbhuiya e Pathak, 2024..... 17
- Tabela 2.** Doses utilizadas e suas respectivas miligramagem por quilograma de peso animal..... 35
- Tabela 3.** Porcentagem de óbito ocorrido em cada grupo do experimento com rotarod 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural do mirtenol. (Peso molecular: 152,233g/mol).....	18
Figura 2.	Estrutura da enzima V-ATPase em membrana plasmática.....	20
Figura 3.	Célula tumoral com expressão da enzima V-ATPase em membrana plasmática e lisossomo.....	24
Figura 4.	Imagem de camundongos posicionados no aparelho rotarod para avaliação.....	29
Figura 5.	Em A, Visão ventral de rato Wistar, com incisão expondo a musculatura do pescoço. Já em B, Carótida na cor vermelha, e nervo vago na cor amarela, após o afastamento da musculatura do pescoço.....	30
Figura 6.	Imagem de rato Wistar após canulação da artéria carótida e veia jugular para teste de pressão arterial invasiva.....	31
Figura 7.	Imagem mostrando rato Wistar com artéria carótida e veia jugular canulada e eletrodos posicionados para avaliação.....	31
Figura 8.	Aparelho Animal BioAmp 7/PowerLab 8/35 utilizado para avaliação hemodinâmica.....	32
Figura 9.	Material clivado e armazenado em histossetes em A e B.....	33
Figura 10.	Preparação das lâminas para visualização em microscópio.....	34
Figura 11.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o primeiro dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	36
Figura 12.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o segundo dia da administração via	

	intraperitoneal do myrtenal.....	37
Figura 13.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o terceiro dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	38
Figura 14.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o quarto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	39
Figura 15.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o quinto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	39
Figura 16.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o sexto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	40
Figura 17.	Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o sétimo dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.....	40
Figura 18.	Camundongo em aparelho de contenção para administração do myrtenal via intravenosa pela veia da cauda.....	41
Figura 19.	Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 30 micromol.....	43
Figura 20.	Gráfico da diferença de pressão arterial diastólica após administração de myrtenal na dose de 30 micromol.....	43
Figura 21.	Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 30 micromol.....	44
Figura 22.	Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 60 micromol.....	45
Figura 23.	Gráfico da diferença de pressão arterial diastólica após administração de myrtenal na dose de 60 micromol.....	45
Figura 24.	Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 60 micromol.....	46
Figura 25.	Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após	

	administração de myrtenal na dose de 300 micromol.....	47
Figura 26.	Gráfico da diferença de pressão arterial diastólica após administração de myrtenal na dose de 300 micromol.....	47
Figura 27.	Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 300 micromol.....	48
Figura 28.	Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 30 micromol.....	49
Figura 29.	Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 60 micromol.....	49
Figura 30.	Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 300 micromol.....	50
Figura 31.	Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado inflamatório após administração de 100 µmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 10x).....	51
Figura 32.	Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado inflamatório após administração de 100 µmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).....	52
Figura 33.	Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado linfocitário após administração de 30 µmol de myrtenal via intravenosa (aumento 40x).....	52
Figura 34.	Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando Túbulo renal dilatado após administração de 50 µmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).....	53
Figura 35.	Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando congestão e hemorragia após administração de 100 µmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x)	54
Figura 36.	Fotomicrografia de fígado de camundongo apresentando degeneração hidrópica hepática após administração de 50 µmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).....	55
Figura 37.	Fotomicrografia de fígado de camundongo apresentando núcleos fragmentados e picnóticos após administração de 30 µmol de myrtenal via intravenosa (aumento 40x).....	55

Figura 38. Fotomicrografia de pâncreas de camundongo apresentando leucocitose em vaso peripancreático após administração de 60 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 10x)..... 56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. HIPÓTESE.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 GERAL.....	15
3.2 ESPECÍFICOS.....	15
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1 TERPENOS.....	15
4.2 MYRTENAL E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO.....	16
4.3 V-ATPASE.....	19
<u>4.3.1V-ATPase em lisossomos.....</u>	<u>20</u>
<u>4.3.2V- ATPase nos processos bioquímicos.....</u>	<u>21</u>
4.4 SISTEMA NERVOSO.....	22
4.5 SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	23
4.6 V-ATPASE EM CÉLULAS TUMORAIS.....	23
4.7 MELANOMA.....	25
4.8 PRINCÍPIOS DE TOXICIDADE FARMACOLÓGICA.....	25
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1 ANIMAIS.....	27
5.2 MYRTENAL.....	27
<u>5.3.1Avaliação de doses crescentes (primeira etapa).....</u>	<u>27</u>
<u>5.3.2Aplicação via intravenosa (segunda etapa).....</u>	<u>28</u>
<u>5.3.3Avaliação hemodinâmica em ratos Wistar (terceira etapa).....</u>	<u>28</u>
5.4 ROTAROD.....	28
5.5 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA E AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	29
5.6 COLETA DE MATERIAL E PROCESSAMENTO PARA AVALIAÇÃO.....	32
5.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	33
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6.1 ANÁLISE PARAMÉTRICA.....	34
6.2 ANÁLISE NÃO PARAMÉTRICA.....	35
7 RESULTADOS.....	35
7.1 AVALIAÇÃO COM ROTAROD.....	35

7.2	AVALIAÇÃO APÓS APLICAÇÃO VIA INTRAVENOSA.....	41
7.3	AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	42
	7.3.1 Grupo 30 µmol.....	42
	7.3.2 Grupo 60 µmol.....	44
	7.3.3 Grupo 300 µmol.....	46
	7.3.4 Avaliação da frequência cardíaca.....	48
7.4	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	50
8	DISCUSSÃO.....	56
8.1	AVALIAÇÃO COM ROTAROD.....	56
8.2	AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO VIA INTRAVENOSA EM CAMUNDONGOS.....	58
8.3	AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	58
8.4	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	60
8.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
9	CONCLUSÕES.....	63
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

O myrtenal é um monoterpeneo originado a partir de extratos de várias espécies de plantas aromáticas, sendo utilizado comumente como aditivo alimentar. Já foi comprovada a sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* por meio de experimentos de indução metastática em camundongos mediante injeção de células de linhagem de melanoma murino altamente metastático. Um de seus mecanismos de ação inclui a capacidade de atuar como inibidor da bomba de prótons V-ATPase, a qual possui expressão diferencial em membranas de células tumorais, principalmente células metastáticas do melanoma e tumor mamário. Tal ação inibitória sobre o fluxo de H⁺ dependente de V-ATPase afeta a reprogramação energética das células neoplásicas, levando à apoptose e à inibição dos processos migratórios e invasivos inerentes à metástase (MARTINS et al., 2019). Esses achados corroboram dados da literatura que apontam a classe dos monoterpeneos como uma fonte promissora de drogas quimioterápicas a serem exploradas (SILVA et al., 2021).

As neoplasias cutâneas são as mais frequentes em atendimentos oncológicos na clínica de pequenos animais, representando cerca de 30 a 40% de todas as neoplasias. Dentre elas estão as melanocíticas de caráter maligno, com alta capacidade metastática (OLIVEIRA et al., 2021). Além da forma cutânea, pode ocorrer na superfície de mucosa, no olho e na região leptomeníngea. Apesar de possuírem a mesma origem embrionária, o comportamento biológico é diferente, com mutações genéticas e rotas metastáticas distintas (WEYDEN et al., 2020).

Atualmente sabe-se que o câncer possui um microambiente tumoral próprio e complexo, com capacidade de realizar angiogênese, proliferação celular e metástase. Nesse microambiente estão localizadas tanto células neoplásicas, como células saudáveis e do sistema imune (ONUICHIC E CHAMMAS, 2010). As metástases podem ocorrer por via hematogena ou linfática, onde os linfonodos sentinelas costumam ser os primeiros afetados e depois se espalham para outros linfonodos e órgãos (LEONG et al., 2022).

A quimioterapia possui efeitos adversos devido ao efeito não seletivo entre células neoplásicas e células saudáveis, levando à destruição de ambas, o que acarreta em efeitos colaterais que podem ser graves (MOURA et al., 2019).

Segundo Silva et al. (2021), os compostos naturais podem ser combinados com quimioterápicos, com o intuito de aumentar a atividade citotóxica e ao mesmo tempo, diminuir os efeitos colaterais.

O presente trabalho representa uma abordagem translacional inspirada por pesquisas que apontam o myrtenal como um candidato para o desenvolvimento de novas terapias potencializadoras contra o câncer, em conjunto ou não com quimioterápicos tradicionais, portanto, torna-se fundamental a caracterização toxicológica do composto, incluindo a determinação da dose letal para o seu uso *in vivo*. A dificuldade em destruir as células metastáticas e os efeitos colaterais comuns aos tratamentos quimioterápicos convencionais enfatizam a necessidade de abordagens inovadoras, como a proposta deste trabalho.

2. HIPÓTESE

A avaliação dos mecanismos de toxicidade do myrtenal pode caracterizar os seus efeitos colaterais e determinar a dose ideal que permita o seu uso clínico com segurança, a fim de promover o aumento da taxa de sobrevivência e tempo livre de doença em neoplasias agressivas e metastáticas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar a dose máxima não tóxica do myrtenal quando administrado em pacientes hígidos e avaliar sua toxicidade em órgãos saudáveis.

3.2 ESPECÍFICOS

Identificar alterações no sistema nervoso central de camundongos provocadas por altas doses do extrato por meio de avaliação com rotarod;

Avaliar potenciais lesões teciduais por meio de exame histopatológico, causadas pela administração do myrtenal em diferentes doses e intervalos de administração;

Analisar alterações hemodinâmicas em ratos Wistar devido à aplicação endovenosa do myrtenal.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 TERPENOS

Os óleos essenciais são extraídos de uma ampla variedade de plantas, são altamente concentrados e apresentam propriedades hidrofóbicas. Recentemente, uma ampla variedade de estudos farmacológicos sobre os efeitos dos óleos

essenciais vem sendo realizada com foco nos terpenos e terpenoides, que são compostos químicos presentes nesses óleos essenciais. Os terpenoides são caracterizados como metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas e exercem um papel importante na resistência a doenças (MASYITA et al., 2022).

Alguns terpenos como os ginsenosídeos, ginkgolídeos e canabinoides utilizados em estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram resultados promissores, inclusive com efeitos positivos na doença de Alzheimer (DRAGOMANOVA et al., 2018). Os terpenos são comumente utilizados como aditivos alimentares e exibem atividades biológicas antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais. Recentemente, vêm sendo estudados por sua ação como agentes antineoplásicos, possuindo uma grande diversidade estrutural e, principalmente, baixa toxicidade (SILVA et al., 2021).

4.2 MYRTENAL E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

Os terpenos possuem uma grande diversidade estrutural que varia de acordo com a quantidade de isoprenos presentes, dentre eles está o myrtenal, classificado como um monoterpene (MASYITA et al., 2022). O myrtenal pode ser encontrado em plantas como a artemísia, eucalipto, coentro, etc (BALTAZAR et al., 2020). Na Tabela 1 estão representados os nomes científicos das principais plantas onde é possível encontrar o myrtenal e suas concentrações; é possível observar que, no Brasil, existe uma espécie chamada *Campomanesia guaviroba*, a qual apresenta alta concentração de myrtenal, sendo ela de 24,7% extraída a partir de suas folhas.

Tabela 1. Plantas que dão origem ao myrtenal e suas respectivas concentrações, modificado de Barbhuiya, 2024.

Nome da planta	Família	Parte da planta	País (origem)	% de myrtenal
<i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) Merr.	Araliaceae	Folha, caule	Vietnam	0,6
<i>Aegle marvels</i> (L.) Correa	Rutaceae	folha	Índia	1,06
<i>Campomanesia guaviroba</i>	Myrtaceae	Folha	Brasil	24,7
<i>Chamaecyparis formosensis</i> Matsum.	Cupressaceae	Galhos/ tronco	China	4,11
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Cyperaceae	Rizoma	África do Sul	7,1-7,9
<i>Meum athamanticum</i> Jacq.	Apiaceae	Folha, caule	Espanha	p
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtaceae	Folha	Palestina	6,87
<i>Rhodiola rosea</i> L.	Crassulaceae	Rizoma	Bulgária	10,56
<i>Rhodiola rosea</i> L.	Crassulaceae	Rizoma	Finlândia	36,9
<i>Salvia hydrangea</i>	Lamiaceae	Partes aéreas	Turquia	2,6
<i>Tanacetum vulgare</i> L. var. <i>vulgare</i>	Asteraceae	Folha, inflorescência	Lituânia	14,1-24,9 (inflorescência) 8,2-15,8 (folha)
<i>Teucrium libanitis</i>	Lamiaceae	Partes aéreas	Espanha	p
<i>Thymus vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i>	Lamiaceae	Partes aéreas	Espanha	p
<i>Amomum testaceum</i> Ridl.	Zingiberaceae	Fruta	-	16,1
<i>Aralia cachemirica</i>	Araliaceae	Folha, raiz	Índia	2,0-2,6
<i>Citrus aurantifolia</i>	Rutaceae	Epicarpo	Camarões	5,0
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Ericaceae	Folha	Turquia	6,84

p = pequena quantidade

O myrtenal possui vários mecanismos de ação e um deles inclui o aumento das proteínas quinases ativadas por mitógenos e das quinases reguladas por sinalização extracelular, o que leva à ativação da via MAPK/ERK, que promove a expressão de fatores de crescimento endotelial. Além disso, apresenta capacidade de acelerar a angiogênese e inibir a apoptose (YANG et al., 2024). É importante

ressaltar que esse fator também está diretamente ligado à sobrevivência e ao desenvolvimento de células tumorais, pois a sinalização MAPK/ERK pode promover angiogênese tumoral (GUO et al., 2020).

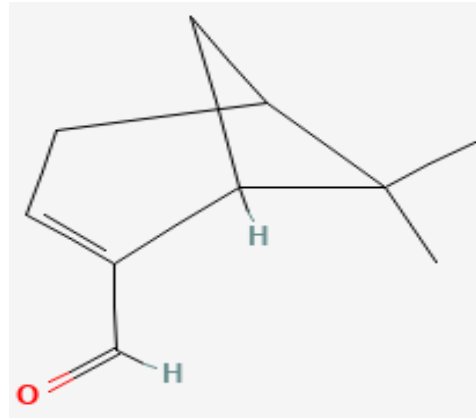


Figura 1. Fórmula estrutural do mirtenol. (Peso molecular: 152,233g/mol).
Fonte: National library of medicine, compound summary-myrtanal, CID61130.

Em experimento realizado por Viana et al. (2016), foi observado que o myrtenal na dose de 25 a 100 mg/kg tem a capacidade de diminuir o estresse oxidativo causado por lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Além disso, atua como um inibidor específico da enzima V-ATPase, altamente expressa em melanomas e outras células neoplásicas. Sua ação nas células neoplásicas leva ao estresse energético agudo e à apoptose, prejudicando o fluxo de H⁺ dependente de V-ATPase. Esta última está intimamente relacionada à malignidade e potencial metastático tumoral (SILVA et al., 2021).

Efeitos positivos do myrtenal foram observados em outros experimentos: Rathinam et al. (2016) utilizaram o fármaco na dose de 80 mg/kg em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, nos quais foi possível observar uma melhora na sinalização da insulina e utilização da glicose pelos tecidos. Já Akefe et al. (2022) demonstraram que a administração do myrtenal na dose de até 200 mg/kg promoveu a restauração de propriedades colinérgicas e estabilidade homeostática de neurotransmissores em camundongos que foram previamente induzidos à demência por meio de administração de estreptozotocina, que possui a capacidade de danificar neurônios e astrócitos, promovendo a resistência insulínica e comprometendo o metabolismo neuronal.

Outro efeito anti-inflamatório observado em experimento utilizando o myrtenal foi a proteção do tecido pulmonar em modelo experimental de asma induzida por sensibilização e inalação de ovalbumina em ratos Wistar. Além disso, também foi observado em outro experimento um efeito inibitório do edema causado em modelo experimental de edema de pata induzida em camundongos Swiss. Ocorreu a redução dos níveis de interleucinas e fatores inflamatórios em ambos os experimentos (SILVA et al., 2014; RAJIZADEH et al., 2019). No experimento realizado por Silva et al. (2014), a dose utilizada foi de 25, 30 e 75 mg/kg, enquanto que no experimento de Rajizadeh et al. (2019), a dose utilizada foi de 50 mg/kg.

O myrtenal possui diferentes mecanismos antiapoptóticos, sendo capaz de equilibrar as vias pró-apoptóticas e antiapoptóticas (via BAX e Bcl-2), além de auxiliar na atenuação de lesões isquêmicas e de reperfusão; neste estudo a dose utilizada foi de 50 mg/kg de myrtenal (BRITTO et al., 2018).

4.3 V-ATPASE

As V-ATPases são enzimas multiméricas que fazem parte das endomembranas de todas as células eucarióticas, formadas por um complexo proteico de 13 a 14 subunidades, e funcionam como bombas de prótons acionadas pela hidrólise de ATP (adenosina-trifosfato). Elas são formadas por dois domínios, um domínio hidrofóbico (A0, V0 e F0) e um domínio hidrofílico (A1, V1 e F1), conectados por um eixo central e por um ou dois eixos laterais (OOT e WILKENS, 2024).

As V-ATPases controlam o pH do lúmen das células por meio do efluxo de íons H⁺, contribuindo para o funcionamento de suas organelas e de suas funções celulares, sendo de extrema importância para alguns processos celulares, como endocitose, autofagia, degradação de proteínas, carregamento de vesículas sinápticas e processamento de antígenos. Diversas isoformas e subunidades de V-ATPases já foram documentadas (COLLINS e FORGAC, 2020; OOT e WILKENS, 2024). Mutações em isoformas específicas, quando associadas a alguma doença, permitem o estudo de drogas que atuarão nelas de forma mais específica, portanto, destaca-se a importância dos estudos envolvendo essas estruturas (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020).

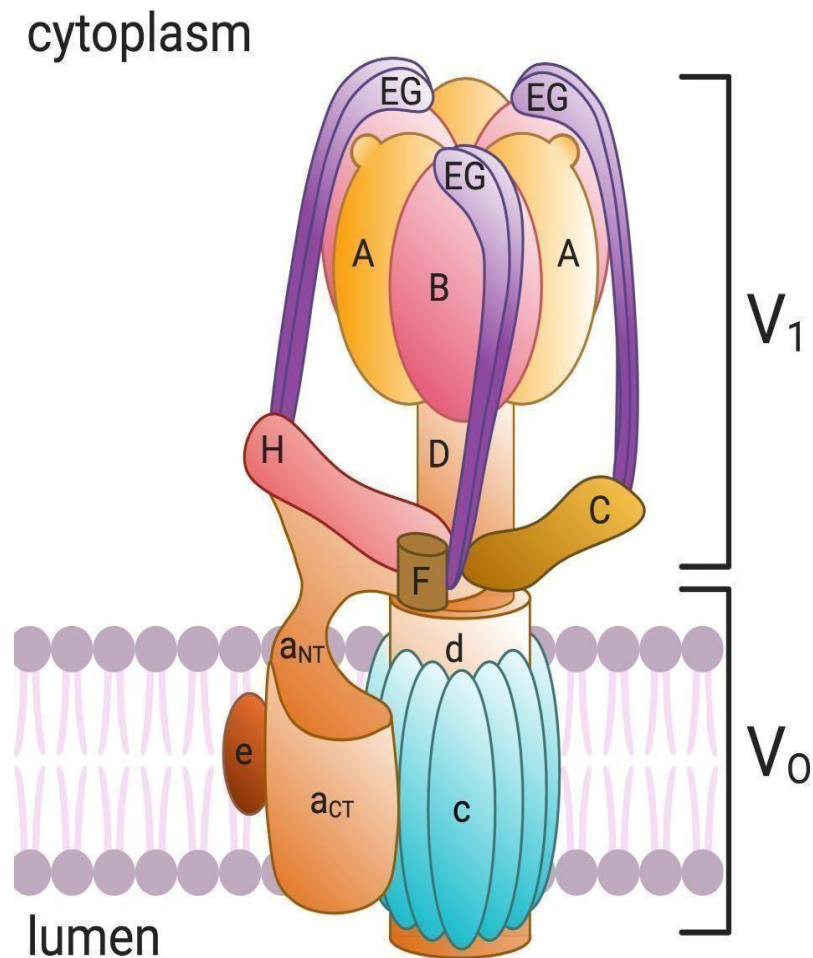


Figura 2. Estrutura da enzima V-ATPase em membrana plasmática. Fonte: EATON et al., 2021.

O pH intracelular está diretamente relacionado às reações bioquímicas realizadas pelas organelas. As V-ATPases são ATPases do tipo vacuolar e são responsáveis por acidificar e manter o pH ideal no ambiente intracelular para o funcionamento da célula. A atividade e/ou expressão excessiva dessa enzima está associada a várias doenças, incluindo a sobrevivência de metástases neoplásicas. Além dessas funções, a V-ATPase também desempenha papel fundamental em outros processos, como a síntese e a modificação de biomoléculas, além de sua secreção e degradação (WANG et al., 2020).

4.3.1 V-ATPase em lisossomos

A principal ferramenta utilizada pelas células para controlar o seu pH intracelular é por meio do transporte de prótons dependente da bomba V-ATPase, sendo um parâmetro fundamental para o funcionamento das organelas celulares (COLLINS e FORGAC, 2020).

Os lisossomos são organelas com alta expressão de V-ATPase (Figura 3) e sua principal função é realizar a degradação de moléculas como lipídios, proteínas, DNA e RNA. O seu funcionamento é essencial para o catabolismo celular e para a fagocitose; além disso, possui importante papel na digestão de células envelhecidas, auxiliando, portanto, também na morte celular programada (YANG et al., 2024). Para que o lisossomo realize suas funções, é necessário que o seu pH interno se mantenha ácido, e cabe ressaltar que as bombas de prótons dependentes de ATP tornam possível a acidificação do interior da organela. Além disso, é importante citar que os lisossomos também são responsáveis pela entrega e maturação de enzimas (SONG et al., 2020).

4.3.2 V- ATPase nos processos bioquímicos

A acidificação intracelular provocada pela V-ATPase tem papel fundamental para o processamento de pró-hormônios peptídicos, como, por exemplo, a proinsulina, que é clivada em células pancreáticas por meio de vesículas secretoras ácidas. Nos rins, ocorre a expressão das V-ATPases nas células intercaladas tipo A, e sua função é secretar prótons na urina para preservar a homeostase do pH sistêmico, mutações em V-ATPases nessa região podem levar à acidose tubular renal distal (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020).

As V-ATPases também estão presentes na membrana plasmática de outras células incluindo as células claras do epidídimo, células interdentes da orelha interna e células sustentaculares do epitélio olfativo. No epidídimo, a acidificação é fundamental para a maturação e armazenamento adequado dos espermatozoides; mutações nessa região não foram relacionadas à diminuição da fertilidade em humanos. Além disso, estão presentes também no tecido ósseo, na região de células com bordas em escova, onde ocorrem as atividades dos osteoclastos, podendo levar à reabsorção óssea e à ativação de enzimas proteolíticas dependentes de pH. Em humanos, mutações em V-ATPases localizadas nessa região estão associadas à osteopetrose autossômica recessiva, uma alteração

congênita. Além disso, a acidificação do citoplasma pode possibilitar infecções virais para dentro das células, como ocorre na influenza e no ebola, caracterizados como vírus envelopados. O baixo pH também facilita a entrada de outros agentes patogênicos, como as toxinas do antraz e da difteria (COLLINS e FORGAC, 2020). Os endossomos desempenham um papel importante na digestão celular, atuando em etapas que antecedem a ação lisossômica. O bloqueio da função da V-ATPase leva a um acúmulo de substâncias não degradadas ao alterar o pH do lúmen dos endossomos, o que impede o processo de maturação e funcionamento desses (SONG et al., 2020).

4.4 SISTEMA NERVOSO

No sistema nervoso, o preenchimento das vesículas pré-sinápticas por neurotransmissores é dependente do potencial de membrana gerado pela V-ATPase, juntamente com o seu gradiente ácido-básico (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020). Além disso, o sistema nervoso apresenta lisossomos em grande quantidade, sendo eles fundamentais para manter a homeostase neuronal devido à sua função de degradação de proteínas intracelulares e corpos de inclusão, o que evita principalmente a neurodegeneração (FERGUSON, 2018). A disfunção dessa organela pode levar à iniciação e à aceleração de processos neurodegenerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington, em razão do acúmulo desses compostos tóxicos para as células como peptídeos beta-amiloides e agregados proteicos (MANÇANO et al., 2024).

A distribuição lisossomal nas células do sistema nervoso ocorre de forma que há uma abundância na região do corpo celular, uma quantidade menores dendritos e raramente estão presentes no axônio. O pH ácido é essencial para a extração de ferro da ferritina, que é uma proteína com a função de armazenar ferro no organismo; assim, a inibição da acidificação lisossômica leva à deficiência de ferro e, por consequência, ao estresse neuronal (SONG et al., 2020). As micróglia são células do sistema nervoso especializadas em realizar fagocitose; sua acidificação anormal contribui para a neuroinflamação e neurodegeneração por meio de diversas vias deletérias. Quando ocorre a acidificação defeituosa, as micróglia produzem e liberam mais citocinas inflamatórias, recrutam e ativam células do sistema imune. Além disso, elas podem induzir à morte neuronal por mecanismos de

necroptose (QUICK et al., 2023).

4.5 SISTEMA CARDIOVASCULAR

A pressão arterial (PA) é um fator importante para que a homeostase seja mantida no organismo. Caso esteja alterada, pode levar à falha da perfusão tecidual de órgãos importantes, afetando o seu correto funcionamento. O mecanismo fisiológico para a correção da pressão envolve o reflexo barorreceptor, que detecta a variação do débito cardíaco e a resistência periférica total do sistema circulatório (WAUGH, 2021). Alguns fármacos possuem a capacidade de atuar diretamente nos neurônios do trato solitário (NTS), uma região do bulbo cerebral responsável pelo controle cardiovascular; essa ação altera o tônus do sistema nervoso autônomo, promovendo o equilíbrio entre a atividade simpática e parassimpática (KAWADA et al., 2021).

Em experimento realizado por Britto et al. (2018), foi observado que o myrtenal tem ação antioxidante e protegeu o tecido cardíaco contra hipóxia miocárdica ao reduzir a criação de espécies reativas de oxigênio, promovendo o equilíbrio entre as vias pró- apoptóticas e antiapoptóticas. Em um estudo realizado por Rognant et al. (2023), ao utilizar um inibidor de V-ATPase, foi possível observar um bloqueio dos efeitos pró- contráteis da prorenina do sistema renina-angiotensina-aldosterona, mostrando que a atividade da bomba de prótons é um mecanismo essencial para a modulação da contratilidade cardíaca.

4.6 V-ATPASE EM CÉLULAS TUMORAIS

As V-ATPases de membrana plasmática foram detectadas em diversos tipos de células cancerígenas e auxiliam na metastatização e invasão tumoral ao acidificar o ambiente extracelular, ativando, assim, as enzimas proteolíticas que fazem a degradação da matriz extracelular. Esse processo possui um papel fundamental para a degradação de macromoléculas, que ocorrem nos lisossomos via autofagia, sendo a acidificação essencial para o processo. A autofagia ocorre comumente em níveis basais, mas pode haver um aumento da sua atividade em períodos de privação de nutrientes e de estresse energético. Inibidores da V-ATPase podem ser usados como inibidores de autofagia, sendo este um mecanismo

importante de sobrevivência utilizado por células tumorais (COLLINS e FORGAC, 2020; VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020).

As bombas de prótons possuem a capacidade de manter o ambiente intratumoral alcalino, tornando o meio extracelular ácido. Essa é uma característica que promove a invasividade tumoral por meio da degradação proteolítica da matriz extracelular por catepsinas e metaloproteinases da matriz. Além disso, é importante ressaltar que um ambiente extracelular ácido também contribui para a resistência medicamentosa (EATON et al., 2021). Outros aspectos como sobrevivência celular tumoral, a sinalização intracelular, a resistência a múltiplos fármacos e a invasividade tumoral estão relacionados à expressão da V-ATPase em neoplasias (MCGUIRE et al., 2019).

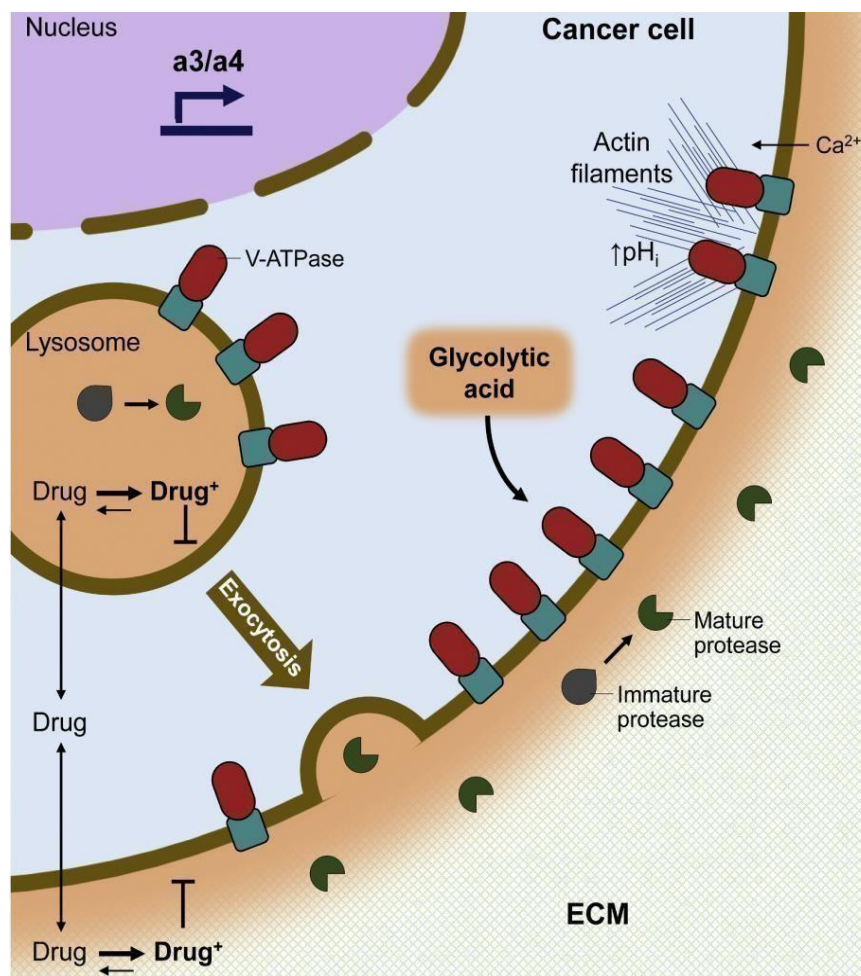


Figura 3. Célula tumoral com expressão da enzima V-ATPase em membrana plasmática e lisossomo. Fonte: COLLINS e FORGAC, 2020.

A acidificação do microambiente tumoral por meio do acúmulo de prótons no meio extracelular, realizada pelas V-ATPases, está diretamente relacionada à agressividade do câncer que inclui fatores como aparecimento de metástase, invasividade local, angiogênese, escape imunológico e resistência à terapia (BALTAZAR, et. al. 2020).

4.7 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir de melanócitos epidérmicos e foliculares. Corresponde a cerca de 7% de todas as neoplasias cutâneas malignas. Além da forma cutânea, também pode manifestar-se em regiões de mucosa, ocular e no sistema nervoso. É considerada uma neoplasia altamente agressiva, por conta de sua invasividade e grande capacidade de produzir metástase (WEYDEN et al., 2020).

Neoplasias altamente metastáticas, como o caso do melanoma, possuem superexpressão de V-ATPase, relacionada à acidificação do tumor por meio da alteração do gradiente eletroquímico da membrana celular. Elas também estão presentes nas membranas nucleares da célula tumoral, o que auxilia no processo de resistência à apoptose e na produção de metástase (MARTINS et al., 2019). Um experimento realizado por Martins et al. 2019, utilizando o myrtenal em camundongos com melanoma induzido, evidenciou a capacidade do monoterpeno em induzir apoptose e reduzir a disseminação metastática.

4.8 PRINCÍPIOS DE TOXICIDADE FARMACOLÓGICA

O desenvolvimento de um fármaco é um processo progressivo que requer a realização de estudos pré-clínicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nesse contexto, é essencial avaliar órgãos responsáveis pela metabolização e excreção de fármacos, como o fígado e os rins, assim como aqueles que possam ser alvos do fármaco, devido à presença de receptores ou ligantes específicos. Caso sejam identificados danos teciduais, eles precisam ser classificados quanto à reversibilidade da lesão para o prosseguimento dos testes (SAHOTA et al., 2016).

Os efeitos farmacológicos são considerados tóxicos quando a alteração ultrapassa a capacidade de reparo e homeostase dos tecidos-alvo. A exposição à

substância e sua toxicidade podem ocorrer de forma aguda, crônica ou subcrônica. Dessa forma, é necessário realizar testes supraterapêuticos no protocolo experimental, para além da avaliação de toxicidade de uma forma geral, realizar a avaliação de imunotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, desempenho reprodutivo e toxicidade do desenvolvimento, tanto embrionário quanto pós-natal; além disso, o estudo também deve incluir a faixa de dose terapêutica (SAHOTA et al., 2016). Ademais, a meia vida de um fármaco, tempo necessário para que sua concentração plasmática caia pela metade, é um conceito fundamental para prevenir a toxicidade e definir o tempo ideal do intervalo entre as medicações de forma segura, pois um intervalo muito curto pode levar ao acúmulo do medicamento no organismo e aumentar o risco de efeitos adversos (HALLARE e GERRIETS, 2025).

A lesão renal é um importante ponto de referência para a determinação de uma dose segura para determinado medicamento, sendo a injúria renal aguda uma das principais lesões causadas por toxicidade no estudo de novos fármacos. Apesar das lesões pré e pós-renais estarem associadas a efeitos farmacológicos e a propriedades físico-químicas, existe uma dificuldade na previsão de lesão das células renais em razão de sua variedade, que inclui as células epiteliais do túbulo renal proximal e distal, fibroblastos, células estromais, células endoteliais capilares e podócitos (ARAKAWA et al., 2025).

O fígado é um importante órgão responsável pela metabolização de fármacos; sendo assim, apresenta suscetibilidade a danos causados por substâncias químicas. Reações adversas a medicamentos podem levar à lesão tecidual e, em casos mais graves, à falência hepática aguda (SU et al., 2023).

As vias de administração também devem ser levadas em consideração. A via intravenosa (IV) possui vantagens quanto à biodisponibilidade, por ser mais alta, pois, nesse caso, não há um processo de absorção prévio; esse fato também apresenta a desvantagem de aumentar o risco de efeitos colaterais sistêmicos (JEONG et al., 2020). A absorção de medicações aplicadas por via intraperitoneal (IP) também é considerada rápida, pela superfície de contato, e com biodisponibilidade semelhante à via (IV). Geralmente, a velocidade de absorção após a administração IP é de metade a um quarto da velocidade após a administração IV (SHOYAIB et al., 2020).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 70 camundongos machos (*Mus musculus*) e 18 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), provenientes do biotério da Unidade de Estudos Avançados (UEA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os animais receberam uma dieta padrão e água *ad libitum*, além de serem mantidos em condições de vida normais (temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 45-55% de umidade e 12h escuro / ciclo de luz). Os procedimentos que envolvem animais e seus cuidados foram realizados em conformidade com as diretrizes institucionais do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (CEUA nº8569110924).

5.2 MYRTENAL

O (1R)-(-)-Myrtenal foi adquirido pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do Centro de Biotecnologias e Biotecnologia (CBB) da UENF, sendo proveniente da empresa Sigma-Aldrich®, e preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) proveniente do laboratório da Unidade de Estudos Avançados (UEA) para posterior administração.

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.3.1 Avaliação de doses crescentes (primeira etapa)

A administração do myrtenal foi realizada em concentrações crescentes do composto, o experimento foi dividido em seis grupos contendo 10 camundongos cada, o composto foi administrado via intraperitoneal (IP) a cada 24 horas durante sete dias.

Grupo 1: Grupo controle, sem administração do myrtenal.

Grupo 2: Administração de 10 micromol de myrtenal.

Grupo 3: Administração de 30 micromol de myrtenal.

Grupo 4: Administração de 50 micromol de myrtenal.

Grupo 5: Administração de 60 micromol de myrtenal.

Grupo 6: Administração de 100 micromol de myrtenal.

Os animais foram avaliados durante 3 minutos no rotarod nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos após a administração do composto.

5.3.2 Aplicação via intravenosa (segunda etapa)

Foi realizado um grupo com um N de 10 animais (*Mus musculus*), no qual foi administrado uma dose do mirtenol via intravenosa pela veia caudal , na concentração de 30 micromol, a cada sete dias, durante quatro semanas, totalizando quatro aplicações. O objetivo foi mimetizar a aplicação de medicamentos quimioterápicos e avaliar as alterações que poderiam ser causadas pelo uso prolongado e com um maior intervalo de tempo entre as doses do medicamento.

5.3.3 Avaliação hemodinâmica em ratos Wistar (terceira etapa)

A administração do myrtenal foi realizada na concentração máxima considerada não tóxica identificada na primeira etapa do experimento. Nessa etapa, os animais foram divididos em três grupos de ratos Wistar contendo seis indivíduos em cada grupo, e o myrtenal foi administrado por via intravenosa (IV), seguido de análise eletrocardiográfica.

Grupo 1: Administração de 30 micromol de myrtenal via intravenosa.

Grupo 2: Administração de 60 micromol de myrtenal via intravenosa.

Grupo 3: Administração de 300 micromol de myrtenal via intravenosa.

5.4 ROTAROD

O aparato chamado Rotarod (também escrito como RotaRod ou Rora-rod), utilizado para avaliação de coordenação motora e funções do sistema nervoso central em roedores, foi criado por N.W. Du nham e T.S. Miya em 1957. Eles publicaram o primeiro artigo científico detalhando o uso do equipamento, que originalmente consistia em um cilindro girando horizontalmente, no qual ratos ou camundongos precisavam manter-se. A velocidade do cilindro pode ser constante

ou aumentar de forma gradual e continuamente, testando resistência, coordenação e equilíbrio dos animais. Essa técnica foi posteriormente aprimorada e transformada em equipamento comercial científico pela empresa Ugo Basile (a partir da década de 1960), tornando-se um dos métodos-padrão para experimentos em neurociências, farmacologia e comportamento animal, especialmente para o estudo de efeitos de drogas que afetam o sistema nervoso central (SNC) (Figura 4).

O objetivo desse teste é avaliar o nível de interação com o sistema nervoso central do myrtenal e observar como este afeta as habilidades motoras dos animais, sendo realizada a correlação entre tempo de administração e tempo de queda do animal. Primeiro, é contabilizado o tempo em que os animais permanecem no equipamento para adaptação. Após 5, 15, 30 e 60 minutos após a administração do composto, são contabilizados os tempos de queda e sua frequência em um intervalo de 3 minutos.



Figura 4. Imagem de camundongos posicionados no aparelho rotarod para avaliação. Fonte: Arquivo pessoal.

5.5 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA E AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

O procedimento cirúrgico de canulação da artéria carótida e fixação dos eletrodos para a eletrocardiografia é realizado mediante protocolo anestésico de cetamina e xilazina. Após anestesia, o animal é colocado em decúbito dorsal, e a

região é depilada e é realizado todo o procedimento de antissepsia com iodopovidona e álcool 70%. Posteriormente, é feita uma incisão mediana na região cervical anterior (Figura 5-A). Por conseguinte, realiza-se a separação dos músculos pré-traqueais (esterno hióideo e cleidomastóideo) e a localização bilateral do feixe vâsculo nervoso (Figura 5-B), constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático.

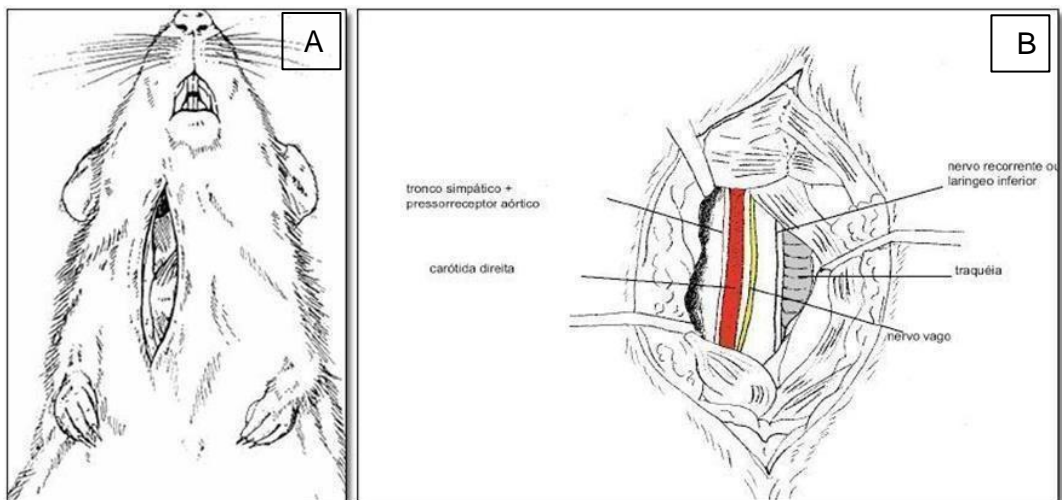


Figura 5. Em A, Visão ventral de rato Wistar, com incisão expondo a musculatura do pescoço. Já em B, Carótida na cor vermelha, e nervo vago na cor amarela, após o afastamento da musculatura do pescoço. Fonte: Aguiar, 2009.

Após a localização da artéria carótida é realizado seu isolamento para posterior canulação (Figura 6), com cânula de silicone PE-30, preenchida com solução fisiológica a 0,9% heparinizada (50 UI.mL⁻¹). A cânula é conectada a um sensor de pressão e a um transdutor para avaliação de pressão arterial, sendo posicionados os eletrodos no corpo do animal para avaliação de eletrocardiograma (Figura 7). Dessa forma, os parâmetros avaliados são registrados continuamente.

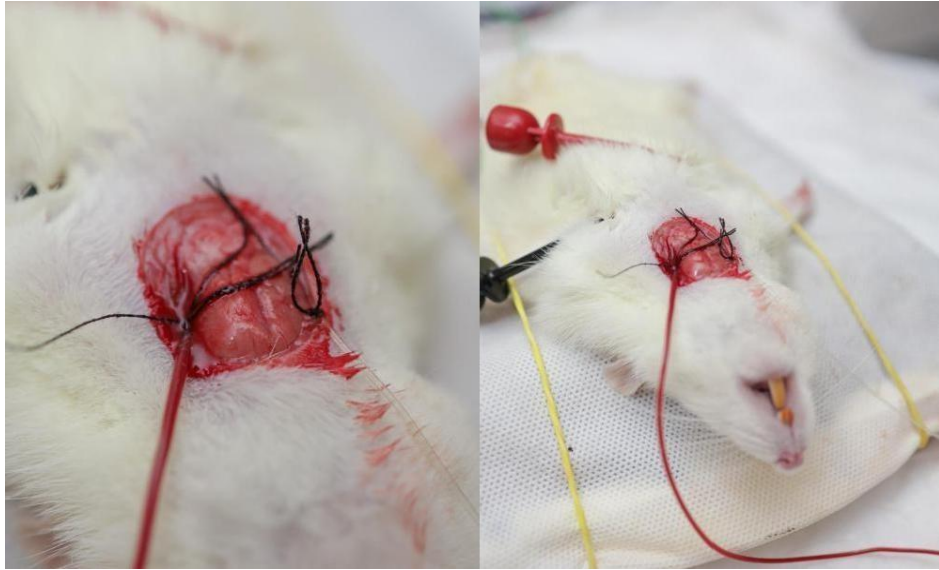


Figura 6. Imagem de rato Wistar após canulação da artéria carótida e veia jugular para teste de pressão arterial invasiva. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a canulação da artéria carótida, foi administrado DMSO com e sem o mirtenol para que cada animal tenha um controle próprio ao avaliar as interferências que poderiam ser provenientes do mirtenol e separá-las do veículo, porque já foi documentado que o DMSO pode fazer alteração cardiovascular. A Figura 7 mostra o animal já canulado e com os eletrodos posicionados para posterior administração dos fármacos.

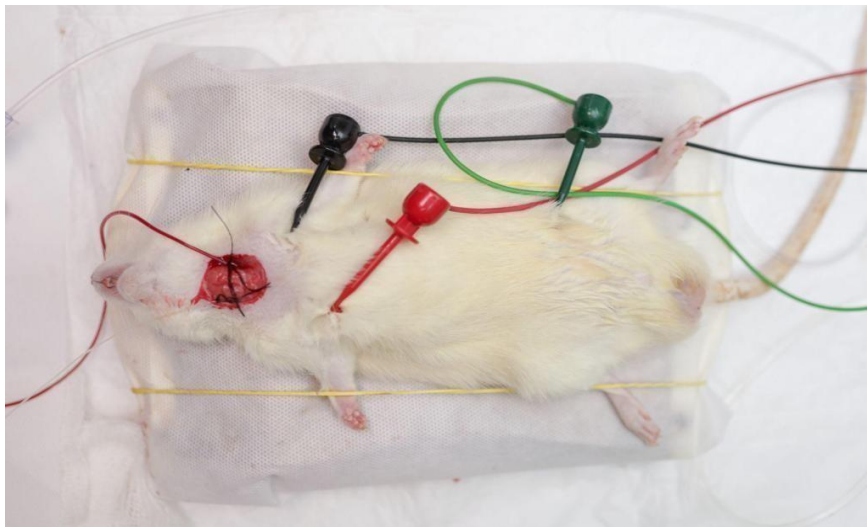


Figura 7. Imagem mostrando rato Wistar com artéria carótida e veia jugular

canulada e eletrodos posicionados para avaliação. Fonte: Arquivo pessoal.

A aplicação dos fármacos foi realizada através da veia jugular utilizando uma seringa de 0,5 mL em um sistema fechado, por meio do uso de um PRN (*pro re nata*), um acoplador específico com heparina amplamente utilizado na medicina humana e veterinária para manter um acesso venoso viável para aplicação de medicações intravenosas (IV) e/ou fluidoterapia. A mensuração da pressão arterial foi realizada com a cânula posicionada na artéria carótida, em sistema fechado, acoplada ao aparelho Animal BioAmp 7/PowerLab 8/35 (Figura 8).



Figura 8. Aparelho Animal BioAmp 7 / PowerLab 8/35 utilizado para avaliação hemodinâmica. Fonte: Arquivo pessoal.

5.6 COLETA DE MATERIAL E PROCESSAMENTO PARA AVALIAÇÃO

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por meio de extrapolação anestésica de cetamina e xilazina, a qual consiste no aumento da dose usualmente utilizada, levando à parada cardiorrespiratória dos animais.

Foram coletados os seguintes órgãos para avaliação histopatológica: fígado, rim, coração, pâncreas, epidídimo e fêmur. O material foi acondicionado em recipientes contendo formol tamponado neutro a 10% e, então, encaminhado ao Laboratório de Morfologia e Patologia Animal – LMPA do Hospital Veterinário da UENF para processamento e confecção das lâminas com coloração H&E para

posterior análise.

5.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras foram clivadas, armazenadas em histossetes plásticos (Figura 9), processadas (Processador Automático de Tecidos – LEICA TP1020®), incluídas em parafina para serem cortadas (Micrótomo Semi-automático – LEICA RM2145®) em seções de 5 µm e coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) (Figura 10). As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas. Os órgãos coletados foram avaliados quanto à preservação de arquitetura, degeneração e presença ou ausência de infiltração leucocitária.

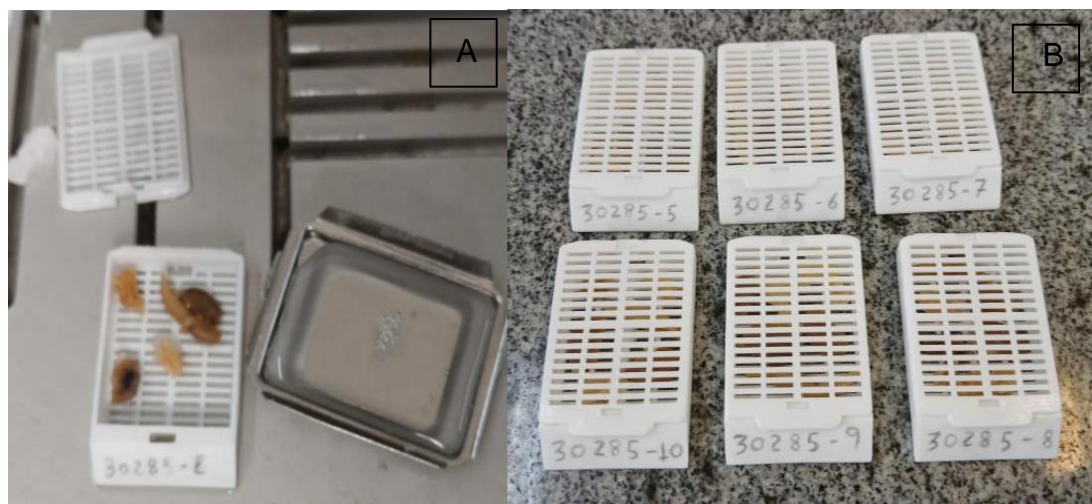


Figura 9. Material clivado e armazenado em histossetes em A e B. Fonte: Arquivo pessoal.

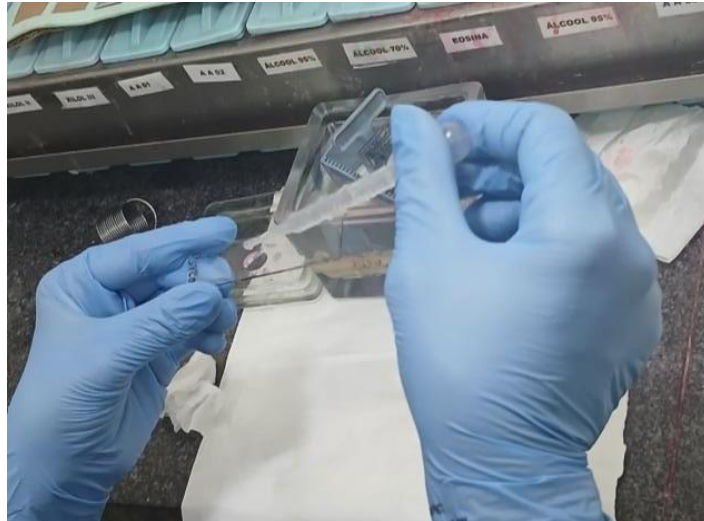


Figura 10. Preparação das lâminas para visualização em microscópio. Fonte: Arquivo pessoal.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística para esse trabalho buscou evitar o erro tipo 2, no qual se aceita a hipótese H_0 quando ela é falsa, pois esse erro pode resultar em morte dos animais. As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism®, versão 5.0.

6.1 ANÁLISE PARAMÉTRICA

Os resultados da avaliação com rotarod foram analisados através do tempo em que os animais permaneceram no equipamento sem cair, utilizando a análise de variância (ANOVA), considerando como parcela perdida os animais que vieram a óbito durante o experimento. A análise foi realizada entre os animais do mesmo grupo e entre os grupos em cada dia do experimento. O diazepam, um benzodiazepínico, foi utilizado como controle positivo para sedação, sendo esta uma medicação que afeta o sistema nervoso central por meio de mecanismo de ação já estabelecido e elucidado. Os resultados da análise hemodinâmica foram obtidos a partir da ANOVA one-way, com posterior teste de médias Newman–Keuls, Tukey e t de Student, dependendo de cada caso, respeitando-se $p < 0,05$ (95% de

confiabilidade).

6.2 ANÁLISE NÃO PARAMÉTRICA

Os resultados histológicos foram analisados através da mediana dos escores (estatística descritiva), segundo a graduação da gravidade das lesões encontradas, de acordo com a avaliação de observador independente.

7. RESULTADOS

A administração do myrtenal foi realizada após a obtenção da dose calculada em μmol , sendo apresentada abaixo (Tabela 2) a concentração correspondente de cada dose em mg/kg utilizada na primeira etapa do experimento, visto que os camundongos possuíam uma média de 30 g de peso corporal.

Tabela 2. Doses utilizadas e suas respectivas massas em miligramas por quilograma de peso corporal.

Micromol	Mg/kg
10	80 mg/kg
30	240 mg/kg
50	400mg/kg
60	480 mg/kg
100	800 mg/kg

7.1 AVALIAÇÃO COM ROTAROD

Os resultados estão apresentados com um gráfico para cada dia do experimento. No dia 1, não houve diferença estatística entre os animais como mostra o gráfico da Figura 11. Na avaliação clínica, 5 minutos após a primeira aplicação, os animais apresentaram leve desconforto, sendo um dos principais sinais observados a piloereção. Além disso, todos os grupos tratados apresentaram alteração no tempo de permanência no aparelho. Após 15 minutos, foi possível observar que dois camundongos demonstraram taquipneia.

Ao final de uma hora de avaliação, os animais normalizaram os sintomas apresentados. Ao comparar a diferença de concentração do myrtenal, os animais que receberam as doses de 100, 60 e 50 μmol apresentaram os sintomas citados com maior frequência quando comparados aos que receberam as doses de 30 e 10 μmol . Os animais do grupo controle não apresentaram alterações.

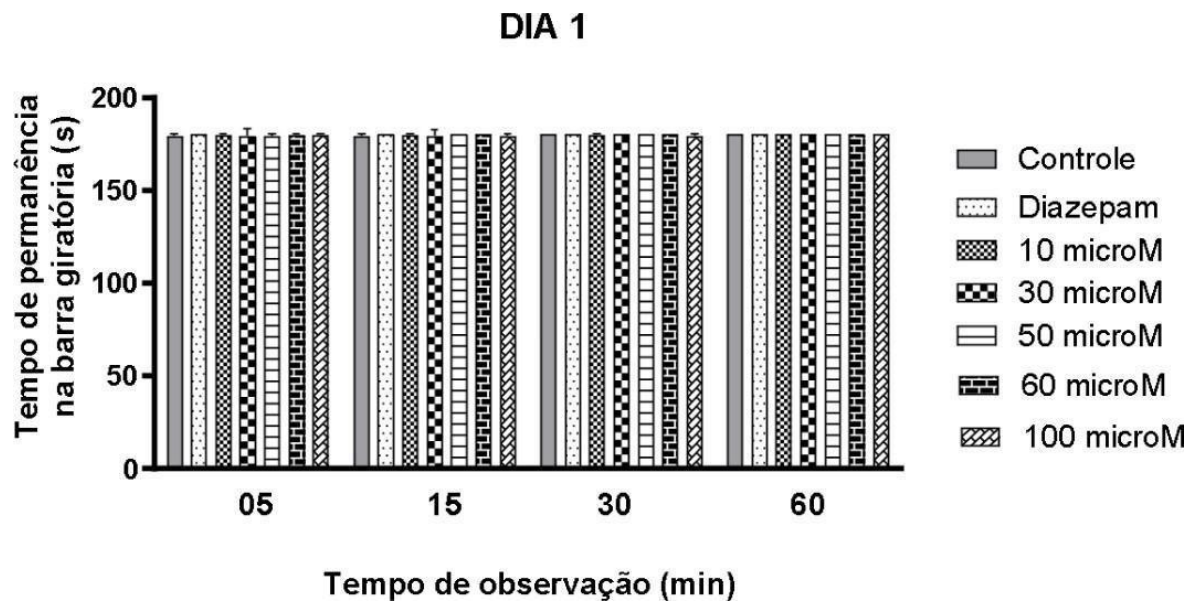
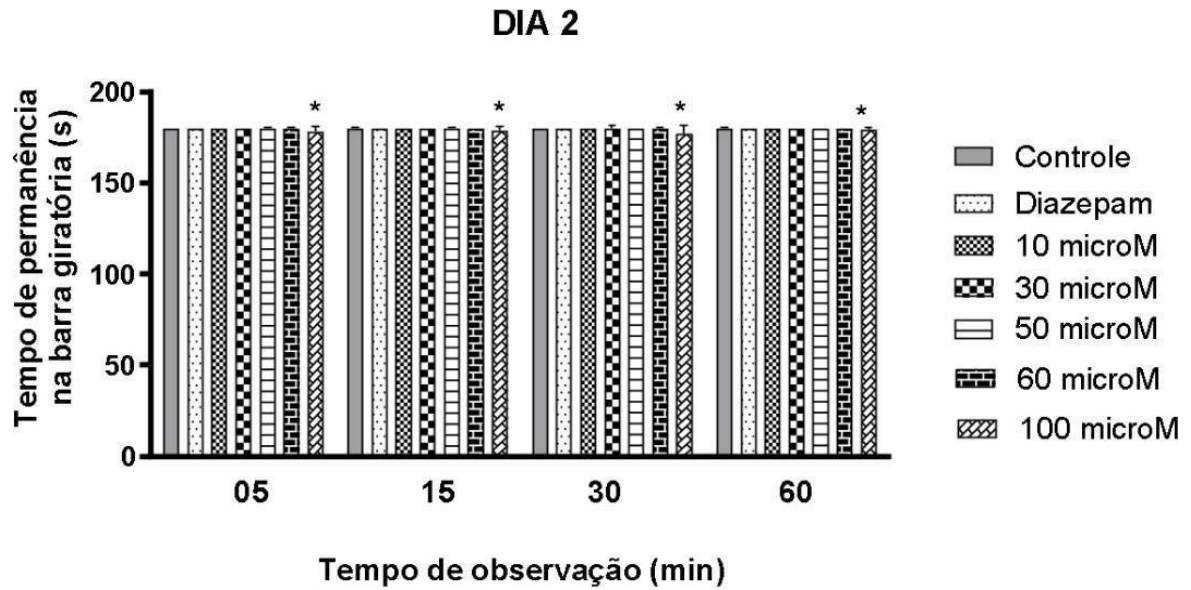


Figura 11. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o primeiro dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

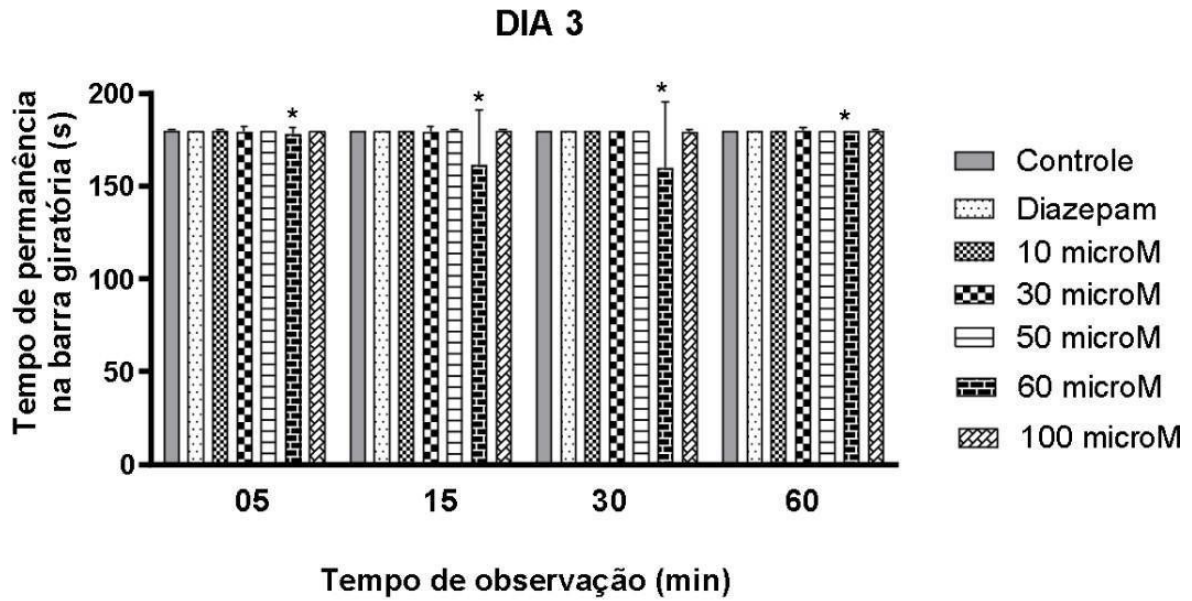
No dia 2 (Figura 12), a análise do desempenho dos animais no rotarod mostrou que houve efeito agudo do myrtenal, uma vez que as alterações observadas nos primeiros momentos após a aplicação foram mantidas nos animais tratados. Na análise estatística, houve diferença significativa do grupo de 100 μmol quando comparado a todos os outros grupos ($p > 0,0001$), mostrando que a maior concentração utilizada apresentou efeito neurotóxico.



**versus* Controle; 10, 30, 50 e 60 microM ($p < 0,0001$)

Figura 12. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o segundo dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

No dia 3 (Figura 13), o padrão de neurotoxicidade aguda observado nos dias 1 e 2 manteve-se no terceiro dia. A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa entre o grupo de 60 μmol e todos os outros grupos ($p < 0,015$) sendo possível observar que até os 60 minutos de avaliação, ocorreu uma recuperação dos animais em relação ao tempo de permanência na barra giratória.



*versus Controle; 10, 30, 50 e 100 microM ($p < 0,015$)

Figura 13. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o terceiro dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

No dia 4 (Figura 14) e dia 5 (Figura 15), não houve diferença significativa entre os grupos. Foi possível observar um efeito depressor de início rápido do SNC, nas doses mais altas (50, 60 e 100 μmol), enquanto que nas doses mais baixas (10 e 30 μmol), observou-se padrão de recuperação dos animais após 60 minutos da aplicação.

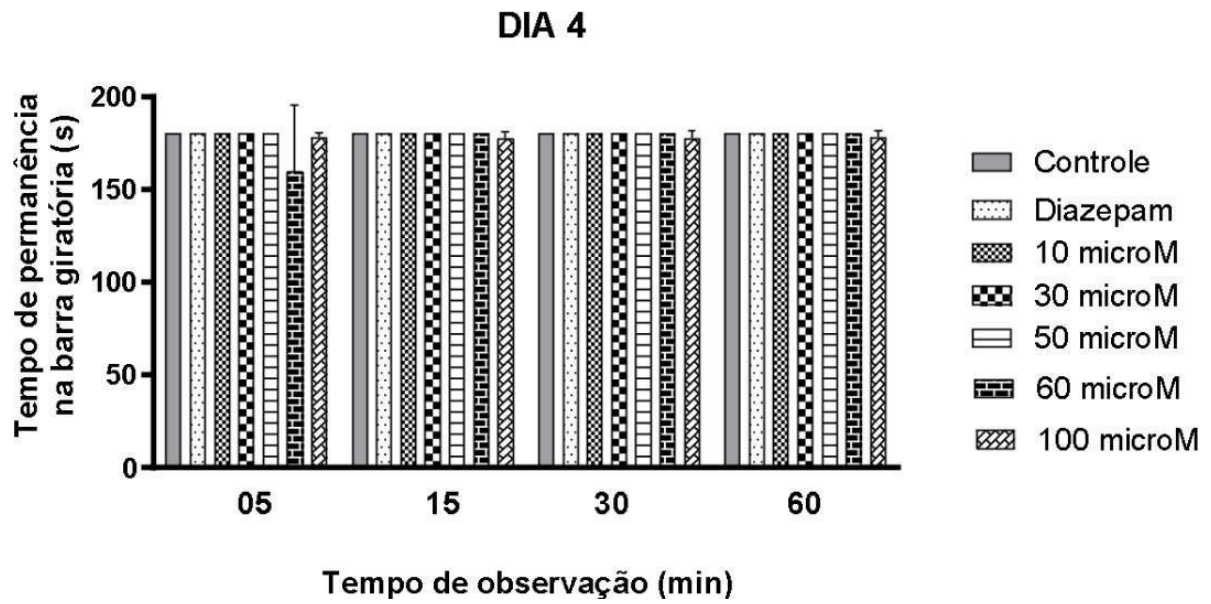


Figura 14. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o quarto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

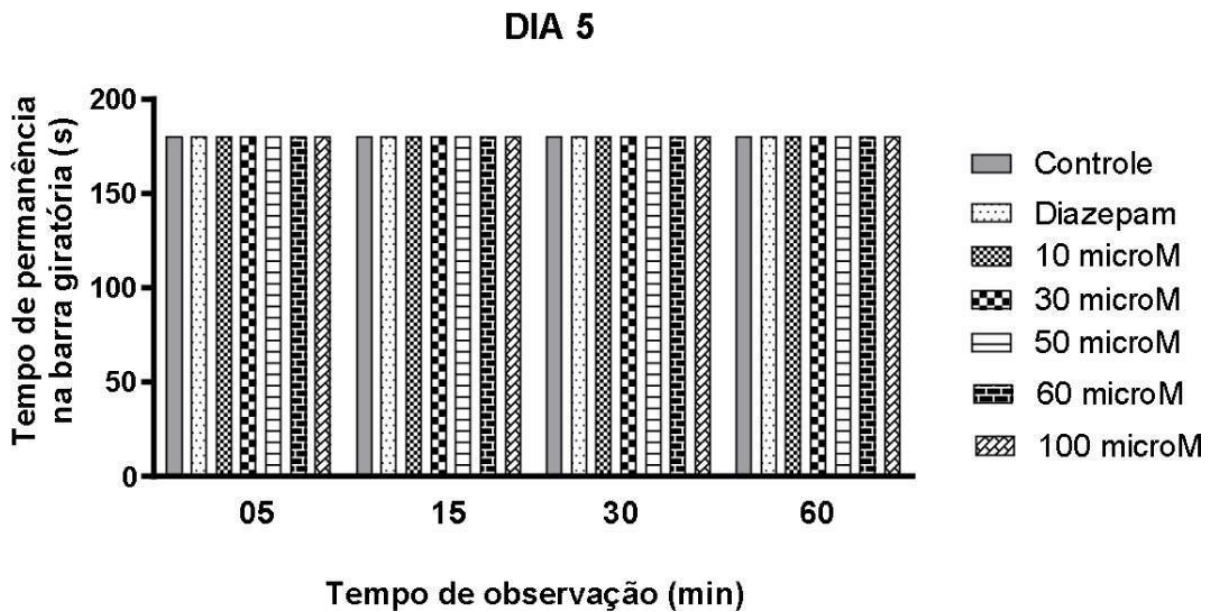
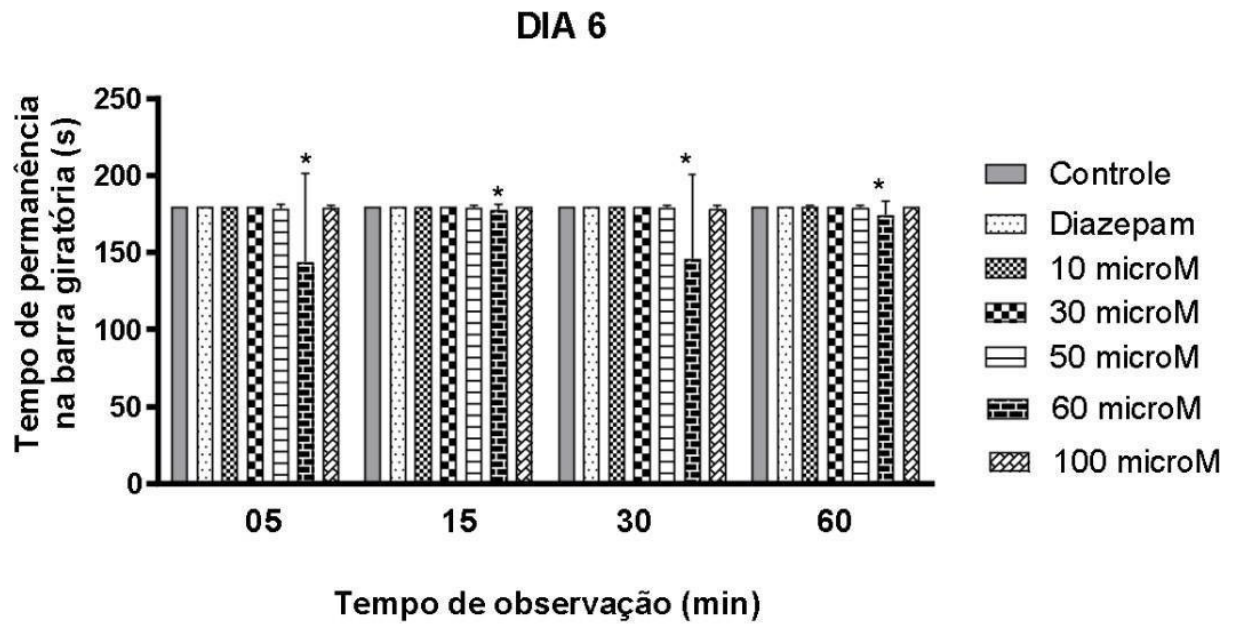


Figura 15. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o quinto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

No dia 6 do experimento (Figura 16), o grupo com a concentração de 60 μmol apresentou diferença significativa quando comparado aos outros grupos, ao passo que no dia 7 (Figura 17) não houve diferença significativa entre os grupos.



*versus Controle; 10, 30, 50 e 100 microM ($p < 0,004$)

Figura 16. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o sexto dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

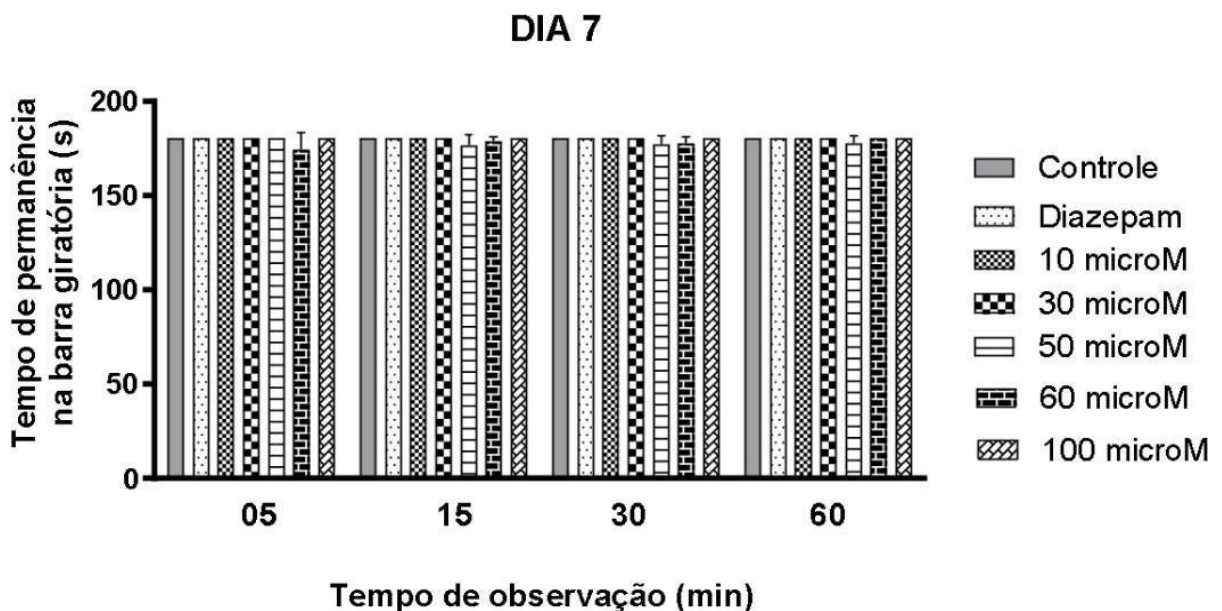


Figura 17. Gráfico do tempo de permanência dos animais no rotarod durante o sétimo dia da administração via intraperitoneal do myrtenal.

Quanto a mortalidade dos animais durante o experimento, a tabela 3 faz um resumo com a porcentagem de óbitos em cada grupo do experimento durante os 7

dias de aplicação.

Tabela 3. Porcentagem de óbito ocorrido em cada grupo do experimento com rotarod.

Grupo	Porcentagem de óbito
10 μmol	0%
30 μmol	30%
50 μmol	50%
60 μmol	70%
100 μmol	30%

7.2 AVALIAÇÃO APÓS APLICAÇÃO VIA INTRAVENOSA

Para ser realizada a aplicação do myrtenal por via intravenosa através da veia da calda de forma segura, os animais foram colocados em um dispositivo de contenção (Figura 18).



Figura 18. Camundongo em aparelho de contenção para administração do myrtenal via intravenosa pela veia da cauda. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante a primeira e a segunda aplicação, os animais não apresentaram alterações. Após a terceira aplicação, um dos animais apresentou apatia e piloereção, indicando desconforto clínico. Após a quarta aplicação, o mesmo animal que evoluiu com convulsão, sendo administrado diazepam (10 mg/kg) por via intrarretal (IR) para controle imediato, apresentando boa resposta terapêutica, sem recorrência das crises. No entanto, o animal veio a óbito quatro dias depois, antes de completar as quatro semanas do experimento.

De forma geral, ao final do experimento, os animais apresentaram pelo discretamente eriçado, redução da autolimpeza e escore corporal mais baixo quando comparados ao início do experimento, possivelmente decorrente da redução do apetite associada à administração do medicamento.

7.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Após a canulação da veia jugular para aplicação de medicamento e da artéria carótida para avaliação da pressão arterial, a análise hemodinâmica foi realizada em quatro momentos, sendo eles os seguintes:

- 1- Antes da aplicação de qualquer medicação;
- 2- Após a aplicação do dimetilsulfóxido (DMSO) isolado;
- 3- Após a estabilização clínica do animal devido à aplicação do DMSO;
- 4- Após a administração do myrtenal.

A análise hemodinâmica revelou que o efeito do myrtenal apresentou correlação direta com a dose administrada, produzindo respostas cardiovasculares de magnitude crescente, caracterizadas por queda significativa da pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Os dados obtidos a partir dos gráficos anexos demonstram que, em todas as concentrações, houve indução de hipotensão, com graus distintos de intensidade e duração.

7.3.1 Grupo 30 μ mol

No grupo tratado com 30 μ mol de myrtenal, os registros de PAM, PAS e PAD indicaram redução moderada em comparação ao grupo controle, tanto após a administração do DMSO quanto após a administração do myrtenal. Embora a

hipotensão tenha sido de menor magnitude em relação às doses superiores, manteve-se consistente e acompanhada de estabilidade clínica, indicando boa tolerância hemodinâmica nessa faixa de concentração.

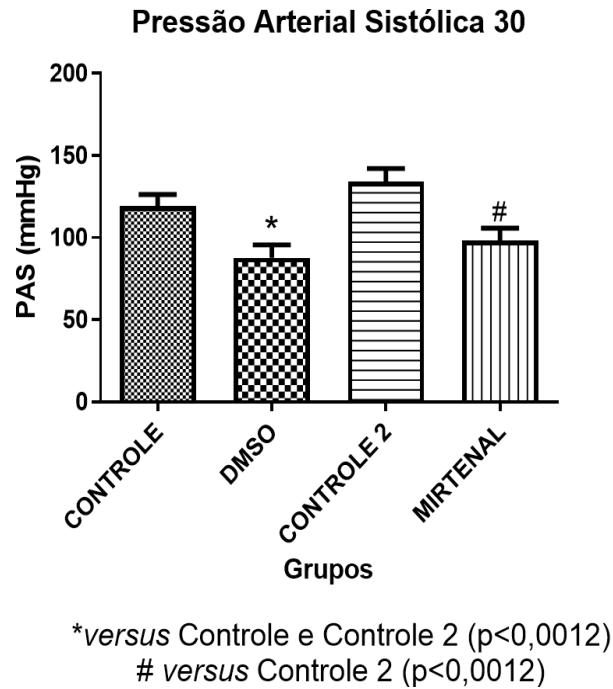


Figura 19. Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 30 μmol .

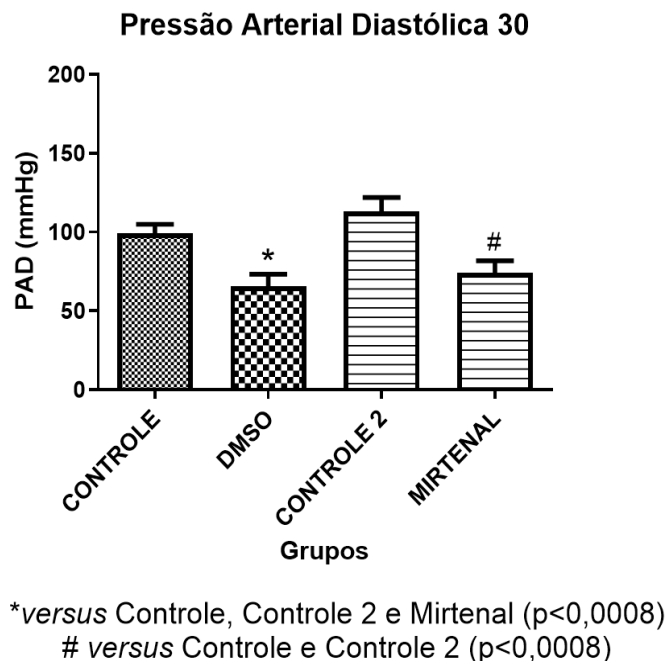
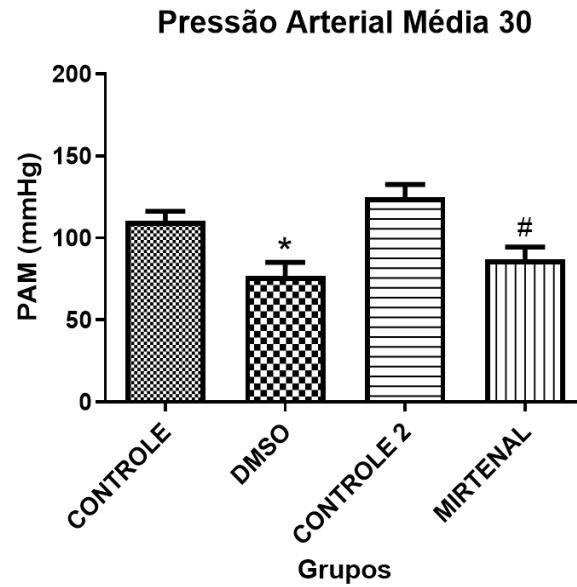


Figura 20. Gráfico da diferença de pressão arterial diastólica após administração de myrtenal na dose de 30 μmol .



*versus Controle, Controle 2 e Mirtenal ($p < 0,0009$)

versus Controle e Controle 2 ($p < 0,0009$)

Figura 21. Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 30 μmol .

7.3.2 Grupo 60 μmol

Nos animais tratados com 60 μmol , foi possível observar uma intensificação do efeito depressor sobre a pressão arterial em todos os momentos avaliados, quando comparados ao grupo controle. Apesar disso, não foram observadas variações abruptas que comprometessem a estabilidade fisiológica.

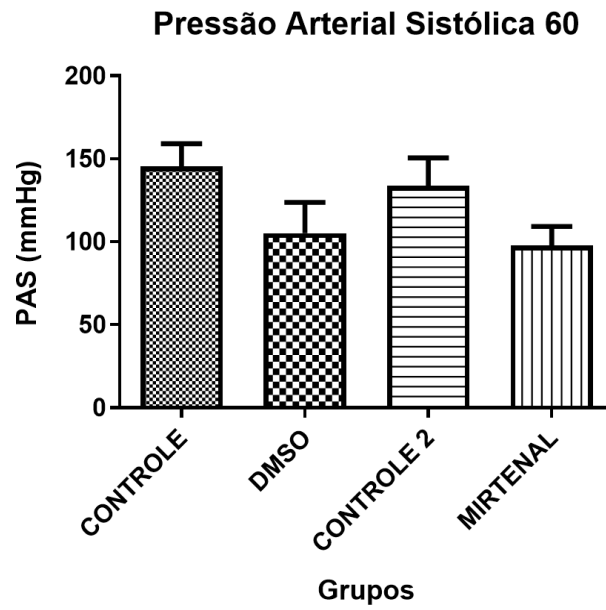


Figura 22. Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 60 μ mol.

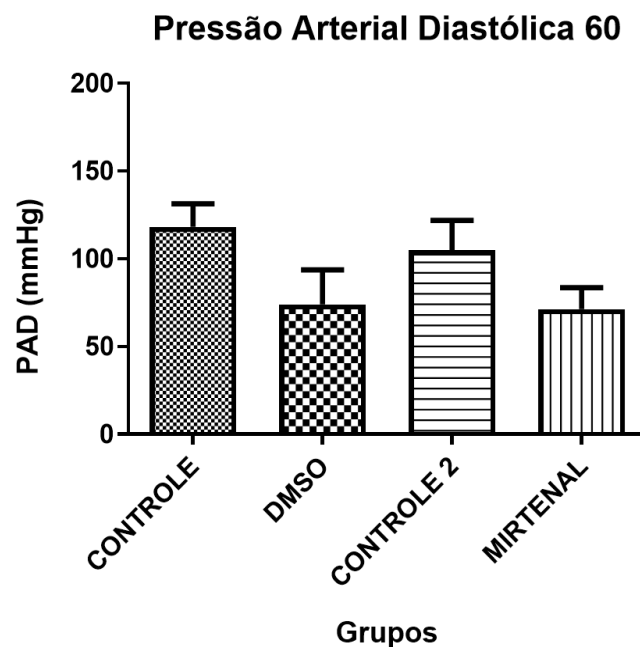


Figura 23. Gráfico da diferença de pressão arterial diastólica após administração de myrtenal na dose de 60 μ mol.

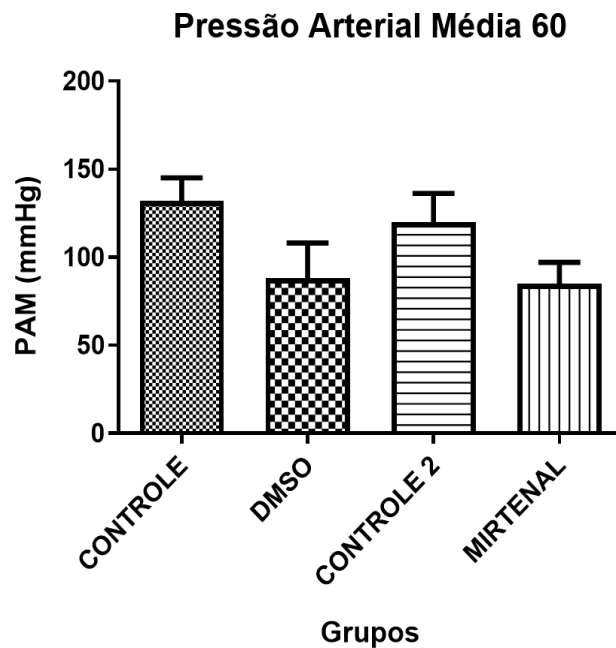


Figura 24. Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 60 μmol .

7.3.3 Grupo 300 μmol

No grupo 300 μmol , verificou-se queda mais expressiva dos valores de PAM, PAS e PAD em todas as medidas, apresentando diferenças significativas ($p < 0,002$) quando comparado aos grupos Controle e Controle 2. A hipotensão foi intensa e de instalação imediata, evidenciando efeito depressor cardiovascular robusto. O restabelecimento da pressão arterial aos níveis basais foi mais lento e incompleto durante o período de monitoramento, sugerindo envolvimento de mecanismos mistos, centrais e periféricos, no controle da resposta.

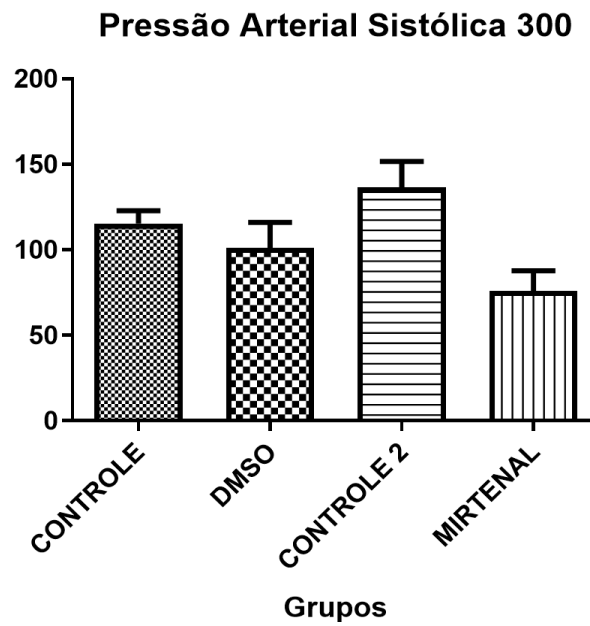
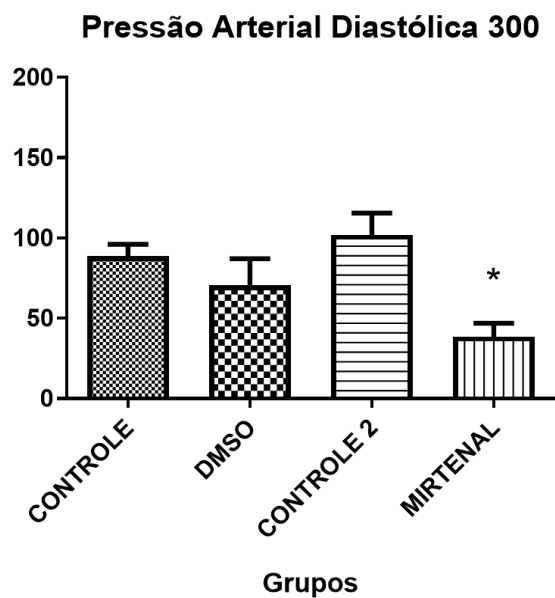
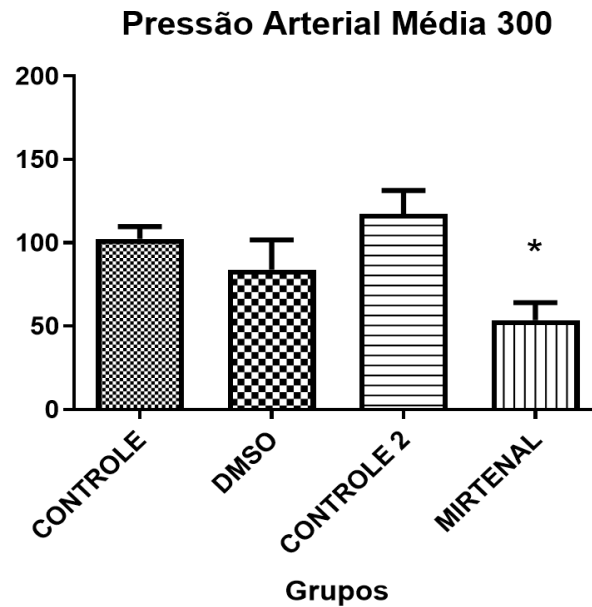


Figura 25. Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 300 μmol .



**versus* Controle e Controle 2 ($p < 0,002$)

Figura 26. Gráfico da diferença de pressão arterial sistólica após administração de myrtenal na dose de 300 μmol .



*versus Controle e Controle 2 ($p < 0,002$)

Figura 27. Gráfico da diferença de pressão arterial média após administração de myrtenal na dose de 300 μmol .

7.3.4 Avaliação da frequência cardíaca

A análise da frequência cardíaca (FC) revelou tendência à bradicardia em todos os grupos tratados. Embora não tenha apresentado significância estatística, o achado não descarta sua relevância clínica. No grupo 30 μmol , a redução da frequência cardíaca foi leve e rapidamente compensada, acompanhando o restabelecimento dos níveis de pressão arterial. No grupo 60 μmol , essa tendência tornou-se mais evidente, coincidindo temporalmente com a queda da PAM. Por fim, no grupo 300 μmol , a bradicardia foi mais pronunciada e sustentada, acompanhando a hipotensão intensa observada, o que sugere sinergismo entre os mecanismos depressor e cronotrópico.

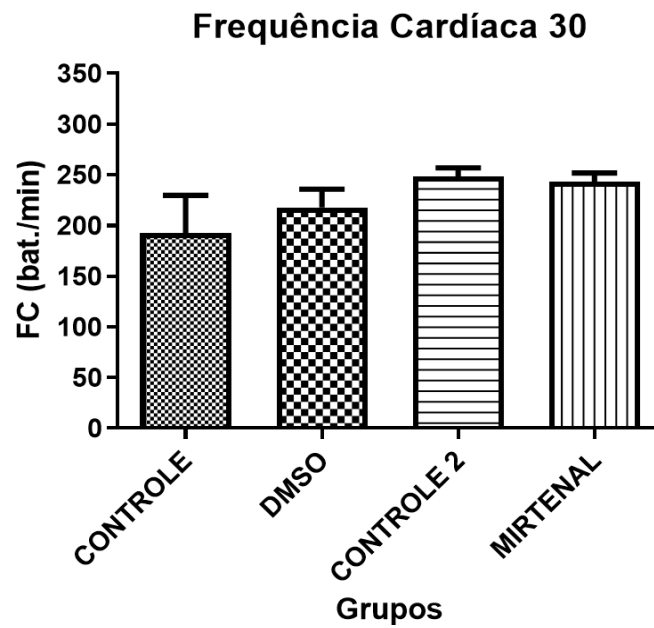


Figura 28. Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 30 μ mol.

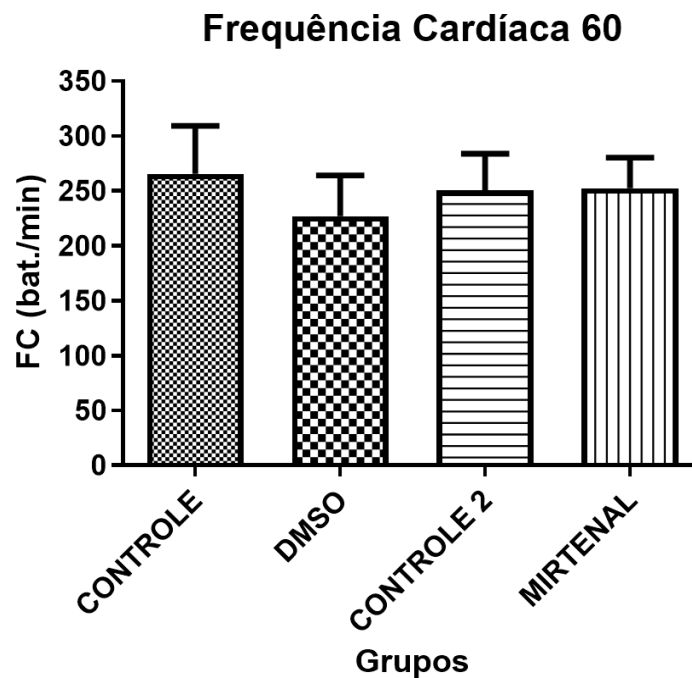


Figura 29. Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 60 μ mol.

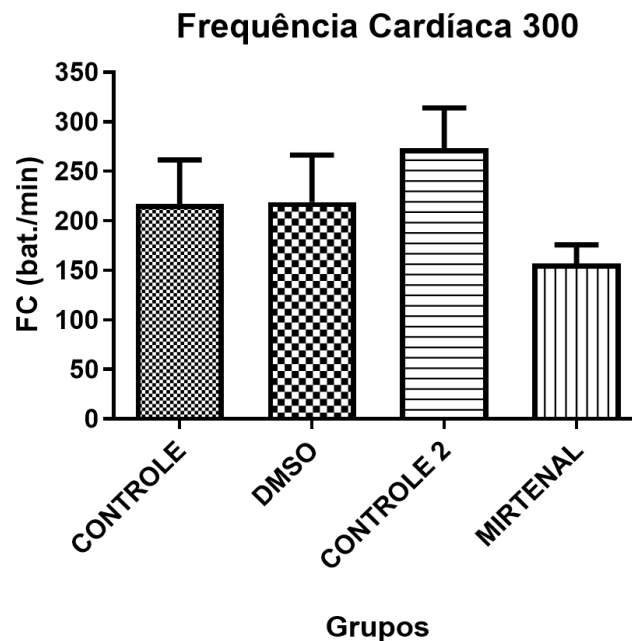


Figura 30. Gráfico da diferença de frequência cardíaca após administração de myrtenal na dose de 300 μmol .

7.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram coletados os seguintes órgãos para análise histopatológica: fígado, rins, coração, testículos e pâncreas. Além disso, o fêmur também foi coletado; porém, restrições de tempo impediram a conclusão de sua análise, por demandar um processo de descalcificação prolongado.

Na avaliação histopatológica foram observadas poucas alterações de relevância clínica, essas alterações ocorreram nos animais que receberam maiores concentrações do myrtenal, notadamente nos grupos 100, 60 e 50 μmol . Também foi identificada alteração em um animal do grupo tratado por via intravenosa com 30 μmol do composto. Esses achados corroboram um padrão dose-dependente entre a exposição ao myrtenal e o grau de dano tecidual observado.

Na avaliação renal, foram identificados achados histopatológicos de caráter leve, que não indicaram injúria renal aguda ou disfunção tecidual. Observou-se ainda que tais alterações foram mais frequentes nos animais pertencentes aos grupos que receberam concentrações mais elevadas do myrtenal.

O achado mais recorrente foi o infiltrado inflamatório, conforme ilustrado na Figura

31. Na Figura 32, observa-se a mesma lâmina, porém com aumento de 40x. Já na Figura 33, nota-se um infiltrado linfocitário. Na avaliação renal, foram identificados alguns achados histopatológicos de caráter leve que não indicam injúria renal aguda ou disfunção tecidual, além disso, foi observado que essas alterações eram mais recorrentes nos animais que pertenciam aos grupos que receberam uma maior concentração do myrtenal.

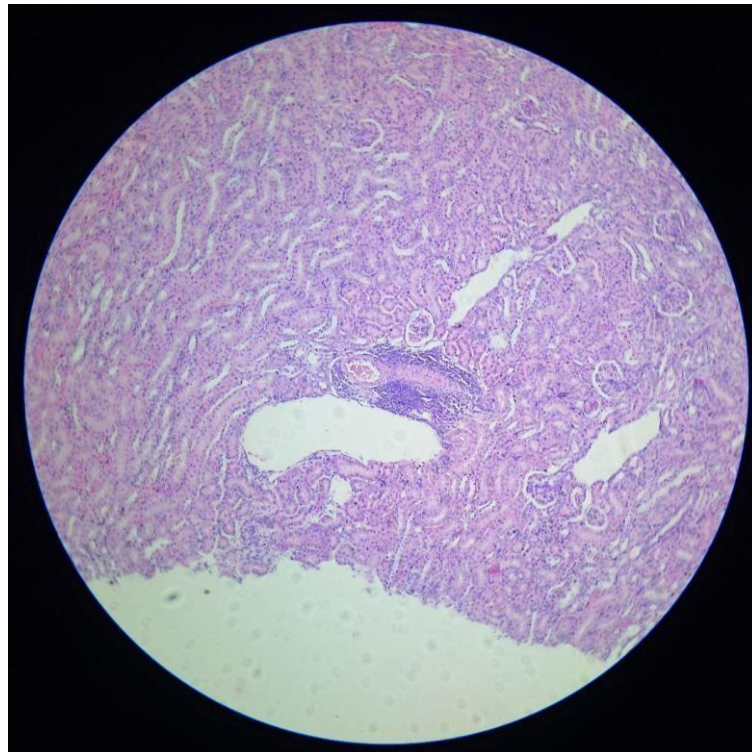


Figura 31. Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado inflamatório após administração de 100 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 10x).

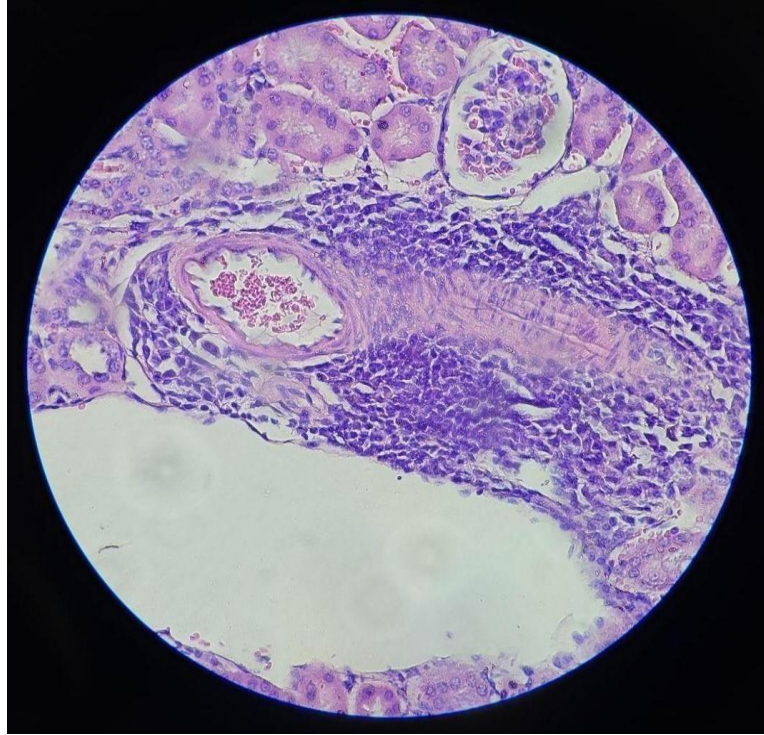


Figura 32. Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado inflamatório após administração de 100 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).

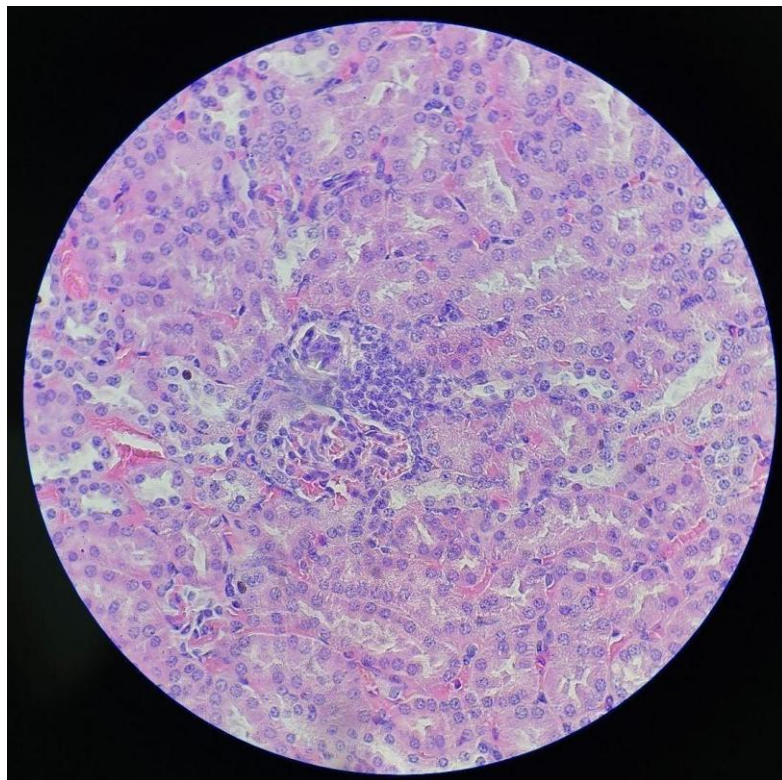


Figura 33. Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando infiltrado linfocitário após administração de 30 μmol de myrtenal via intravenosa (aumento

40x).

Uma alteração identificada em apenas um animal do grupo tratado com 50 μmol foi a presença de túbulo discretamente dilatado (Figura 34), não apresentando relevância clínica.

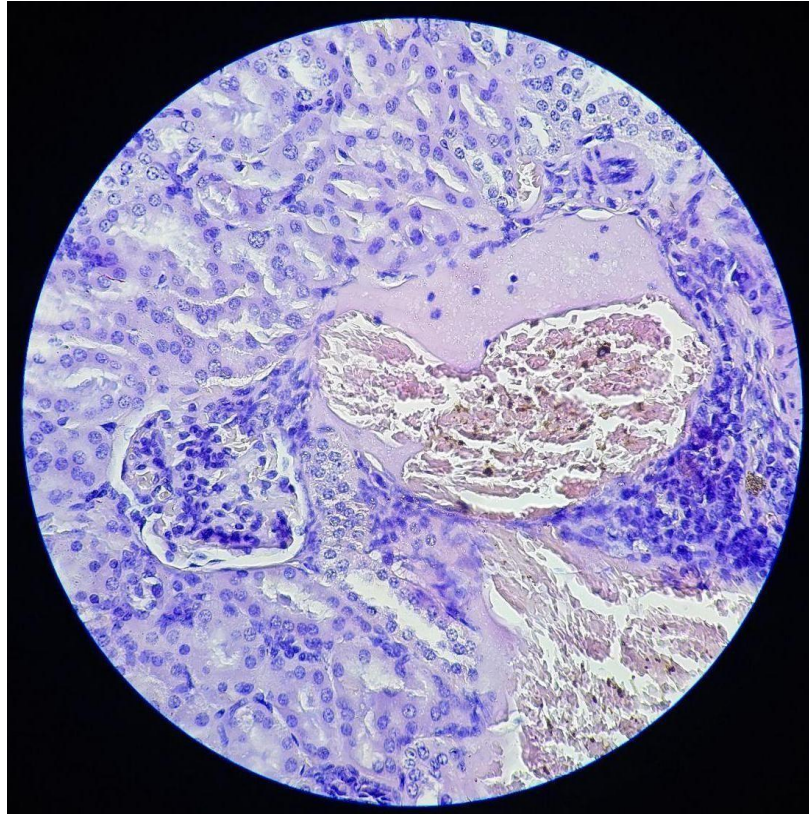


Figura 34. Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando Túbulo renal dilatado após administração de 50 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).

Outro achado histológico recorrentemente observado, porém sem relevância clínica, foi a congestão. Em um dos animais tratados com myrtenal na dose de 100 μmol , a congestão foi acompanhada de hemorragia (Figura 35).



Figura 35. Fotomicrografia de rim de camundongo apresentando congestão e hemorragia após administração de 100 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).

No fígado, foram identificadas alterações em dois animais do experimento. A primeira foi observada em um animal do grupo de 100 μmol , que apresentou degeneração hidrópica (Figura 36). A segunda alteração ocorreu em um animal tratado com 30 μmol por via intravenosa, no qual foram observadas picnose e cariorrexe (Figura 37).

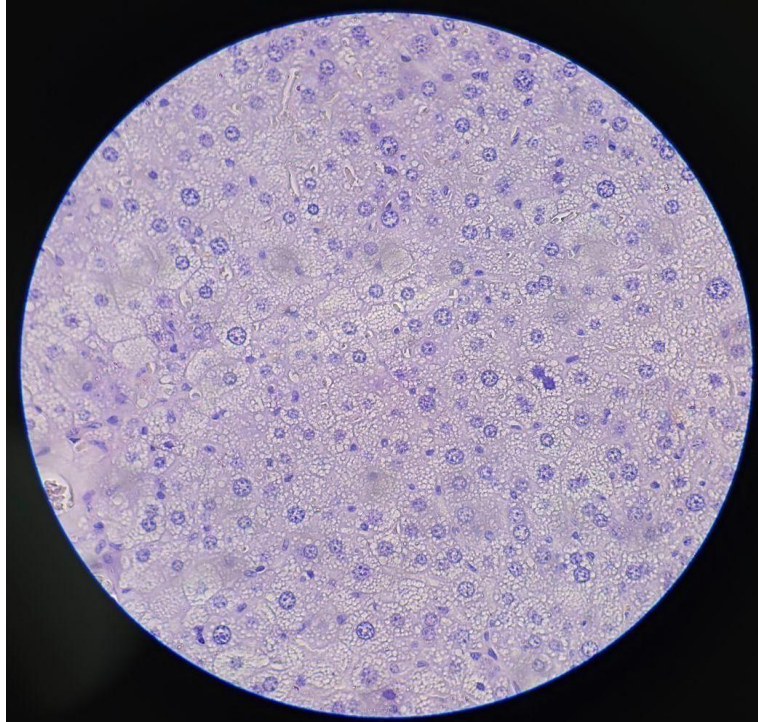


Figura 36. Fotomicrografia de fígado de camundongo apresentando degeneração hidrópica hepática após administração de 50 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 40x).

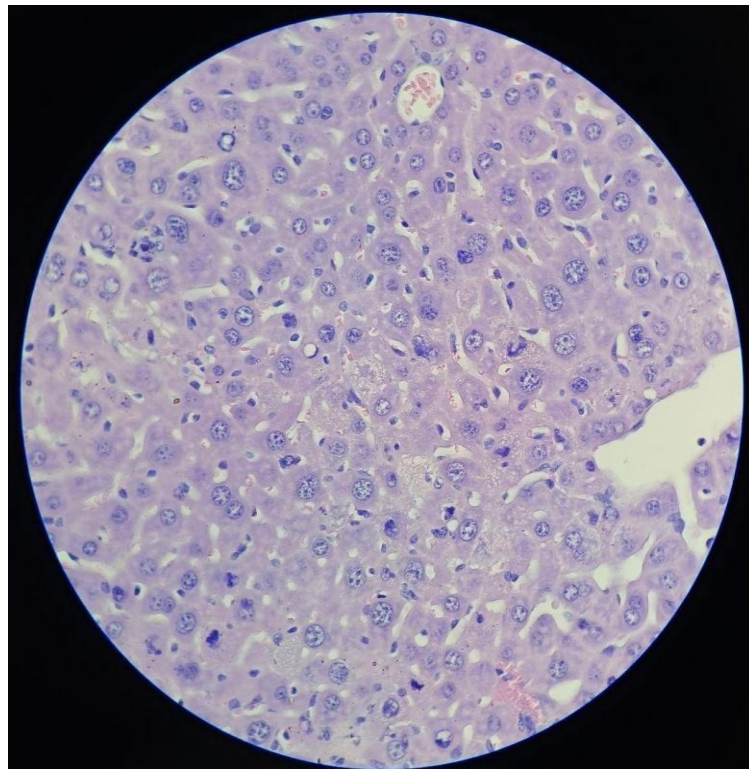


Figura 37. Fotomicrografia de fígado de camundongo apresentando núcleos fragmentados e picnóticos após administração de 30 μmol de myrtenal via intravenosa (aumento 40x).

Um achado isolado observado no tecido pancreático de um animal do grupo de 60 μmol foi leucocitose em vaso peripancreático, conforme ilustrado na Figura 38.

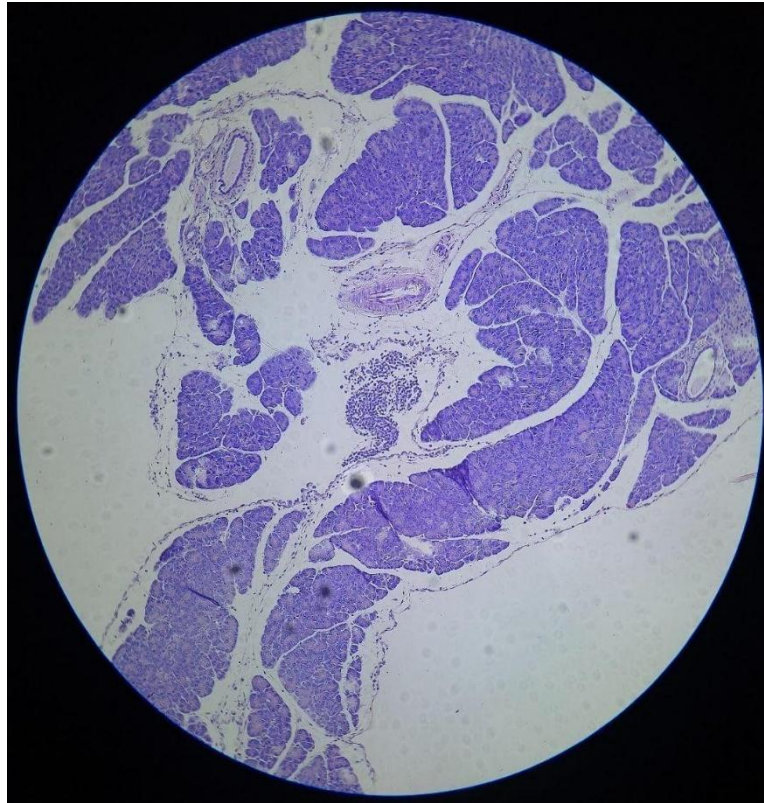


Figura 38. Fotomicrografia de pâncreas de camundongo apresentando leucocitose em vaso peripancreático após administração de 60 μmol de myrtenal via intraperitoneal (aumento 10x).

8. DISCUSSÃO

8.1 AVALIAÇÃO COM ROTAROD

Os efeitos observados nos primeiros 5 minutos após a primeira aplicação sugerem que o fármaco apresenta uma distribuição rápida no organismo e sistema nervoso central. A análise temporal do desempenho dos animais no teste do rotarod mostrou um padrão de neurotoxicidade que ocorre de forma aguda, mas reversível em doses mais baixas. Em todas as doses testadas acima de 10 μmol , os animais exibiram um prejuízo motor ou desconforto nos primeiros minutos pós administração,

seguido por recuperação progressiva ao longo dos 60 minutos de experimento. Essa alteração pode ter como causa um desbalanceamento na homeostasia das vesículas pré-sinápticas, ao comprometer de forma reversível o gradiente ácido-básico no interior dos neurônios (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020). Ao constatar que houve uma alteração no déficit motor de forma proporcional à concentração administrada, é possível afirmar que existe um efeito farmacológico neurotóxico do myrtenal em doses altas e descartar que a alteração ocorreu de forma aleatória.

Ao considerar que os animais que vieram a óbito foram considerados como parcela perdida na análise estatística, a avaliação após uma semana de tratamento diário permitiu observar que o myrtenal não induz tolerância farmacológica. De acordo com Hallare e Gerriets (2025), a meia-vida dos medicamentos deve ser respeitada, pois a alta concentração plasmática da substância pode alcançar níveis tóxicos. Devido à exposição repetida do animal ao fármaco, é possível que o tempo de meia-vida do myrtenal não tenha sido respeitado, indicando que uma ação farmacológica aguda e repetitiva pode levar os animais a óbito, decorrente de efeito acumulativo no organismo.

Foi possível constatar que concentrações iguais a 50 μmol ou mais altas, causam neurotoxicidade e são inviáveis para administração via intraperitoneal por levarem o animal a episódios de convulsão e morte. A dose de 30 μmol representa um candidato de risco, pelo fato de ainda haver uma mortalidade de 30% dos animais desse grupo e alterações do sistema nervoso. Por outro lado, a concentração de 10 μmol seria a considerada mais segura, pois apresentou leve a ou nenhum efeito no SNC dos animais. A dose de 10 μmol corresponde a 80 mg/kg em camundongos, sendo esta ligeiramente maior quando comparada à utilizada em experimentos realizados por Silva et al. (2014), Britto et al., 2018, Rajzadeh et al. (2019) e Martins et al. 2019.

O efeito depressor causado pelo myrtenal sugere que ele atua de forma rápida, porém reversível em doses até 10 μmol , sem consequências fisiológicas graves. As alterações ocorrem de forma dose-dependente e existe um acúmulo do fármaco quando administrado diariamente, o que se confirma com o número de óbitos ocorridos no decorrer do experimento. Portanto, é necessário que seja investigado o grau de invasão da barreira hematoencefálica pelo myrtenal e a caracterização dos metabólitos gerados pela sua ação no organismo, assim como o

seu tempo de meia-vida para determinação do intervalo de administração do fármaco.

8.2 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO VIA INTRAVENOSA EM CAMUNDONGOS

Os resultados do regime de administração por via intravenosa, com um intervalo de tempo mais espaçado entre as aplicações — sendo ele de sete dias, por quatro semanas — revelaram um nível de segurança mais favorável quando comparado à aplicação do myrtenal via intraperitoneal, realizada a cada 24 horas durante sete dias. Isso pode ter ocorrido devido ao maior tempo disponível para metabolização e excreção do fármaco, evitando seu acúmulo e respeitando o tempo de meia-vida (HALLARE e GERRIETS, 2025). A observação de que alguns animais apresentaram emagrecimento mostra que, a longo prazo, a medicação pode causar alterações gastrointestinais e falta de apetite, mas que poderiam ser revertidas com o interrompimento do tratamento.

A mortalidade de 10% em um grupo de 10 animais pode ter ocorrido de forma isolada, pois o mesmo animal apresentou maior suscetibilidade ao fármaco desde a primeira aplicação. Essa sensibilidade poderia estar relacionada a uma predisposição individual e baixa tolerância ao composto, por variação na expressão individual de V-ATPase em órgãos, além de diferenças na permeabilidade da barreira hematoencefálica, que fariam uma exposição maior do SNC ao fármaco. Como observado por Akefe et al. (2022), o uso do myrtenal para tratamento de doenças neurodegenerativas poderia ser viável, pela natureza anti-inflamatória e antioxidante do composto. Isso confirma que ele consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica, mas é necessário que essa passagem ocorra de forma equilibrada para que não ocorram alterações neurotóxicas observadas durante o experimento. Para definir a verdadeira natureza deste efeito adverso, seria necessário um estudo com um N maior e avaliação da metabolização e excreção do myrtenal no organismo.

8.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

O comportamento inicial observado após a administração do DMSO, com queda momentânea e subsequente estabilização da pressão, foi compatível com o efeito vasodilatador desse solvente, frequentemente relatado em estudos de infusão experimental (SILVA et al., 2021). No entanto, a hipotensão mais pronunciada foi verificada após o uso do myrtenal, evidenciando sua ação farmacológica específica. A inibição parcial da bomba vacuolar de prótons (V-ATPase) pode reduzir a sensibilidade do sistema contrátil vascular ao cálcio, promovendo relaxamento da musculatura lisa arteriolar e consequente diminuição da resistência periférica total. Tal mecanismo explica a resposta hipotensiva observada, uma vez que o myrtenal atua diretamente no bloqueio da V-ATPase, o que pode levar ao desequilíbrio iônico da célula endotelial (COLLINS e FORGAC, 2020). A leveza do efeito nessa dose sugere envolvimento inicial do componente endotelial, sem repercussão autonômica expressiva.

Foi observado que na concentração de 60 μmol , o reflexo barorreceptor não foi capaz de compensar adequadamente a hipotensão, conforme demonstrado pela ausência de aumento concomitante da frequência cardíaca. Essa ausência de resposta reflexa indica possível ação moduladora do myrtenal sobre núcleos autonômicos centrais, como o núcleo do trato solitário (NTS), estrutura responsável pelo controle da resposta simpática e parassimpática (KAWADA et al., 2021).

De acordo com Rognant e colaboradores (2023), a inibição acentuada da V-ATPase em doses elevadas promove acidificação intracelular e bloqueio do efluxo de cálcio, prejudicando a contratilidade muscular e reduzindo a excitabilidade vascular e cardiomiocitária. Esse mecanismo pode justificar a hipotensão acentuada e sustentada observada nos animais tratados com 300 μmol , indicando que não há uma vasoconstrição reflexa associada à bradicardia. Os resultados obtidos permitem verificar que o myrtenal induz efeito hipotensor e bradicárdico dose-dependente, por mecanismos que envolvem tanto a ação direta sobre a musculatura vascular, via inibição da V-ATPase, quanto a interferência sobre o controle autonômico central.

Em doses baixas, de 30 μmol , os efeitos são leves e reversíveis, mantendo estabilidade hemodinâmica. Em dose intermediária de 60 μmol , observa-se maior magnitude do efeito e indícios de modulação autonômica, mas sem importância clínica. Já em alta dose (300 μmol), há depressão cardiovascular marcante, em que a frequência cardíaca acompanha o efeito hipotensor do myrtenal. Essa relação dose-resposta do composto indica que o limite superior de 300 μmol ultrapassa a

janela terapêutica segura, produzindo efeitos hemodinâmicos adversos e possivelmente tóxicos. Essa constatação é relevante para a determinação futura da dose segura em modelos veterinários, reforçando que concentrações superiores comprometem a estabilidade cardiovascular, exigindo acompanhamento hemodinâmico contínuo em aplicações experimentais. Esses resultados contribuem para a caracterização farmacotóxica do myrtenal e servem de base para o estabelecimento de futuras investigações sobre a segurança e eficácia do composto em modelos de pesquisa.

8.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os resultados obtidos revelam que existe um limiar de tolerância orgânica para o myrtenal. Doses abaixo de 50 μmol , embora capazes de induzir toxicidade neurológica aguda, não foram suficientes para causar lesões estruturais detectáveis na maioria dos órgãos. Por outro lado, doses iguais ou superiores a 50 μmol ultrapassam esse limiar, produzindo toxicidade com leve comprometimento histológico.

8.4.1 Avaliação renal

O achado mais comum encontrado foi o infiltrado inflamatório, o que indica que houve uma injúria inicial, progredindo para uma resposta sistêmica e em que o organismo reconhece o dano celular e inicia um processo inflamatório. Esse achado faz contraste com estudos realizados por Silva et al. (2014) e Rajizadeh et al. (2019), nos quais foi possível observar uma mediação anti-inflamatória do myrtenal nos animais tratados.

A presença de túbulo renal dilatado poderia estar relacionada à inibição das bombas de prótons, que atuam na acidificação urinária e reabsorção nos túbulos renais. Uma inibição parcial poderia comprometer esse processo, levando à dilatação, além de induzir uma acidose tubular renal distal (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020). A congestão encontrada em tecido renal sinaliza estase sanguínea e possivelmente aumento da permeabilidade vascular, evidenciando que

houve, mesmo em baixo grau, dano ao endotélio vascular. A hemorragia, alteração causada por ruptura de vasos sanguíneos, poderia corroborar essa hipótese; porém, foi uma alteração observada em apenas um dos animais tratados, o que não é estatisticamente relevante, uma vez que pode ter ocorrido devido a fatores individuais do animal em questão.

8.4.2 Avaliação hepática

No fígado, foram encontradas alterações em animais do grupo de 100 μmol e de 30 μmol , quando administrado por via intravenosa. Isso mostra que a maior biodisponibilidade leva a um consequente estreitamento da janela terapêutica, devido à maior concentração plasmática.

A primeira lesão citada foi a degeneração hidrópica, mostrada na Figura 15, uma lesão que indica que as células hepáticas podem estar sob estresse metabólico, o que pode ter ocorrido devido à sobrecarga medicamentosa pela alta dose do composto. Embora seja um marcador de injúria hepatocelular, é considerada uma lesão reversível. O segundo achado foi considerado mais significativo. A lesão hepática encontrada em um animal do grupo de 30 μmol do myrtenal, quando aplicado por via intravenosa, apresentou picnose, que consiste no encolhimento e condensação do núcleo celular, e cariorrexe, caracterizada pela fragmentação nuclear (Figura 16), essas lesões são características de morte celular por necrose ou apoptose. Esse achado indica que a administração por via intravenosa estreita a janela terapêutica do myrtenal. Isso corrobora os princípios da farmacocinética, segundo os quais o pico de concentração plasmática, elevado e abrupto pela via intravenosa, é maior quando comparado à via intraperitoneal, que ocorre de forma mais lenta (SHOYAIB et al., 2020). Embora seja um evento isolado, é considerado um dos achados mais importantes do estudo, pois é uma lesão considerada grave, evidenciando que existe uma restrição da medicação para administração via intravenosa.

8.4.3 Avaliação pancreática

A toxicidade pancreática necessita de atenção, pois pode indicar risco de disfunção endócrina ou exócrina, devido à importante função da V-ATPase nesse

órgão (VASANTHAKUMAR e RUBINSTEIN, 2020). O infiltrado leucocitário encontrado em vaso peripancreático pode indicar uma resposta inflamatória localizada. O achado não é considerado uma lesão no parênquima, mas pode evidenciar uma reação imunológica da microvasculatura pancreática, mostrando que é necessário ter atenção voltada para esse órgão em futuros estudos e caso o myrtenal venha a ser utilizado como antitumoral, pois pode existir o risco de pancreatite mediada por intoxicação medicamentosa, principalmente em indivíduos suscetíveis.

8.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do experimento realizado por Martins et al. 2019 mostraram que a dose de 15 mg/kg foi eficaz para destruir células de melanoma metastático no pulmão, sendo essa dose menor do que a dose de 10 μ mol utilizada no presente estudo. Isso sugere que a dose pode ser reajustada para verificação de aumento de eficácia contra as células metastáticas. As células saudáveis, embora apresentem V-ATPases, podem não ser tão dependentes da enzima quando comparadas às células tumorais, que necessitam dela para sua sobrevivência e invasão. A dose de 10 μ mol pode ser suficiente para bloquear as V-ATPases superexpressas nas células tumorais, sem ultrapassar o limiar que causaria uma disfunção grave de tecidos saudáveis.

Com base na progressão de toxicidade documentada durante o trabalho, em que se evidenciou uma relação dose-dependente, levanta-se a hipótese de que uma concentração intermediária de 20 μ mol poderia representar uma dose segura, o que possibilitaria a maximização da eficácia antitumoral, sem inviabilizar a segurança sistêmica do medicamento. Sendo assim, é necessária uma investigação mais detalhada nessa dose. É importante ressaltar que existe uma ação de toxicidade neurológica dose-dependente, o que pode levar à hipotensão e à bradicardia em doses muito altas. A análise histopatológica confirmou a natureza dose-dependente da toxicidade, identificando os rins e o fígado como os principais órgãos-alvo, com alterações que caminham de estresse celular para sinais de injúria grave em doses mais altas ou quando administrado por via intravenosa. É necessário realizar a avaliação do metabólito do myrtenal para elucidação do seu

tempo de meia-vida no organismo e para definição do intervalo de administração ideal, pois foi possível verificar que existe um efeito cumulativo no organismo quando administrado durante sete dias subsequentes nas doses acima de 10 μmol . Outra avaliação necessária é a análise bioquímica das enzimas que indicam lesão renal e hepática, para maior elucidação dos danos teciduais, uma vez que, no exame histopatológico, foi possível observar poucas alterações, que, embora consideradas graves, ocorreram em um pequeno grupo da amostra tratada.

9. CONCLUSÕES

Com base no presente trabalho, foi possível observar que as doses comumente utilizadas são seguras, mesmo quando administradas de forma crônica. Entretanto, existe a possibilidade de realizar um aumento dessa dose antes que ela se torne potencialmente fatal, o que poderia ocorrer em uma dose intermediária de 20 μmol . Não foram encontradas lesões anatomopatológicas que indicassem toxicidade grave em concentrações abaixo de 50 μmol . Além disso, alterações na análise hemodinâmica foram observadas apenas em ratos que receberam 300 μmol , mas não foram consideradas significativas, sendo possível observar a recuperação desses animais em um breve período de tempo.

Os dados da literatura apontam para uma superexpressão da enzima V-ATPase em alguns tipos de células tumorais e que o myrtenal possui a capacidade de inibi-la, levando à destruição celular. Essa vulnerabilidade da célula tumoral pode ser explorada tanto na dose de 10 μmol , como também em uma dose intermediária de 20 μmol , levando em consideração o princípio da dose máxima tolerada, amplamente utilizado em tratamentos quimioterápicos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEFE, I.O.; ADEGOKE, V.A.; LAMIDI, I.Y.; AMEH, M.P.; IDOGA, E.S.; UBAH, S.A.; AJAYI, I.E. Myrtenal mitigates streptozotocin-induced spatial memory deficit via improving oxido-inflammatory, cholinergic and neurotransmitter functions in mice. **Pharmacology and Drug Discovery**. v. 3, p. 100106, 2022.

ARAKAWA, H.; MATSUSHITA, K.; ISHIGURO, N. Advanced in vitro evaluation of drug-induced kidney injury using microphysiological systems in drug discovery and development. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 61, p. 101056, 2025.

BALTAZAR, F.; VALENTE, D.; AFONSO, J.; QUEIRÓS, O.; GRANJA, S. New horizons on pH regulators as cancer biomarkers and targets for pharmacological intervention. **An Innovative Approach to Understanding and Treating Cancer: Targeting pH**. v. 1, p. 417-450, 2020.

BARBHUIYA, P.A.; PATHAK, M.P. Myrtenol: A promising terpene with potent pharmacological properties. **Pharmacological Research – Natural Products**. v. 4, p. 100067, 2024.

BRITTO, R.M. SILVA-NETO, J.A.D.; MESQUITA, T.R.R.; VASCONCELOS, C.M.L.; DE ALMEIDA, G.K.M.; DE JESUS, I.C.G.; DOS SANTOS, P.H.; SOUZA, D.S.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; DE SA, L.A.; DOS SANTOS, F.S.M.; PEREIRA-FILHO, R.N.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUATIMOSIM, S.; LAUTON-SANTOS, S. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**. v. 117, p. 557-566, 2018.

COLLINS, M.P.; FORGAC, M. Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. v. 1862, n. 12, p. 183341, 2020.

DRAGOMANOVA, S.; TANCHEVA, L.; GEORGIEVA, M. Biological activity of myrtenal and some myrtenal-containing medicinal plant essential oils. **Scripta Scientifica Pharmaceutica**. v. 5, n. 2, p. 22-33, 2018.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, p. 208-209, 1957.

EATON, A.F.; MERKULOVA, M.; BROWN, D. The H_p-ATPase (V-ATPase): from proton pump to signaling complex in health and disease. **American Journal of**

Physiology – Cell Physiology. v. 320, n. 3, p. C392-C414, 2021.

FERGUSON, S.M. Neuronal lysosomes. **Neuroscience Letters**. v. 697, p. 1-9, 2019.

GUO, Y.J.; PAN, W.; LIU, S.; SHEN, Z.; XU, Y.; HU, L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Oncology Letters**. v. 19, n. 3, p. 1997-2007, 2020.

HALLARE, J.; GERRIETS, V. Elimination half-life drugs. **StatPearls Publishing**. p. 1-12, 2025.

JEONG, S.H.; JANG, J.H.; LEE, Y.B. Pharmacokinetic comparison of three different administration routes for topotecan hydrochloride in rats. **Pharmaceuticals**. v. 13, n. 9, p. 231, 2020.

KAWADA, T.; NISHIKAWA, T.; HAYAMA, Y.; LI, M.; ZHENG, C. Quantitative assessment of the central versus peripheral effect of intravenous clonidine using baroreflex equilibrium diagrams. **The Journal of Physiological Sciences**. v. 71, p. 39, 2021.

LEONG, S.P.; NAZEROVA, K.; KELLER, L.; PANTEL, K.; WITTE, M. Molecular mechanisms of cancer metastasis via the lymphatic versus the blood vessels. **Clinical & Experimental Metastasis**. v. 39, p. 159-179, 2022.

MANÇANO, A.S.F.; PINA, J.G.; FROES, B.R.; SCIANI, J.M. Autophagy-lysosomal pathway impairment and cathepsin dysregulation in Alzheimer's disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**. v. 11, p. 1490275, 2024.

MARTINS, B.X. ARRUDA, R.F.; COSTA, G.A.; JERDY, H.; DE SOUZA, S.B.; SANTOS, J.M.; DE FREITAS, W.R.; KANASHIRO, M.M.; DE CARVALHO, E.C.Q.; SANT'ANNA, N.F.; ANTUNES, F.; MARTINEZ-ZAGUILAN, R.; SENNOUNE, S.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; FAÇANHA, A.R. Myrtenal-induced V-ATPase inhibition: a toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**. v. 1863, n. 1, p. 1-12, 2019.

MASYITA, A.; SARI, R.M.; ASTUTI, A.D.; YASIR, B.; RUMATA, N.R.; EMRAN, T.B.; NAINU, F.; GANDARA, J.S. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food Chemistry: X**. v. 13, p. 100217, 2022.

MCGUIRE, C.M.; COLLINS, M.P.; SUN-WADA, G.; WADA, Y.; FORGAC, M. Isoform-specific gene disruptions reveal a role for the V-ATPase subunit a4 isoform in the invasiveness of 4T1-12B breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**. v. 294, n. 29, p. 11248-11258, 2019.

MOURA, J.A.; MONTEIRO, M.C.; SOUSA, C.L.B.; COSTA, N. Clinical and hematological follow-up of patients with canine mastocytoma submitted to chemotherapy and electrochemotherapy: case report. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary**. v. 13, n. 2, p. 252-265, 2019.

OLIVEIRA, V.M.; CORREIA, S.S.; MORAIS, C.R. Principais neoplasias cutâneas em cães: uma revisão de literatura. **Revista Multidisciplinar em Saúde**. v. 2, n. 3, p. 130, 2021.

ONUCHIC, A.C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina (São Paulo)**. v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

OOT, R.; WILKENS, S. Human V-ATPase function is positively and negatively regulated by TLDC proteins. **Molecular Cell**. v. 32, n. 7, p. 989-1000, 2024.

QUICK, J.D.; SILVA, C.; WONG, J.H.; LIM, K.L.; REYNOLDS, R.; BARRON, A.M.; ZENG, J.; LO, C.H. Lysosomal acidification dysfunction in microglia: an emerging pathogenic mechanism of neuroinflammation and neurodegeneration. **Journal of Neuroinflammation**. v. 20, p. 187, 2023.

RAJIZADEH, M.A.; NAJAFIPOUR, H.; FEKR, M.S.; ROSTAMZADEH, F.; JAFARI, E.; BEJESHK, M.A.; ARDAKANI, Y.M. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in rats with allergic asthma. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**.

v. 18, p. 1-10, 2019.

RATHINAM, A.; PARI, L. Myrtenal ameliorates hyperglycemia by enhancing GLUT2 through Akt in the skeletal muscle and liver of diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**. v. 256, p. 161-166, 2016.

ROGNANT, S.; BALDWIN, S.N.; PRITCHARD, H.A.T.; GREENSTEIN, A.; CALLOE, K.; AALKJAER, C.; JEPPE, T.A. Acute, pro-contractile effects of prorenin on rat mesenteric arteries. **The FASEB Journal**. v. 37, n. 12, p. e23282, 2023.

SAHOTA, T.; DANHOF, M.; DELLA PASQUA, O. Pharmacology-based toxicity assessment: towards quantitative risk prediction in humans. **Mutagenesis**. v. 31, n. 3, p. 359-374, 2016.

SHOYAIB, A.A.; ARCHIE, S.A.; KARAMYAN, V.T. Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? **Pharmaceutical Research**. v. 37, n. 1, p. 12, 2020.

SILVA, B.I.M.; NASCIMENTO, E.A.; SILVA, C.; SILVA, T.; AGUIAR, J.S. Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review. **Molecular Biology Reports**. v. 48, p. 5775-5785, 2021.

SILVA, R.O. SALVADORI, M.S.; SOUSA, F.B.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, N.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; OLIVEIRA, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; DE ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, J-V.R. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol in mice. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.

SONG, Q.; MENG, B.; XU, H.; MAO, Z. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. **Translational Neurodegeneration**. v. 9, p. 17, 2020.

SU, H. HE, H.; SUN, C.; WANG, X.; LIU, X. Prediction of drug-induced hepatotoxicity based on histopathological whole slide images. **Methods**. v. 212, p. 31-38, 2023.

WANG, L.; WU, D.; ROBINSON, C.V.; WU, H.; FU, T.M.; et al. Structures of a complete human V-ATPase reveal mechanisms of its assembly. **Molecular Cell**. v. 80, n. 3, p. 501-511, 2020.

WAUGH, A. **Ross & Wilson: Anatomia e fisiologia integradas**. 13. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 568 p., 2021.

WEYDEN, L.; BRENN, T.; PATTON, E.E.; WOOD, G.A.; ADAMS, D.J. Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. **The Journal of Pathology**. v. 252, p. 4-21, 2020.

VASANTHAKUMAR, T.; RUBINSTEIN, J.L. Structure and roles of V-type ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 45, n. 4, p. 295-307, 2020.

VIANA, A.F.; SILVA, F.V.; FERNANDES, H.B.; OLIVEIRA, I.S.; BRAGA, M.A.; NUNES, P.I.G.; VIANA, D.A.; SOUSA, D.P.; RAO, V.S.; OLIVEIRA, R.C.M.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 68, n. 8, p. 1083-1092, 2016.

YANG, F.; ZHONG, W.J.; CAO, J.; TAN, J.; LI, B.; MA, L. Matrine induces V-ATPase-dependent cytoplasmic vacuolation and inhibits lysosomal function in leukemia cells. **Pharmaceutical Sciences Advances**. v. 2, p. 100013, 2024.