



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO-ICED
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS-PCNAT
CURSO DE LICENCIATURA INTEGRADA BIOLOGIA E QUÍMICA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS APÓS
EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBAGUDA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia*
***origanoides* Kunth (VERBENACEAE)**

ELAINE SOUZA DA SILVA

SANTARÉM-PA
SETEMBRO, 2016

ELAINE SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS APÓS
EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBAGUDA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
origanoides* Kunth (VERBENACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Licenciatura Integrada Biologia e
Química da Universidade Federal do
Oeste do Pará, para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Dra. SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

SANTARÉM-PA
SETEMBRO, 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por tudo que fez e faz na minha vida, por me dar forças para eu chegar até aqui.

Aos meus sobrinhos-filhos, **Ellem Fabiana Araújo** e **Felipe Gabriel Silva Dutra**, por serem a fonte de alegria e inspiração na minha vida, por eles e para eles eu quero ser e fazer o melhor sempre. Amo mais que tudo.

Aos meus irmãos, **Elane Souza**, **Ezaine Souza**, **Joabe Souza**, **Joel Souza** e **Daniel Souza**, pelo amor, respeito e admiração que sempre me dedicaram, não tenho palavras para expressar o quanto eu, os amo, e quão importantes são na minha vida.

A minha mãe, **Quézia Souza dos Santos**, por todas as orações, por todo o amor, por acreditar e por estar sempre ao meu lado. Eu te amo, Mãe.

Em especial, ao meu namorado **Sandro Aléssio Vidal de Souza**, por tudo que representa na minha vida e por ser tão importante nessa conquista. A pessoa mais maravilhosa que já conheci, que esteve ao meu lado nos momentos felizes e nas horas mais difíceis, ajudando-me em tudo que precisava. À você meu querido, dedico todo o meu amor, respeito e admiração. Eu te amo.

À todos os **meus amigos da Biologia e Química 2011** especialmente, **Rogério Ribeiro**, **Fernanda Bonfim**, **Leandro Portela**, **Carlos Rafael**, **Lorena Viana**, **Heldervan Oliveira** e **Vanessa Maciel**, por todos momentos que passamos juntos, compartilhando tudo o que tínhamos para oferecer um ao outro.

A toda equipe do **Centro Pedagógico de Apoio ao Desenvolvimento Científico – CPADC**, especialmente ao Professor **Everaldo do Carmo**, neste período como coordenador, por ter me dado a primeira oportunidade como monitora-bolsista dentro da Universidade, por acreditar em mim e por todo o incentivo. O meu desempenho como discente, foi significativo logo que comecei a fazer parte desse grupo.

A todos os meus professores da graduação, que foram essenciais na minha formação, em especial a **Chieno Suemitsu**, **Hornoly Kátia**, **Fábio Rogério** e **Gabriel Iketani** e **Ricardo Bezerra**.

A minha orientadora Prof^a. **Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin**, pelo apoio, disponibilidade, estímulo, paciência e conhecimentos transmitidos, a quem tenho profunda admiração, respeito e carinho. Seus ensinamentos foram indispensáveis para construção desse trabalho.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – LABBEX**, coordenado pelos Profs. **Dra. Rosa Helena Veras Mourão e Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira**, Campus Rondon da Universidade Federal do Oeste do Pará, pelo espaço cedido para realização do ensaio experimentais.

Ao **Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência- PIBID/CAPES**, pela concessão de bolsa e por proporcionar-me a oportunidade de vivenciar a prática docente ainda na graduação. A todos os professores coordenadores, supervisores e alunos integrantes desse projeto, muito obrigado.

A **Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA**, Programa de Ciências Naturais-PCNAT, pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

Lippia origanoides Kunth é uma espécie vegetal da família Verbenaceae, conhecida popularmente como “Salvia-de-Marajó” e Alecrim-do-Campo”. Esta espécie é utilizada na medicina popular no tratamento de doenças respiratórias, distúrbios gastrointestinais ou como antisséptico de uso tópico. Apesar dos relatórios farmacológicos descritos para *L. origanoides*, não há evidência científica relacionada ao seu uso seguro. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos toxicológicos do óleo essencial de *Lippia origanoides*, através de ensaios agudo-letais frente à *Artemia salina*, toxicidade aguda determinada em camundongos Swiss albinos, e toxicidade subaguda, utilizando ratos da linhagem Wistar como modelo experimental. Neste último, foram avaliados parâmetros de comportamento e aprendizado, por meio dos testes: labirinto aquático de Morris, labirinto em Y, teste caixa claro-escuro e rota-rod. No bioensaio de toxicidade frente à *A. salina*, o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou valores de CL₅₀ determinados em 52,4 µg mL⁻¹, sendo considerado altamente tóxico. Na avaliação da toxicidade aguda, a DL₅₀, obtida por interpolação semi logarítmica, foi determinada em 1.673,84 mg kg⁻¹, indicando baixa toxicidade. Em relação à avaliação neurocomportamental em ratos, o óleo essencial de *L. origanoides* não apresentou toxicidade, determinada após avaliação de alterações comportamentais e motoras. Assim, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos sugerir que o óleo essencial de *L. origanoides* apresenta baixa toxicidade e não causa efeitos toxicológicos neurocomportamentais nas doses avaliadas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Lippia origanoides*, toxicidade, comportamento animal, *A. salina*.

ABSTRACT

Lippia origanoides Kunth it is a plant specie of the family Verbenaceae, popularly known as “Salva-de-Marajó” and “ Alecrim-do-Campo”. This specie is used in folk medicine to treat respiratory diseases, gastrointestinal disorders or as an antiseptic topical. Despite the pharmacological reports described for *L. origanoides*, there is no scientific evidence related to their safe use. Thus, the objective of this study was to evaluate the possible toxicological effects of essential oil *Lippia origanoides*, through acute lethal assays on *Artemia salina*, acute toxicity determined in Swiss albino mice, and subacute toxicity using Wistar mice as a experimental model. In the latter, were assessed behavior and learning parameters through the tests: the Morris water maze, Y maze, light/dark box and swivel bar (rota-rod) tests. In the bioassay toxicity in the presence of *A. salina*, the essential oil of *L. origanoides* presented CL_{50} values determined in $52,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, being considered highly toxic. In the evaluation of acute toxicity, the DL_{50} , obtained by semi-logarithmic interpolation, was determined in $1.673,84 \text{ mg kg}^{-1}$, indicating low toxicity. Regarding neurobehavioural assessment in mice, the essential oil of *L. origanoides* showed no toxicity, determined after evaluation of behavioral and motor changes. Thus, from the results obtained in this study, we suggest that the essential oil of *L. origanoides* has low toxicity and does not cause neurobehavioral toxicological effects in the evaluated doses.

keywords: medicinal plants, *Lippia origanoides*, toxicity, animal behavior , *A. salina*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	14
2.1. Plantas Medicinais	14
2.2. Família Verbenaceae.....	16
2.2.1 Gênero <i>Lippia</i>	16
2.2.2 <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	18
2.3 Metabolismo Secundário	20
2.4. Óleos essenciais	20
2.4.1 Métodos de Extração.....	22
2.5. Toxicidade dos óleos essenciais	23
2.5.1 Métodos úteis na avaliação da toxicidade de produtos naturais.....	24
2.5.2 Bioensaio da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	25
2.5.3 Neurotoxicidade e testes comportamentais.....	26
3. OBJETIVO GERAL.....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Procedência do material botânico	28
4.2. Extração do óleo essencial	29
4.3. Ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	29
4.4 Desenho Experimental	30
4.4.1 Determinação da DL ₅₀	30
4.4.2 Avaliação dos efeitos toxicológicos neurocomportamentais do óleo de <i>L. origanoides</i>	31
4.5 Testes Comportamentais.....	31
4.5.1 Labirinto aquático de Morris.....	31
4.5.2 Labirinto em Y	32
4.5.3 Caixa claro/escuro	33
4.5.4 Barra giratória (Rota rod).....	34
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6. RESULTADOS	35
6.1 Determinação da CL ₅₀ em <i>A. salina</i> e DL ₅₀ em camundongos.....	35
6.2 Testes Comportamentais.....	36
7. DISCUSSÕES	38

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Lippia origanoides</i> Kunth (a). Detalhe da inflorescência (b).	19
Figura 2. Teste do Labirinto aquático.	32
Figura 3. Teste do labirinto em Y.	33
Figura 4. Teste da caixa claro-escuro.	34
Figura 5. Barra giratória (Rota-rod).	35
Figura 7. Peso dos animais tratados com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> durante 21 dias.	36
Figura 8. Efeito da administração oral do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> sobre o tempo para encontrar a plataforma submersa no teste do Labirinto Aquático de Morris.	36
Figura 9. Efeito da administração oral do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> sobre a porcentagem de sequências corretas no teste do labirinto em Y.	37
Figura 10. Efeito da administração por via oral do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> sobre o tempo de latência para entrada no ambiente escuro no teste da caixa claro-escuro.	37
Figura 11. Efeito da administração por via oral do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> sobre o tempo de permanência na barra giratória.	38

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

APG III: Angiosperm Phylogeny Group- III

CL₅₀: Concentração Letal

CG/DIC: Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

CG/EM: Cromatografia gasosa com detector de massas

DL₅₀: Dose letal

DMSO: Dimetilsulfóxido

GESEF: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia

GPS: Global Position System

MEP: Metileritritol fosfato

MT/MCA: Medicina Tradicional/Medicina Complementar e Alternativa

OEs: Óleos essenciais

OMS: Organização Mundial de Saúde

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNC – Sistema Nervoso Central

SUS: Sistema Único de Saúde

P.V = parte por volume

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde a mais remota antiguidade há registros do uso empírico de plantas medicinais nas práticas utilizadas pelo homem no tratamento de doenças. Acertos e erros desta época formaram uma base de conhecimentos tradicionais que a ciência busca certificar para validar o uso terapêutico. Ainda hoje, em comunidades distantes de centros urbanos, pessoas usam plantas da flora nativa para debelar enfermidades. E nas farmácias de cidades muitos medicamentos processados e embalados para comércio tem como base produto de origem vegetal.

Entre outros fatores, a preferência na utilização decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Nas últimas décadas, o interesse da indústria e do mercado consumidor por produtos naturais como plantas medicinais e respectivos produtos tem aumentado significativamente, impulsionando estudos que buscam compostos isentos de aditivos sintéticos, biologicamente ativos, que tenha eficiência terapêutica e complementem os fármacos atuais, substituindo ou auxiliando os medicamentos convencionais (Bakkali 2008).

No Brasil, o comércio de plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena em rituais de cura. Atualmente são comercializadas em feiras livres, mercados públicos e lojas de produtos naturais, onde podemos encontrá-las em sua forma natural, pulverizadas ou como unguentos, entre outras. Dentre algumas alternativas, as plantas medicinais, como produto alternativo, são utilizadas tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos, por serem fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos, revelando nestes produtos, enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-química e biológica (Andrade *et al.* 2001).

Entre os compostos de origem vegetal, destacam-se os óleos essenciais-(OEs), misturas complexas de substâncias orgânicas lipofílicas, de baixo peso molecular, odoríferas e líquidas, altamente voláteis, que resultam do metabolismo secundário das plantas. Difere-se quimicamente dos verdadeiros óleos e gorduras pela estrutura de cadeia longa de composição glicerídica, viscosidade e solubilidade parcial em água, solúveis em álcool e solventes orgânicos, além de apresentar aroma agradável e intenso, sendo por isso, chamados também de essências (Simões & Spitzer 2007).

Na farmacologia, os óleos essenciais apresentam propriedades vantajosas e importantes se comparados a outros tipos de medicamentos, a exemplo, a sua volatilidade, característica que os tornam ideal em banhos de imersão, nebulizações ou simplesmente em

inalações, devido a baixo peso molecular de seus componentes, o que possibilita através das vias metabólicas, a eliminação rápida desses compostos no organismo (Bandoni & Czepak 2008).

Dentre as várias espécies de plantas utilizadas para fins medicinais, encontra-se a família botânica Verbenaceae, caracterizada pelo potencial aromático e por apresentar gêneros ricos em óleos essenciais. Segundo Souza & Lorenzi (2008), no Brasil a família Verbenaceae está representada por aproximadamente 16 gêneros e 300 espécies, onde algumas destas são fortemente exploradas no setor econômico para fins ornamentais e terapêuticos, onde busca-se investigar os componentes bioativos dos OEs. Os gêneros mais representativos da família Verbenaceae, são: *Stachytarpheta*, *Lantana*, *Verbena* e *Lippia* (Di Stasi *et al.* 2002).

O gênero *Lippia* compreende aproximadamente 200 espécies de ervas, árvores de pequenos porte e arbustos encontrados na América do Sul e Central e África Tropical. De todos os gêneros da família Verbenaceae, é certamente o mais estudado quimicamente, devido à importância econômica decorrente das diferentes aplicações dos óleos essenciais, sendo muitas espécies consideradas medicinais devido as suas conhecidas atividades como: analgésica, antiinflamatória antimicrobiana, antitérmica, sedativa, larvicida, antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, antiviral, moluscicida, antimalárica, anticonvulsivantes, anti-espasmódica e atividades estimulantes (Salimena 2000). No Brasil, o gênero *Lippia* é representado por 120 espécies com ocorrência especialmente nos campos rupestres e cerrados e que morfológicamente apresentam semelhanças nos estágios de floração, apresentando fragrância geralmente forte e agradável (Oliveira *et al.* 2006a).

A espécie *Lippia origanoides*, conhecida popularmente como “salva do Marajó”, “alecrim-do-campo” e “orégano de monte”, morfológicamente é caracterizada como um arbusto ou uma árvore pequena, ereta e ramificada, que cresce até 3m de altura. É uma espécie oriunda da América Central e norte da América do Sul. *L. origanoides* é usada na culinária como tempero e, na medicina tradicional, é empregada empiricamente no tratamento de doenças gastrointestinais e doenças respiratórias (resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma) (Vicunã *et al.* 2010).

Estudos constata a eficiência de compostos bioativos do óleo essencial de *L. origanoides* em relação à atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias e fungos patogênicos, (Oliveira *et al.* 2007; Sarrazin *et al.* 2015) efeito acaricida dos extratos etanólicos de *L. origanoides* contra ácaros *Tetranychus cinnabarinus* (Sivira *et al.* 2011), ação repelente contra mosquitos *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais* (Caballero-Gallardo *et al.* 2012). Além de, apresentar efeito antiviral sobre o vírus da dengue e febre amarela

(Menezes *et al.* 2009), efeito inibitório frente à *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* (Escobar *et al.* 2010), efeito inibitório sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Bueno-Sánchez *et al.* 2009), forte atividade antioxidante (Acevedo *et al.* 2007) e atividade antigenotóxica contra danos ao DNA (Vicuña *et al.* 2010). Carvalho *et al.* (2013), através de modelo experimental *in vitro*, avaliaram o efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato etanólico das folhas da *L. origanoides* em artéria mesentérica de ratos e concluíram que o extrato apresenta efeito vasorrelaxante dependente do endotélio vascular.

As observações populares sobre o uso de plantas medicinais são relevantes para a ciência, uma vez que contribuem para a divulgação da eficiência terapêutica dos vegetais, indicado com frequência devido aos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Assim, os usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (Maciel *et al.* 2002).

Por outro lado, a utilização inadequada das plantas da flora nativa sem nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, podem levar a sérios problemas de saúde, como efeitos tóxicos, reações alérgicas ou mesmo o aparecimento de algumas doenças. Mesmo que o uso para fins terapêuticos seja bastante difundido, ainda se desconhece o potencial toxicológico de muito desses compostos, muitas vezes negligenciado pela medicina popular em virtude da falsa ideia de que esses produtos possam ser inócuos (Toledo *et al.* 2003).

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas-SINITOX, no período de 2004 e 2008, apontaram ocorrência de 8.501 casos de intoxicação por ingestão de partes de plantas no Brasil. Destas intoxicações, 12,4% estavam relacionadas a circunstâncias intencionais em que a vítima buscava propriedades farmacológicas da planta. No Rio de Janeiro, no mesmo período, foram registradas 415 intoxicações, em que 12% relacionados às mesmas circunstâncias intencionais (Sinitox 2010).

Aliado a isso, em virtude do aumento do número de doenças neurodegenerativas, muito conhecimento foi produzido em pesquisas sobre a toxicidade de plantas medicinais, especialmente relativo a dosagens, particularmente a neurotoxicidade. A neurotoxicidade é induzida por cetonas, as quais provocam episódios epileptiformes e tetaniformes e ainda distúrbios psíquicos alterando na estrutura e/ou no funcionamento do sistema nervoso central ou periférico. Assim, o potencial neurotóxico de algum constituinte ativo das plantas pode ser determinado a partir de modificações qualitativas ou quantitativas das células do sistema nervoso e de componentes endógenos após a exposição como, por exemplo, a redução de

sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes ou a promoção da síntese de radicais livres, indução de apoptose neuronal (Slikker Jr & Bowyer 2005). A avaliação neurotóxica de uma substância também pode ser determinada através de experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes sensoriais, de função motora, neurocomportamentais e cognitivos, uma vez que as modificações de comportamento animal podem estar relacionadas com lesões neurológicas ou alterações patológicas e bioquímicas (Araújo 2013).

Os trabalhos citados na literatura, com plantas do gênero *Lippia*, na área de química, abordam a similaridade de composição química consistente em alguns compostos, principalmente os monoterpenos oxigenados: carvacrol e timol. Porém, informações sobre efeitos colaterais, reações adversas ou limites de doses que representam um risco para a saúde humana, oriundos de compostos presentes em *Lippia origanoides*, ainda são bastante escassos (Stashenko *et al.* 2010).

Nesse contexto, considerando o potencial biológico desta espécie vegetal, bem como a incipiência de estudos que avaliem os princípios ativos e investiguem atividades farmacológicas e toxicológicas, o presente estudo buscou avaliar a toxicidade oral aguda, bem como os efeitos toxicológicos neurocomportamentais após exposição subaguda do óleo essencial de *Lippia origanoides* em ensaios laboratoriais no intuito de dimensionar a toxicidade deste óleo essencial, uma vez que a avaliação da ação tóxica de plantas medicinais é indispensável para considerar um tratamento seguro.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. Plantas Medicinais

Plantas medicinais são todas as espécies vegetais que possuem em sua composição substâncias sintetizadas de forma natural a partir de sua matéria prima básica (água e nutrientes), podendo atuar em um organismo animal, apresentando atividades biológicas capazes de produzir um ou mais princípios ativos úteis à saúde, promovendo cura ou atenuando os sintomas de uma enfermidade.

Segundo relatos, os povos pré-históricos tiveram os primeiros conhecimentos sobre as plantas medicinais, todavia, os primeiros a catalogar foram os chineses, egípcios, indús e gregos, que as classificavam segundo a cor, forma, sabor e aroma e, posteriormente, foram desenvolvendo sistemas de terapêuticas que faziam uma relação e interação que combinavam

elementos empíricos, racionais, religiosos e mágicos. Assim, as plantas ao longo das gerações foram manipuladas e utilizadas para as mais diversas finalidades terapêuticas, gerando um vasto conhecimento tradicional (Lima 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88% da população de países em desenvolvimento, como por exemplo, o Brasil, faz uso de medicina à base de extratos de plantas, visto que, em relação a drogas sintéticas, drogas de origem vegetal são mais toleradas pelo organismo, são mais acessíveis do ponto de vista econômico e conseqüentemente favorecem um número maior de pacientes (OMS 2002; Sarrazin *et al.* 2012).

Nesse sentido, em sua estratégia global sobre medicina tradicional e medicina complementar para os períodos de 2002-2005, a OMS reforçou compromissos e estabeleceu metas, como: desenvolver políticas nacionais de avaliação e regulação da prática da Medicina Tradicional/Medicina Complementar e Alternativa-MT/MCA, com o objetivo de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros; criação de uma base de evidências mais forte para a qualidade, eficácia e segurança dos produtos e práticas da MT/MCA; certificar-se sobre a disponibilidade e acessibilidade da MT/MCA, incluindo ervas medicinais essenciais; promover o uso terapêutico sólido da MT/MCA, por provedores e consumidores; e por fim, documentar a medicina tradicional e seus remédios (OMS 2002).

No Brasil, o número de espécies vegetais utilizadas sob a forma de extratos brutos no tratamento de doenças é bastante significativo, aproximadamente 91,9% da população faz uso de alguma planta medicinal, sendo que 41,6% realiza o cultivo das espécies na própria residência. Para isto, um conjunto de resoluções e portarias delinea os instrumentos necessários à implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a exemplo, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde-SUS (Brasil, 2009) e o Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA nº10, que apresenta dados de nomenclatura, posologia, parte utilizada, modo de usar, vias, indicações e contra-indicações de uso e efeitos adversos, para 66 espécies de plantas medicinais utilizadas na preparação de drogas vegetais pela empresa fabricante (Ethur *et al.* 2011).

O uso terapêutico de plantas medicinais envolve várias etapas que vão desde o cultivo até a administração. Neste sentido, a Etnofarmacologia, através de observações nas áreas multidisciplinares, como: química, bioquímica, botânica, farmacologia e antropologia, enriquecem os conhecimentos sobre a vasta flora do planeta resgatando informações valiosas

para a descoberta de substâncias biologicamente ativas e fornecendo pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos (Fabricant & Farnsworth 2001).

Nesse contexto, destaca-se a família botânica Verbenaceae, pertencente à ordem Lamiales produtoras de OEs, cujas propriedades biológicas vêm sendo comprovadas cientificamente para diferentes fins terapêuticos e usadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, tosse e bronquites (Judd 2009).

2.2. Família Verbenaceae

A família Verbenaceae foi criada com o que se conhecia por Verbenoideae, subfamília de Lamiaceae, e foi caracterizada pela abundância de tricomas glandulares em órgãos vegetativos e reprodutivos, sendo tais glândulas os principais sítios de síntese e acúmulo dos metabólitos que conferem características medicinal e/ou aromática a essas plantas. Segundo Angiosperm Phylogeny Group-APG III, esta família, compreende 36 gêneros e cerca de 1000 espécies e estão distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do planeta, incluindo ervas, arbustos e menos frequentemente árvores ou lianas. No Brasil, a família Verbenaceae encontra-se representada por 16 gêneros e cerca de 300 espécies, sendo os gêneros *Lippia* L. e *Stachytarpheta* Vahl. muito comuns nos cerrados e campos rupestres (Souza & Lorenzi 2008; Judd *et al.* 2009).

Algumas espécies de Verbenaceae possuem um elevado potencial ornamental, onde são cultivadas e aproveitadas no paisagismo e na decoração natural de muitos ambientes, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Lantana*, *Duranta* e *Verbena*. Ainda, diversas plantas dessa família possuem propriedades aromáticas, muito utilizadas na elaboração de produtos de higiene pessoal, como as dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia*. Em adição, muitas espécies possuem grande importância medicinal, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Stachytarpheta*, *Verbena* e *Lippia*, sendo amplamente utilizadas pela indústria de fármacos e na medicina popular na busca dos componentes bioativos de seus OEs (Pascual *et al.* 2001; Souza & Lorenzi 2008; Judd *et al.* 2009).

2.2.1 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* apresenta ampla distribuição geográfica, compreendendo cerca de 240 espécies, entre ervas, arbustos e árvores de pequeno porte, sendo considerado o maior gênero dentre a família Verbenaceae, (Pascual *et al.* 2001; Aguiar & Costa 2005). Os maiores

centros de dispersão estão localizados na América Central, América do Sul e em territórios da África tropical. No entanto, os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* estão localizados no México e Brasil, onde neste último, o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Gomes, Nogueira & Moraes 2011).

Morfologicamente o gênero *Lippia* é caracterizado por inflorescências em forma de capítulos, normalmente axilares, com flores de cálice bilobado e fruto seco separado em duas unidades (O'Leary *et al.* 2012). As propriedades medicinais e aromáticas das espécies de *Lippia* são atribuídas a seus compostos secundários que são produzidos por tricomas glandulares presentes em seus órgãos vegetativos e reprodutivos (Pascual *et al.* 2001).

Na medicina popular, folhas de algumas espécies deste gênero são utilizadas como infusão contra estados de excitação, hipertensão, náuseas, e como xarope contra tosse e bronquite (Di Stasi *et al.* 2002). Além do proeminente uso medicinal, espécies de *Lippia* são utilizadas como tempero para as preparações alimentícias ou usadas tradicionalmente contra doenças gastrointestinais e respiratórias (Pascual *et al.* 2001).

Várias pesquisas têm sido realizadas no intuito de validar o potencial medicinal dessas espécies. Tais estudos demonstram que os óleos essenciais produzidos por espécies deste gênero apresentam propriedades antibacteriana, analgésica, antiviral, antioxidante, acaricida, anti-inflamatória e alopática, (Stashenko *et al.* 2010).

Entre as espécies de *Lippia* com potencial econômico e medicinal reconhecido, *Lippia alba* é bastante estudada sob os pontos de vista químico, etnofarmacológico e estrutural (Pascual *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2006). Esta espécie é popularmente conhecida como erva-cidreira brasileira ou melissa, sendo utilizada em forma de chás, macerados e banhos para inúmeras finalidades, além de apresentar atividade antifúngica, bactericida e analgésica comprovada (Pascual *et al.* 2001).

Alguns estudos apontam que a composição química do óleo essencial de espécies do gênero *Lippia* é bastante variável, podendo ser monoterpeneo dominante (Sarrazin *et al.* 2012) ou sesquiterpeneo dominante (Silva *et al.* 2010). Segundo pesquisas, variações na composição química de óleos essenciais podem ocorrer dentro da mesma espécie, de acordo com fatores que vão desde as especificidades do local onde a planta se encontra, método utilizado para a obtenção do produto ou fatores ambientais no momento da coleta (Zoghbi *et al.* 2002).

Devido ao alto potencial aromático, a composição química do óleo essencial de inúmeras espécies pertencentes ao gênero *Lippia* foram investigadas por meio de cromatografia gasosa com detector de massas (CG/EM) e com detector por ionização de

chama (CG/DIC). Os estudos apontaram que os compostos mais frequentes presentes no OE do gênero *Lippia* são: limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, linalol, α -pineno e timol. Em razão da variabilidade na composição dos OEs, algumas espécies foram separadas em quimiotipos. A exemplo da espécie *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, com os quimiotipos citral e carvona, além de outros (Gomes, Nogueira & Moraes 2011).

Extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia* spp. têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos, porém, do ponto de vista farmacológico, ainda se conhece pouco acerca da constituição química desta espécie (Pascual *et al.* 2001). Dentre estas, destaca-se a espécie *Lippia origanoides* Kunth, que apesar de bastante utilizada na medicina popular, tem seu potencial biológico pouco explorado, podendo ser uma espécie que viabilize materiais promissores para o isolamento de novas substâncias químicas com diferentes potenciais, principalmente farmacológicos.

2.2.2 *Lippia origanoides* Kunth.

Lippia origanoides (Figura 1) é um arbusto aromático, ereto e ramificado, que cresce até 3 metros de altura, nativa do Cerrado brasileiro, encontrada geralmente em ambientes secos, onde os solos são rasos, pedregosos e pobres em matéria orgânica e possui denominações populares como, “salva do Marajó”, “alecrim-do-campo” e “orégano de monte”. Morfologicamente a espécie é caracterizada pela presença de folhas pecioladas, ovaladas e flores zigomorfas brancas, pequenas e pediculadas (em média 4 mm de tamanho) reunidas em inflorescência espiciformes axilares com brácteas verdes persistentes, além de apresentar um elevado rendimento de frutos secos tipo pireno e sementes por planta (Suarez *et al.* 2008).

A espécie é utilizada como tempero na preparação de alimentos e, na medicina popular, folhas e flores são utilizadas no tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, bem como para alívio de cólicas uterinas, infecções vaginais, distúrbios menstruais, febre, ou como antisséptico geral para infecções de boca, garganta e limpeza de feridas (Pascual *et al.* 2001).

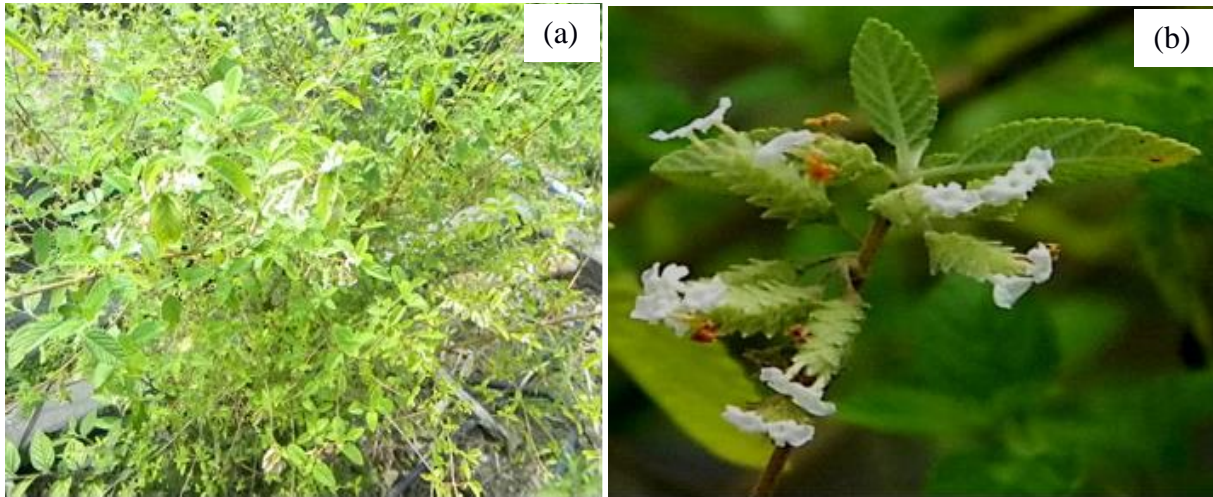


Figura 1- *Lippia origanoides* Kunth (a). Detalhe da inflorescência (b). Foto: Sandra Sarrazin

A primeira abordagem sobre *L. origanoides* foi realizada por Morais *et al.* (1972), onde relata-se que a semelhança olfativa com o “orégano” foi tão sugestiva que inspirou este nome aos botânicos Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K). Os doutores Samuel Ribeiro dos Santos e Alacides d’Andrea Pinto, na oportunidade de uma viagem feita a Amazônia, obtiveram a erva no Mercado do Ver-o-Peso, Belém (Pará), onde é conhecida e usada na culinária local com o nome de “alecrim d’Angola”. Após o cultivo, e florescimento da erva adquirida em canteiros do Instituto Agrônomo de Campinas, foi possível classificá-la como “*Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae).

Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados para esta espécie, focando a composição química e as atividades antimicrobiana (Oliveira *et al.* 2007; Sarrazin *et al.* 2015), acaricida, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (Veras *et al.* 2013, Sarrazin *et al.* 2015) do óleo essencial extraído de suas folhas.

De acordo com Stashenko *et al.* (2010), em grande parte desses trabalhos, diferentes quimiotipos são relatados, contudo, normalmente os compostos majoritários são p-cimeno, timol e carvacrol, representando a importante variação fitoquímica de *L. origanoides*.

2.3 Metabolismo Secundário

Diferente de vida animal, plantas são fixas em seu habitat e em sua defesa desenvolveram mecanismos próprios exclusivos tais como: espinhos e tricomas urticantes, substâncias repelentes e quimiotóxicas inibidoras aos predadores, resistência mecânica e química a oscilações climáticas etc. Entre estas as substâncias resultantes do metabolismo secundário estão os óleos essenciais com propriedades aromáticas presentes em algumas plantas como nas espécies de *Lippia*.

Por muitos anos, acreditou-se que os metabólitos secundários eram produzidos sem uma função específica, caracterizadas como o resultado de algum erro metabólico, super-expressão proteica, ou produtos de excreção, servindo como uma forma de desintoxicação das plantas. No entanto, a partir da década de 1950, com o avanço do conhecimento e descoberta de novos metabólitos, ficou evidente o papel essencial dessas substâncias na planta (Taiz & Zeiger 2009).

Os produtos secundários têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, pois contribuem para que as espécies vegetais tenham uma boa interação com os diferentes ecossistemas, dessa forma aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie. Essas moléculas também apresentam diversas atividades biológicas, como, antibióticos antifúngicos e antivirais protegendo a planta dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas. Assim, esses metabólitos, podem ser definidos como substância de baixo peso molecular, geralmente produzidas em pequenas quantidades, apresentando estrutura química variada e composição bastante complexa (Li *et al.* 2012).

Os metabólitos secundários como óleos essenciais não participam dos processos de formação do protoplasto e geração de energia, não apresentam ocorrência universal, exibem ampla diversidade estrutural e muitos são mediadores em processo de interação das plantas com o ambiente responsáveis por funções nem sempre bem definidas, mas nem por isso menos importante (Taiz & Zeiger 2009).

2.4. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas. Quimicamente são caracterizados como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas.

Comumente apresentam cor e aspecto semelhante, porém, por apresentam na sua constituição substâncias instáveis, isso pode aumentar a probabilidade de sofrerem modificações nas características físico-químicas, odores e composição química. Podem ser sintetizados em diferentes órgãos vegetais, tais como frutos, flores, cascas e raízes, e armazenados em estruturas especializadas como tricomas glandulares, bolsas e canais secretores. Dentro de um mesmo espécime, a composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com o lugar ou parte da planta o órgão onde é produzido. Existem outros fatores como, condições climáticas e do solo, época da coleta, estágio de desenvolvimento da planta, que podem também provocar variações na sua composição (Simões & Spitzer 2003).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção de plantas, atuando como agentes antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo-lhes o apetite por tal planta. Podem também atuar na atração de insetos e outros agentes fecundantes que favorecem a dispersão de pólen e sementes, ou mesmo para repelir outros insetos indesejáveis. Além disso, atuam como inibidores de germinação (alopatia), e no controle da perda de água e regulação da temperatura (Huet 1991).

Devido às várias aplicações dos OEs, diferentes estudos são voltados à procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes. Outro aspecto importante é que, por serem naturais e biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos, além de poderem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármacos sintéticos, tornando-se substâncias-chaves para a pesquisa de novos medicamentos (Figueiredo *et al.* 2008).

Nas diferentes áreas da indústria, os óleos essenciais são utilizados como flavorizantes, fornecendo aromas especiais a produtos como perfumes, sabonetes, condimentos, cosméticos e doces ou ainda serem utilizados farmacologicamente para fins medicinais. As principais atividades terapêuticas estudadas são: atividade antimicrobiana, nomeadamente antibacteriana, antifúngica e antiviral, uma vez que os óleos essenciais apresentam o potencial de inibição no crescimento de bactérias, fungos e até de vírus (Cunha *et al.* 2012). Apresentam também potencial anti-inflamatório, estando intimamente ligado à atividade antioxidante, pois caracterizam-se também pela inibição da liberação de mediadores químicos da inflamação, como por exemplo, citoquinas, prostaglandinas, leucotrienos, etc (Lima *et al.* 2013). O potencial ansiolítico e antidepressivo está relacionado com seus efeitos calmantes e relaxantes em aromaterapia, diminuindo estados de ansiedade. Outros podem ainda apresentar potencial antinociceptivo e anticarcinogênico, sendo este último atribuído aos seus diferentes compostos, tais como, carvacrol, limoneno, mentol, etc

(Cunha & Roque 2013).

Apesar da grande quantidade dos componentes dos óleos essenciais, todos derivam do metabolismo secundário das plantas, a partir da glicose, e divididos unicamente em dois grupos de origem biossintética distinta, o grupo dos terpenóides sintetizados no citoplasma pela rota do ácido mevalônico ou pela via plastídica do metileritritol fosfato (MEP), e fenilpropanoides derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico. Além disso, são acrescentados de moléculas menores, com funções orgânicas distintas, a exemplo: fenóis, éteres, ésteres, álcoois simples e terpênicos, cetonas, aldeídos, furanos, ácidos orgânicos, óxidos e peróxidos, e esporadicamente compostos como enxofre ou nitrogênio. (Bakkali *et al.* 2008).

2.4.1 Métodos de Extração

A extração de OEs pode ser realizada através de vários métodos, porém a técnica a ser utilizada varia conforme a localização do óleo volátil na planta e a proposta de utilização. Os processos de extração estão cada vez mais aperfeiçoados e permitem a obtenção de OEs com pureza e composição desejada (Simões *et al.* 2007). Dentre os principais métodos de extração têm-se: arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio do pericarpo de frutos cítricos, extração por fluidos supercríticos, extração por solventes, e a *enfleurage*, utilizada geralmente para extrair essências de flores, usada principalmente pela indústria de perfumes (Bakkali *et al.* 2008).

A extração por arraste /a vapor é o processo mais simples, mais seguro e mais antigo utilizado. O método é uma destilação de dois líquidos imiscíveis, e consiste basicamente em vaporizar cada um dos componentes em temperaturas inferiores à de ebulição, por efeito de uma corrente direta de vapor, que posteriormente são conduzidos a um condensador onde voltam ao estado líquido, sendo recolhidas em um separador. Dentre as vantagens da extração de óleos essenciais por arraste a vapor, encontram-se o baixo custo do vapor de água, o material não sofre reaquecimento e não se precisa de equipamentos sofisticados (Bandoni & Czepak 2008).

O processo de extração por hidrodestilação é o método de referência utilizado para posterior análise dos óleos essenciais. Nesta técnica são utilizados aparelhos tipo Clevenger, acoplados a balões de vidro, onde é inserida a amostra vegetal para extração do OE, que posteriormente é imersa em água destilada. Após a fervura da água contida no balão, o vapor contendo os compostos voláteis é arrastado até o condensador onde o óleo essencial e o vapor condensam e se separam por densidade. A desvantagem deste método é que, devido ao

aquecimento prolongado, os componentes presentes na mistura são sujeitos à degradação por hidrólise ou polimerização, solubilidade parcial das substâncias oxigenadas, implicando diretamente na qualidade do óleo essencial e conseqüentemente em seu potencial biológico (Bandoni 2003). A extração prensagem a frio é o método usado para obter óleo essencial de frutos cítricos como por exemplo, a bergamota, o limão, a grapefruit e a laranja. O método consiste em colocar os frutos inteiros diretamente em uma prensa e deles é extraído tanto o óleo essencial quanto o suco. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões *et al.* 2003).

O método de extração com fluidos supercríticos utiliza as propriedades desses compostos para facilitar a extração de substâncias orgânicas de amostras sólidas. Caracterizados pela alta densidade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial, conseguem penetrar e se difundir melhor na matriz da amostra, resultando em melhores rendimentos nas extrações, além de conservar as características organolépticas naturais dos OEs, e evitar a degradação térmica (Mitra 2003).

A extração por *enfleurage* é um método que consiste na deposição das pétalas à temperatura ambiente sobre uma camada de gordura durante certo período de tempo, posteriormente, as pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Na extração por solventes as plantas são imersas em solvente químico adequado como: a acetona, hexano ou outros derivados de petróleo, e a separação realiza-se quimicamente, pela destilação em temperaturas específicas, que causam somente a condensação do óleo e não dos solventes (Bandoni 2003).

2.5. Toxicidade dos óleos essenciais

Toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo (Oga 2008). A toxicidade de plantas medicinais constitui hoje um problema sério de saúde pública devido ao seu disseminado uso terapêutico. Com o advento do conceito de “natural”, as plantas medicinais passaram a ser sinônimo de produtos seguros, saudáveis e benéficos, isentos de substâncias químicas, impossível de desencadear reações tóxicas ou adversas (Madalosso 2011).

Por outro lado, na literatura científica são encontrados relatos de sobre efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas, incluindo óleos essenciais ou seus componentes químicos isolados. Pode-se citar como exemplo o efeito hepatotóxico ocasionado por apiol,

safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos; ação tóxica renal, decorrentes de espécies vegetais que contém terpenos e saponinas; alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas, sesquiterpênicas e furanocumarinas. Além disso, diversas substâncias isoladas de plantas consideradas medicinais possuem atividade citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (Veiga Júnior *et al.* 2005).

Nesse sentido, uso de plantas com finalidade terapêutica, bem como de seus subprodutos, tais como óleos essenciais, exige a avaliação de parâmetros como a atividade biológica e principalmente a sua toxicidade (Calixto 2005). Segundo a legislação brasileira para registro de medicamentos fitoterápicos, os testes de toxicidade pré-clínica exigidos são estipulados pelo “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Dentre outros, neste documento, constam os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração), que devem ser realizados quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos (Brasil 2010). Além disso, em 2013 foi publicado o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF da ANVISA. Assim, para que os recursos oriundos da medicina popular possam ser adequadamente incorporados à medicina científica, torna-se imprescindível a avaliação de eficácia e segurança destes produtos.

2.5.1 Métodos úteis na avaliação da toxicidade de produtos naturais

Para as várias técnicas existentes no monitoramento da bioatividade de extratos vegetais, óleos essenciais ou seus compostos isolados, existem uma série de bioensaios que podem ser realizados, utilizando como modelo experimental: microrganismos, animais de laboratório ou seres humanos. Esses ensaios visam classificar a toxicidade de uma ou mais substâncias químicas. O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos é de agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador. Dentre estes, encontra-se o bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas, comumente utilizado como alimentos para peixes. O bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* é em geral simples, rápido, sensível e barato, e requer pequena quantidade de amostra, o que favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos. O bioensaio permite estimar a avaliação da toxicidade de extratos ou óleos essenciais, através da determinação da

concentração letal (CL₅₀-Concentração Letal que causa mortalidade de 50% dos indivíduos) da fração ou componentes ativos frente a um organismo marinho (Barosa *et al.* 2003).

Outra forma de avaliar a toxicidade de plantas medicinais, ou seus óleos essenciais, é através da administração oral da amostra em estudo, utilizando animais de laboratório como modelos experimentais. Desta maneira é possível avaliar a toxicidade aguda, subaguda e subcrônica de doses pré-determinadas. A toxicidade oral aguda é utilizada para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses, durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração, provocando geralmente uma elevada mortalidade. A avaliação da toxicidade aguda também tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que determina estatisticamente a DL₅₀ (dose letal mediana), (dose que mata 50% da população em estudo), a partir de estudos com grupos de animais expostos a doses crescentes da substância em estudo (OECD 2001). A toxicidade subaguda analisa a exposição repetida a uma determinada substância química em um organismo, por um período de um mês ou menos, o que dependendo do seu grau de exposição, pode levar a toxicidade sistêmica do organismo (Klaassen & Watkins 2012), podendo ser identificada através da diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, e/ou através de sinais comportamentais como prostração, apatia e a presença de pelos eriçados. A toxicidade subcrônica tem como objetivo analisar e caracterizar todos os efeitos provocados por uma determinada substância quando administrada diariamente a animais experimentais, em doses previamente estabelecidas por períodos prolongados, geralmente a exposições que variam de 1 à 3 meses em roedores, e um ano para animais de grande porte (Valadares 2006).

Trabalhos relacionando a efeitos tóxicos ao uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos vêm crescendo gradativamente, especificamente aqueles voltados para avaliação da neurotoxicidade, cujos efeitos adversos recaem sobre o sistema neural que, quando exposto a xenobióticos neurotóxicos, desencadeiam alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas.

2.5.2 Bioensaio da toxicidade frente à *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça), possui quatro estágios de desenvolvimento: ovo, náuplio, metanáuplio e adulto, habitando lagos de água salgada e salinas de todo o mundo. Apresentam alguns mecanismos de adaptação tais como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios que as tornam cosmopolitas, e

a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie. *A. salina* é muito utilizada como bioindicador em ensaios laboratoriais, em função da sua facilidade de manipulação e do seu baixo custo econômico.

A análise toxicológica frente à *A. salina* é um bioensaio preliminar, desenvolvido para determinar valores de concentração letal média (CL₅₀), em $\mu\text{g mL}^{-1}$, da fração ou componentes ativos frente a um organismo marinho. Para isto, o teste verifica a relação entre a taxa de sobrevivência das larvas em relação à concentração da substância (amostra) a ser misturada na água de controle (solução de água do mar sintética) (Parra et al., 2001).

Para Meyer, *et al.* (1982), há uma relação entre a toxicidade e a concentração letal mediana (CL₅₀), de extratos vegetais sobre a *A. salina*, visto que, quando são encontrados valores de CL₅₀ maiores que 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e não é observada a morte de mais de 50% de uma população, estes extratos não são considerados tóxicos. Na realização dos ensaios laboratoriais, é necessário que as larvas de *A. salina* sejam mantidas sob as condições ótimas de crescimento, com temperatura entre 25 e 35°C, salinidade aproximada de 3,2% e pH ligeiramente alcalino, em torno de 8,0, para resultados mais confiáveis.

O teste de letalidade com *A. salina* tem sido usado como um método preliminar e valioso para o estabelecimento de toxicidade geral, no entanto, alguns autores afirmam que não existe nenhuma correlação entre o bioensaio com *A. salina* e os efeitos toxicológicos em um animal inteiro, embora na literatura, trabalhos já realizados correlacionam os ensaios de toxicidade a esta espécie com outras 25 atividades biológicas, tais como, antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral, tripanossomicida, dentre outras (Pimenta et al., 2003)

2.5.3 Neurotoxicidade e testes comportamentais

De acordo com o Comitê Interinstitucional de Neurotoxicologia, a neurotoxicidade é caracterizada por efeitos adversos sobre a estrutura ou função do Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Periférico (SNP), causados por agentes biológicos, químicos ou físicos, considerado um dos eventos toxicológicos mais graves, pois os danos gerados, até mesmo a um pequeno número de neurônios, podem desencadear profundas consequências para o desempenho global do organismo (Ushakova *et al.* 1995), os quais podem ser reversíveis ou permanentes e resultar de ações diretas ou indiretas sobre o sistema nervoso (Slikker Jr & Bowyer 2005)

O sistema nervoso é considerado complexo por conter uma série de mecanismos desencadeadores de quadro de lesões de tecidos por toxicidade. O sistema límbico é umas das áreas mais afetadas no sistema nervoso por substâncias tóxicas, neste encontra-se o hipocampo, onde a região dorsal está relacionada aos processos de aprendizagem espacial e memória e a região ventral tem papel principal no comportamento relacionado à ansiedade. Outra região frequentemente afetada pela ação de substâncias tóxicas é o cerebelo, área do SNC relacionada com coordenação motora, equilíbrio, além de funções cognitivas e sensoriais (Murdoch 2010).

Alguns testes são realizados no intuito de avaliar a ação neurotóxica de um determinado composto, podendo ser tanto em testes *in vitro*, empregando culturas de células neuronais de diferentes regiões do cérebro, como por experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes sensoriais, de função motora, neurocomportamentais e cognitivos, uma vez que, as modificações de comportamento animal podem estar associadas a lesões neurológicas ou alterações patológicas e bioquímicas. Essas informações, mediante avaliação por meio da curva dose-resposta, podem ser utilizadas para relacionar o uso das substâncias testadas com o risco associado à saúde humana (Li *et al.* 2012). Para avaliação dessas funções, vários tipos de testes podem ser realizados no intuito de dimensionar alteração no padrão normal que pode ser sugestiva de alteração na atividade do SNC, como exemplo o teste do Labirinto Aquático de Morris, Labirinto em Y, Caixa claro/escuro e o teste da Barra Giratória (Rota Rod).

O teste do labirinto Aquático de Morris avalia a memória espacial e aprendizagem de ratos. Este consiste em verificar a cognição de ratos por meio de uma atividade avaliativa da memória espacial, ao se mensurar a latência para que o animal localize uma plataforma submersa em um tanque com água opaca. Este teste é considerado um dos modelos mais frequentemente usados em neurociência comportamental (Morris, 1984).

O teste do labirinto Y, proposto por Montgomery (1958), é utilizado para medir a memória de trabalho espacial (memória de curto prazo). O objetivo desse teste é verificar a memória espacial e a ansiedade de animais introduzidos em um novo ambiente, baseado na tendência inata de roedores de explorar novos ambientes.

No teste da caixa claro/escuro, o comportamento exploratório consiste no modelo experimental de esquiava inibitória, aplicado para avaliar a memória aversiva, tendo como base a aversão natural dos roedores a áreas iluminadas e no comportamento exploratório habitual espontâneo do animal. (Crawley & Goodwin 1980).

O teste da barra giratória (Rota-rod) é usado para avaliar a coordenação motora de ratos. O método utilizado nesse teste foi proposto Dunham & Miya (1957). O aparato consiste

em uma estrutura de haste com giros circulares com velocidade constante ou crescente. O parâmetro avaliado no rota-rod é o tempo em que o animal permanece sobre a barra giratória. Neste teste, quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos após exposição aguda e subaguda ao óleo essencial de *Lippia organoides*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade do óleo essencial de *Lippia organoides*, frente à *Artemia salina*.
- Avaliar toxicidade oral aguda, por determinação da DL₅₀ do óleo essencial de *Lippia organoides*, utilizando camundongos Swiss como modelos experimentais.
- Avaliar os efeitos toxicológicos neurocomportamentais da administração oral subaguda do óleo essencial de *Lippia organoides*, sobre parâmetros comportamentais tais como: memória e aprendizagem, locomoção e coordenação motora de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedência do material botânico

Ramos e folhas da planta arbustiva sublenhosa *Lippia organoides* foram coletadas em Maio de 2015, em um plantio experimental pertencente à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA (PA 457, Km 26), com referência geográfica; 02°30'870"S e 54°56'416"O e altitude de 52m acima do nível do mar. O corpo de prova (Vauher), coletado por Sandra Sarrazin, está depositado no Herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora -MG, sob o número de registro CESJ-64029. A identificação botânica foi realizada pela Dr Fátima Regina Gonçalves Salimena.

4.2. Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *Lippia origanoides* foi extraído no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – LABBEX, Campus Rondon da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Para extração dos componentes voláteis de *L. origanoides*, foram utilizadas folhas e ramos frescos triturados (100 g) imersos em água destilada na diluição 1:10 partes por volumes (p:v). A mistura foi submetida ao processo de hidrodestilação em aparelho modelo Clevenger, adaptado a um balão de vidro com fundo redondo. O tempo de extração foi fixado em 180 minutos, determinado a partir do início da fervura da água contida no balão. A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata. Posteriormente, o óleo essencial obtido foi armazenado em recipientes de vidro âmbar, em temperatura de 5° C.

4.3. Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*.

O bioensaio da toxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* frente à *A. salina* foi realizado com adaptações da metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações.

Neste bioensaio, solução de sal marinho sintético (38 g L⁻¹) foi preparada por dissolução do sal do mar em água destilada. O pH foi ajustado entre 8-9, para 500 ml de água. Em seguida, 5 g de *A. salina*, em fase de cistos, foram adicionados à solução e incubados por 48h, sob aeração constante, temperatura controlada de 23°C e iluminação artificial com lâmpada de 40 W. Este procedimento foi realizado em aquário de vidro, com capacidade máxima de 500 mL.

No preparo da solução estoque do óleo essencial de *L. origanoides* foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% como solvente. A partir desta solução, diferentes concentrações do óleo essencial foram obtidas por diluição em água salina (100, 50, 25, 10 e 3 µg mL⁻¹), até o volume final de 1 mL. O controle negativo (100 µg mL⁻¹) foi preparado utilizando apenas água salina e os reagentes utilizados na solubilização das amostras. Para cada concentração avaliada, foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*, em estágio de náuplio.

Após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do óleo essencial, foi feita a contagem dos náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando análise de regressão linear, obtendo-se os valores de CL₅₀, calculado a partir do gráfico do percentual de

organismos mortos (Equação 1) contra o logaritmo das concentrações ensaiadas, segundo fórmula a seguir:

$$\% \text{ mortalidade} = 100 - (\text{IVm} \times 100) / \text{CNm} \quad (1)$$

Onde: CNm: média do controle negativo; IVm: média de indivíduos vivos por concentração após 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 Desenho Experimental

4.4.1 Determinação da DL₅₀

Para determinação da toxicidade oral aguda (DL₅₀) foram utilizados camundongos Swiss albinos, fêmeas, com idade aproximada de 2 meses e peso entre 35 e 47g. Os animais foram divididos em seis grupos de cinco indivíduos. Cada grupo em jejum de 12 horas recebeu administração oral única do óleo essencial de *L. Origanoides*.

Grupo 1 (controle negativo, n=5), água destilada em volume aproximado de 1 mL Kg⁻¹ por animal.

Grupo 2, (grupo teste, n = 5), óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 100 mg Kg⁻¹;

Grupo 3, (grupo teste, n = 5), óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 200 mg Kg⁻¹;

Grupo 4, (grupo teste, n = 5), óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 1000 mg Kg⁻¹;

Grupo 5, (grupo teste, n =5), óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 2000 mg Kg⁻¹;

Grupo 6, (grupo teste, n =5), óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 3000 mg Kg⁻¹;

Após administração, os animais foram colocados em gaiolas e observados durante 4 horas para analisar as seguintes características: agressividade, atividade motora, letargia, falta de apetite, corrimento nasal, piloereção, micção, diarreia e convulsões. Posteriormente, os animais foram observados por um período adicional de 24, 48 e 72 horas, mantendo-os sob as mesmas condições (comida e água *adlibitum*, com temperatura controlada (24 ± 2 °C), 12 horas ciclo claro/escuro). As observações estenderam-se por um período de 14 dias, no intuito de verificar possível ocorrência de morte. A DL₅₀ foi calculada por interpolação semi-logarítmica, colocando os valores correspondentes à percentagem de mortes no eixo das ordenadas e as doses administradas, no eixo das abcissas.

4.4.2 Avaliação dos efeitos toxicológicos neurocomportamentais do óleo de *L. origanoides*

Neste estudo foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 160–250g. Os ratos em testes foram mantidos em gaiolas de polipropileno, à temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro artificial de 12/12h e livre acesso à água e ração padrão. Para avaliarmos os possíveis efeitos toxicológicos neurocomportamentais, os animais receberam, via oral, por um período de 21 dias consecutivos, diferentes doses do óleo de *Lippia origanoides*, administradas de acordo com o peso corporal. Para isso foram utilizados 30 animais, distribuídos em cinco grupos, descritos a seguir:

Grupo 1 (controle negativo, n=6) - água destilada em volume aproximado de 120 μ L por animal.

Grupo 2 (controle do solvente, n=6) - óleo mineral em volume aproximado de 120 μ L por animal;

Grupo 3 (grupo teste, n=6), - óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 30 mg Kg⁻¹;

Grupo 4, (grupo teste, n=6), - óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 60 mg Kg⁻¹;

Grupo 5, (grupo teste, n=6), - óleo essencial de *L. origanoides* na dose de 120 mg Kg⁻¹.

Após o período de administração dos tratamentos, foram realizados os seguintes testes comportamentais: Labirinto aquático (Morris 1984), Labirinto em Y (Montgomery 1958), Caixa claro/escuro e Barra giratória (Rota Rod).

4.5 Testes Comportamentais

4.5.1 Labirinto aquático de Morris

O efeito do óleo de *L. origanoides* sobre a memória espacial e aprendizagem de ratos foi avaliado por meio do labirinto aquático de Morris. Para isso, foi utilizada uma caixa d'água de 500L, que foi preenchida com água a uma altura de 40 cm, onde adicionou-se tinta não tóxica para torná-la opaca e garantir a camuflagem da plataforma de escape (Figura 2). A caixa d'água foi dividida em quatro quadrantes imaginários (norte, sul, leste e oeste). Os objetos do laboratório e o observador foram as pistas para o animal na localização da plataforma. O teste foi realizado em duas fases, sendo a primeira classificada como treino, onde os animais aprendem a localização da plataforma. Cada animal foi colocado 4 vezes no

labirinto, adotando como ponto de partida cada um dos quadrantes. Após ser colocado na água, o animal nadou livremente, a procura da plataforma, durante 120 segundos, e foi observado durante 10 s, onde verificou-se que esse havia observado o ambiente. No dia seguinte (24 h após o treino) os animais foram testados no mesmo procedimento para a retenção da resposta, sendo verificado o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma a partir dos 4 pontos de partida.

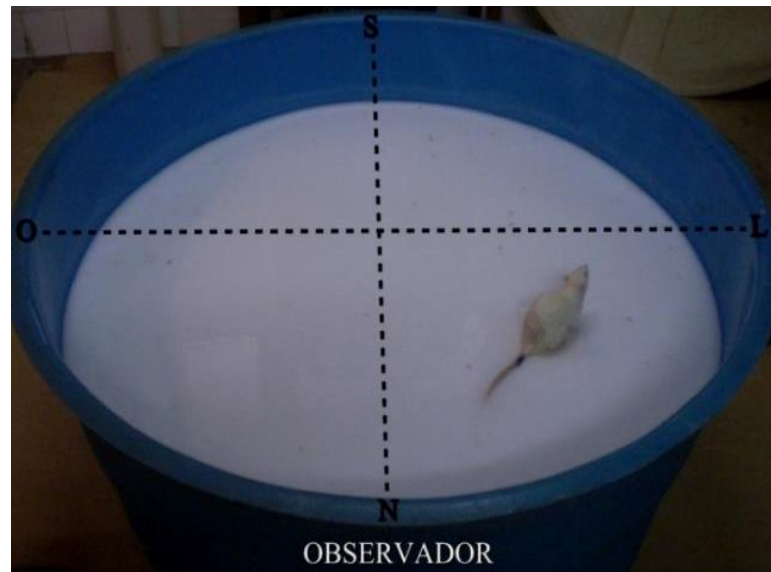


Figura 2. Teste do Labirinto aquático. Foto: Elen Aranha

4.5.2 Labirinto em Y

Estruturalmente o labirinto é feito de madeira, em formato de Y, com um braço com 34 cm de comprimento (A) e os outros dois braços iguais medindo 43 cm de comprimento (B e C), tendo todos os três braços 10 cm de largura e paredes com 34 cm de altura (Figura 3).

Os animais foram colocados individualmente na extremidade de um braço no labirinto por um período de oito minutos, e deixados para explorar o ambiente, deslocando-se livremente entre os braços. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetições, denominados A, B e C, durante o tempo estipulado. Entre um animal e outro, o labirinto foi limpo com pano úmido, a fim de remover os odores e resíduos que pudessem interferir na escolha dos animais pelos braços do labirinto.

Foram analisadas todas as informações, para determinar o número de entradas nos braços sem repetições, ou seja, o número de tríades em que todos três braços foram representados (ABC, CAB, BCA, CBA ou ACB), não sendo consideradas alternâncias as tríades como, por exemplo, CAC.

Uma alternância foi considerada correta quando o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância no grupo controle, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último. Assim, a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre o número real de alternâncias e o possível número (número total de entradas nos braços menos dois) multiplicado por 100, tal como demonstrado pela seguinte equação: % de alternância = $[(\text{número de alternâncias}) / (\text{total entradas nos braços} - 2)] \times 100$.



Figura 3. Teste do labirinto em Y. Foto: Elenn Aranha

4.5 3 Caixa claro/escuro

O aparato consiste em uma caixa com tampa em acrílico e com fundo eletrificado, tendo um compartimento claro e um escuro, e somente uma abertura pequena entre os dois ambientes (Figura 5). Este teste consiste em uma fase de treino, seguida da fase teste. Para a realização do treino, os animais foram colocados no compartimento claro, com tempo

registrado, em segundos, que eles levaram para se deslocarem para o compartimento escuro. Após a entrada do animal no compartimento escuro, foi acionado um choque elétrico de 1mA por dois segundos. A retenção da aprendizagem foi avaliada após 24 h, onde os animais foram colocados no compartimento claro e o tempo de latência para entrada no compartimento escuro foi registrado.

A transição, ou seja, a entrada em um compartimento é definida como a passagem das quatro patas do animal pela divisória e serve como medida da atividade locomotora.

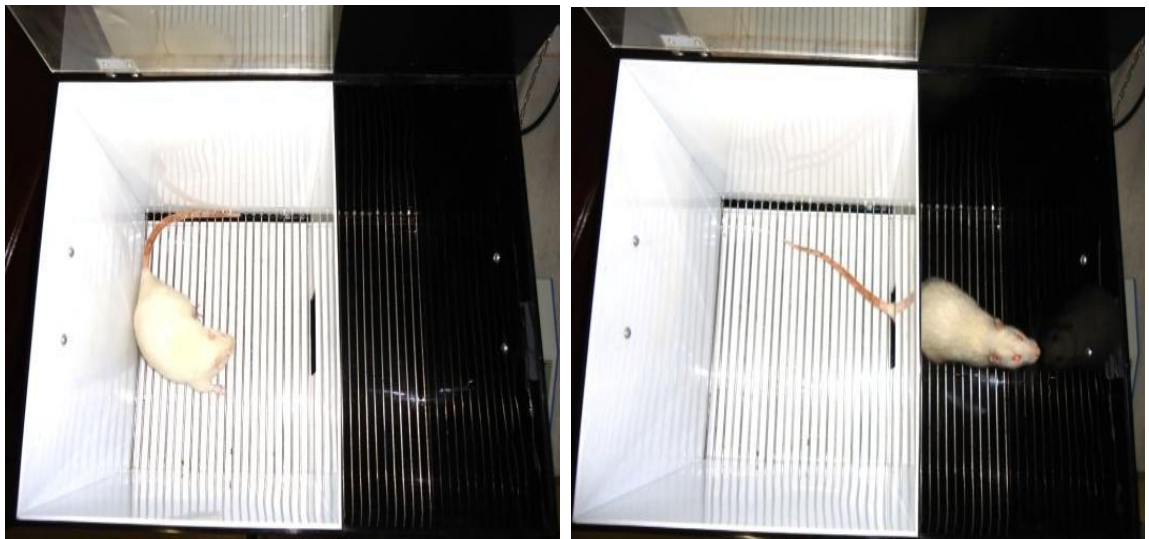


Figura 4. Teste da caixa claro-escuro. Foto: Elen Aranha

4.5.4 Barra giratória (Rota rod)

Este aparato consiste em um aparelho motorizado, constituído de uma barra giratória não escorregadia, dividida em quatro compartimentos iguais e com velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.). Neste estudo, foi utilizado o rota-rod para ratos EFF 411 Insight®, na velocidade de 7 rotações por minuto (Figura 6).

Inicialmente foi realizado um treino com os animais, para que ocorresse a habituação com o aparelho dividido em três séries de dois minutos de duração. No treino, quando os animais caíam, eram novamente conduzidos à barra quantas vezes necessárias, dentro do tempo máximo de 120 s.

No dia seguinte, mantendo-se a mesma velocidade, o teste foi realizado registrando-se o tempo de permanência do animal sobre o aparelho, por no máximo 2 minutos ou três reconduções à barra, registrando-se o tempo de permanência sobre a barra na terceira tentativa.



Figura 5. Barra giratória (Rota-rod).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média, empregando-se o teste de Análise de Variância- ANOVA *one way* e teste de Tukey *a posteriori*, considerando o valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância estatística.

6. RESULTADOS

6.1 Determinação da CL_{50} em *A. salina* e DL_{50} em camundongos

No teste de toxicidade frente à *A. salina*, o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou valor de CL_{50} determinado em $52,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em camundongos, a DL_{50} foi determinada em $1.673,84 \text{ mg kg}^{-1}$. Neste ensaio, durante as primeiras 4 h de observação, apenas os animais que receberam a dose de 3.000 mg kg^{-1} exibiram letargia e piloereção. Nas demais doses testadas, nenhuma alteração foi observada nos parâmetros fisiológicos ou comportamentais.

6.2 Testes Comportamentais

Nos testes comportamentais, a partir dos resultados obtidos, podemos sugerir que, de forma geral, o óleo essencial de *Lippia origanoides* foi tolerado pelos animais em todas as doses avaliadas, pois não foi observada mortalidade, nem outros sintomas característicos de toxicidade como perda de peso (Figura 6), dispneia, aumento de evacuações, sedação, contorções abdominais, alterações comportamentais entre outros, relacionados à administração oral durante 21 dias consecutivos. Sob nossas condições experimentais não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com OE de *Lippia origanoides* em três diferentes doses e o grupo controle negativo. A variação do peso corporal ao longo do experimento pode ser vista abaixo.

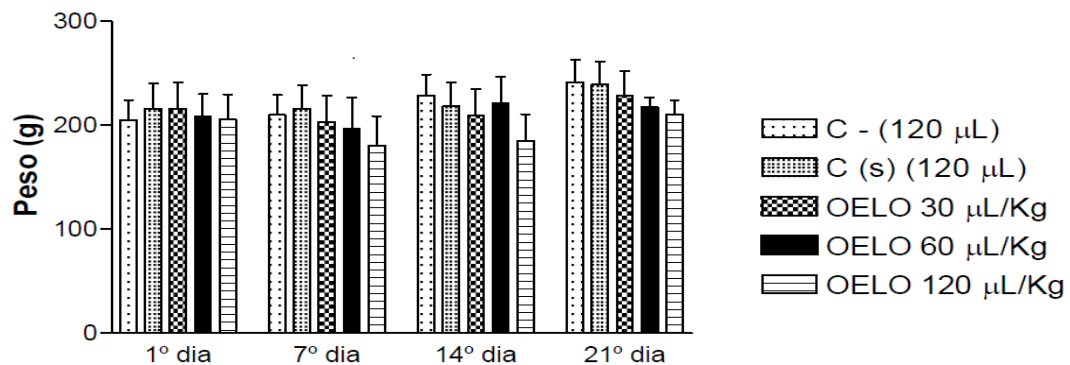


Figura 6. Peso dos animais tratados com óleo essencial de *Lippia origanoides* durante 21 dias.

No Teste do **labirinto de Morris** (Fig. 7), não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao tempo para encontrar a plataforma nos quatro quadrantes, demonstrando que não houve nenhuma alteração na memória espacial e aprendizado dos ratos testados, pois o encontro da plataforma ocorreu cada vez mais rápido à medida que cada quadrante foi utilizado como ponto de partida.

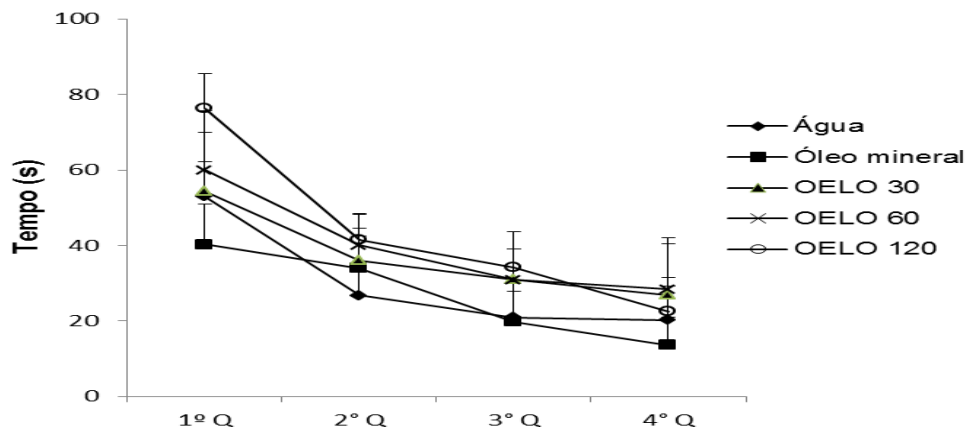


Figura 7. Efeito da administração oral do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre o tempo para encontrar a plataforma submersa no teste do Labirinto Aquático de Morris. Os valores representam a média \pm erro padrão.

No teste do **labirinto em Y** (Fig. 8), após tratamento subagudo de 21 dias, não foi verificada alteração na memória de curta duração, uma vez que não houve diferença significativa na porcentagem de seqüências corretas em nenhum dos grupos, quando comparados com o grupo controle negativo, indicando ausência de efeitos tóxicos sobre a memória espacial.

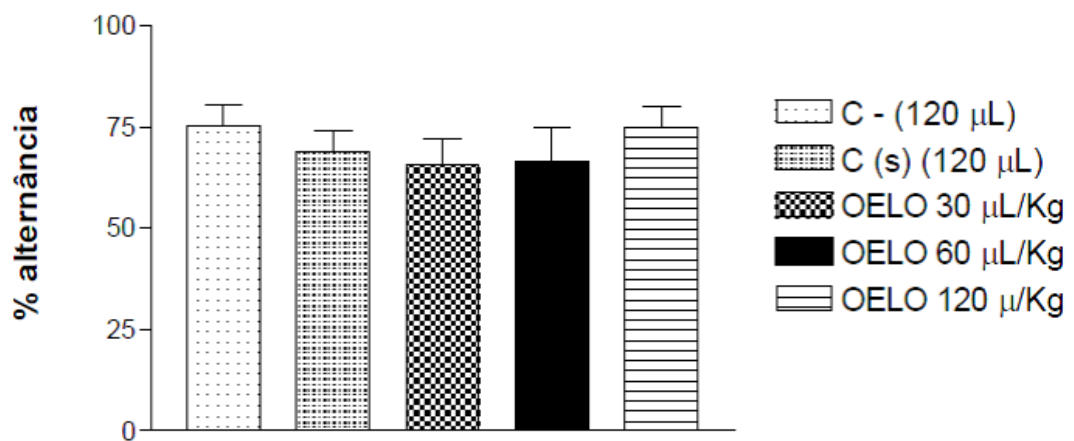


Figura 8. Efeito da administração oral do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a porcentagem de seqüências corretas no teste do labirinto em Y. Os valores representam a média ± erro padrão. OELO = óleo essencial *Lippia origanoides*

Em relação ao teste **da caixa claro-escuro**, (Fig. 9), verificou-se que a memória aversiva dos animais submetidos não foi afetada, pois todos os animais registraram um tempo de latência de 5 minutos no comprimento claro, evidenciando que esses foram capazes de reter a informação de memória aversiva ao ambiente escuro.

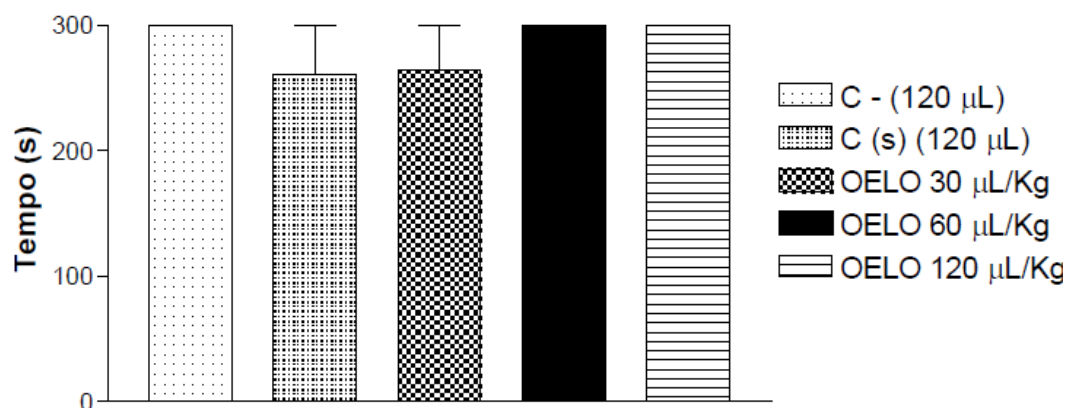


Figura 9. Efeito da administração por via oral do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre o tempo de latência para entrada no ambiente escuro no teste da caixa claro-escuro. Os valores representam a média ± erro padrão.

No teste da **barra giratória**, (Fig. 10), não foram observadas alterações na atividade motora dos ratos em relação ao grupo controle, pois não houve diferença estatística entre o número de quedas e nem no tempo de permanência dos animais na barra giratória, demonstrando que o óleo essencial de *Lippia origanoides* não provocou efeitos tóxicos sobre atividade locomotora dos animais.

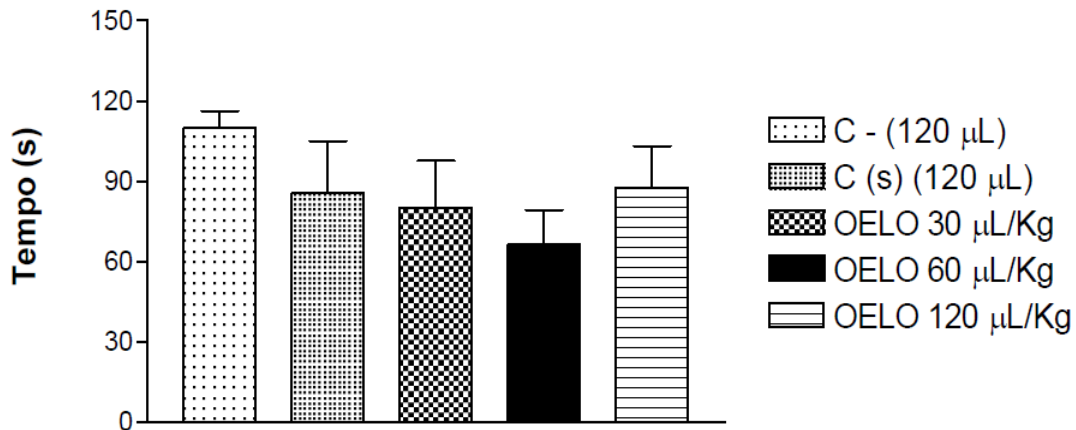


Figura 10. Efeito da administração por via oral do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre o tempo de permanência na barra giratória. Os valores representam a média \pm erro padrão.

7. DISCUSSÕES

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. O hábito está fundamentado em que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. No entanto, o uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como eficazes e seguras, já que, por mais que essas plantas tenham um potencial preventivo e/ou curativo, possuem substâncias que, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo, causando reações indesejáveis ou até mesmo levar a óbito. Nesse sentido, o uso de plantas medicinais deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (Maciel *et al.* 2002).

Lopes e colaboradores (2002) estabeleceram os seguintes critérios de classificação de toxicidade com base nos níveis de CL_{50} em *A. salina*: $CL_{50} < 80 \mu\text{g mL}^{-1}$; altamente tóxico,

CL₅₀ entre 80 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹; moderadamente tóxico e CL₅₀ > 250 µg mL⁻¹ não tóxico ou de baixa toxicidade.

No presente trabalho, nos testes de toxicidade frente à *A. Salina*, o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou valores de CL₅₀ determinados em 52,4 µg mL⁻¹. De acordo a classificação destes autores, o óleo essencial de *L. origanoides* é considerado altamente tóxico.

Estes resultados corroboram com estudos realizados por Franco (2012), onde o autor avaliou a toxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* frente *A. salina*, e verificou que o óleo apresentou alta toxicidade, com valores de CL₅₀ determinados em 7,4 ± 0,2 µg mL⁻¹.

A partir destes resultados, podemos sugerir, ainda em nível especulativo, que o elevado grau de toxicidade, encontrado para o óleo essencial de *L. origanoides*, frente à *A. salina*, possa estar relacionado com a presença de carvacrol e timol, compostos previamente descritos como majoritários para esta espécie, cujo potencial biológico como agente antimicrobiano foi previamente comprovado frente à bactérias e fungos patogênicos (Oliveira et al., 2007; Sarrazin et al., 2015).

Embora o ensaios toxicológico frente à *A. salina* ofereça muitas vantagens, para se obter um valor real da toxidade, as amostras biológicas devem ser sujeitas a uma comparação com os valores da dose letal (DL₅₀), quantidade necessária para provocar a morte em 50% de indivíduos, obtidos para a toxidade aguda oral testada em animais de sangue quente como ratos e camundongos (Damasceno, 2009). Assim, os resultados de DL₅₀ são empregados para o delineamento dos estudos de toxicidade subcrônica e crônica, particularmente no que se refere à escolha de doses (Eaton & Klaasson 1995; Larini 1997).

Na realização do ensaio de toxicidade aguda, a determinação da dose letal indicou baixa toxicidade (DL₅₀ = 1.673,84 mg kg⁻¹) para o óleo de *L. origanoides*. Andrade et al.(2014), também não observaram alterações fisiológicas ou comportamentais, após administração oral aguda do óleo essencial de *L. origanoides*, nas doses de 30, 60 e 120 mg Kg⁻¹. Outros estudos de toxicidade para esta espécie foram realizados por Coelho (2015), que avaliaram a toxicidade aguda em ratos Wistar fêmeas, tratados com extrato hidroalcoólico de *L.origanoides* com dose inicial de 2g/Kg. Os autores verificaram que nenhum dos animais expostos apresentou mortalidade nas primeiras 24 horas e durante todo o período do estudo, sugerindo que amostra foi considerada praticamente atóxica.

Em adição ao teste de toxicidade oral aguda, no presente trabalho também verificamos possíveis efeitos toxicológicos neurocomportamentais da administração oral subaguda do óleo essencial de *L. origanoides*, utilizando *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar como modelo

experimental. Nesta avaliação, os animais foram submetidos a doses diárias de 30, 60 e 120 mg kg⁻¹ de peso corpóreo.

De acordo com Kullig *et al.* (1996), para triagem e caracterização de efeitos neurotóxicos, há inúmeros métodos disponíveis. Neste sentido, os testes comportamentais por meio de metodologias de esforço, resistência muscular função sensorial e ainda a o comportamento cognitivo, de modo implícito ou explícito fornecem evidências, da forma como determinadas substâncias modificam o estado emocional de animais. O comportamento exploratório e o padrão de locomoção são fatores diretamente relacionados com o estado de ansiedade das cobaias, o que por sua vez, pode ser o resultado de modificações neuroquímicas ou de lesões no sistema nervoso central (Viaud-Delmon, *et al.* 2011).

A escolha de um modelo experimental para avaliar o aprendizado e a memória de um roedor, deve levar em conta a capacidade do animal de aprender a tarefa e sua capacidade de executá-la. Assim, o procedimento experimental utilizando o labirinto aquático de Morris, por exemplo, é considerado adequado, pois avalia o comportamento cognitivo de roedores, uma vez que estes animais se mostram bons nadadores e apresentam uma boa capacidade de localização espacial requerida neste teste, pelo fato da água ser um meio aversivo (Pettenuzzo 2001). Ratos normais são capazes de utilizar estratégias de lugar, ao mesmo tempo de orientação e de guiamento para solucionar a tarefa de navegação espacial no labirinto aquático, enquanto que, ratos treinados a buscar a plataforma, partindo de pontos diferentes da borda do labirinto, devem aprender sobre as posições relativas a esses estímulos de modo a executar a tarefa utilizando estratégias de guiamento e/ou orientação. A tarefa do labirinto aquático de Morris é, portanto, adequada para a avaliação da integridade da função hipocampal, área relacionada aos processos cognitivos, em especial, a memória espacial (Eichenbaum 2000). Observamos no nosso estudo que os ratos expostos não apresentaram sinais de neurotoxicidade, visto que demonstraram médias semelhantes ao grupo controle negativo, quando avaliados no Labirinto aquático de Morris, evidenciando que não houve diminuição na capacidade de aprendizado e memorização, sugerindo integridade do hipocampo.

O teste do labirinto em Y baseia-se na tendência inata de roedores de explorar novos ambientes, desta forma permite analisar a capacidade de memória e de reconhecimento espacial, visto que o animal tenta utilizar locais específicos da caixa para se localizar em que alternância espontânea entre os braços do aparelho pode ser considerada como um indicativo de memória de curto prazo, esse tipo de memória pode ser localizada no hipocampo que trata-se de um sítio de ação de influência modulatórias em muitos tipos de memória ou componentes de memória: espacial, verbal e contextual (Bechara 1997). Assim, a partir dos

resultados obtidos no presente trabalho é possível sugerir que não ocorreram lesões e/ou efeitos neurotóxicos em nível de hipocampo dos animais em função da administração oral do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

O teste da caixa claro/escuro é baseado na aversão (comportamento de esquiva inibitória) que os animais possuem a um ambiente desconhecido e iluminado, tal conflito é gerado devido a tendência exploratória natural dos roedores ao novo ambiente, ao mesmo tempo em que evitam um ambiente bem iluminado, comportamento conhecido como neofobia. A inibição da exploração do ambiente pelo animal é através da aplicação de choques elétricos na qual o animal deve reprimir seu comportamento de exploração e ficar na área escura (protegida) ou então superar o medo do ambiente iluminado para explorá-lo, atividade demonstrativa de redução da ansiedade mensurada pelo número de transições entre os compartimentos claro e escuro e pelo tempo de permanência no compartimento claro (Graeff & Zangrossi, 2002).

Segundo Gargano (2007), o óleo essencial de *Citrus latifolia* (conhecida no Brasil como limão Tahiti) é capaz de produzir um aumento no tempo de permanência na área clara, enquanto o de *Citrus aurantium* (laranja-azedo ou laranja-amarga) é capaz de aumentar tanto este parâmetro, quanto o número de transições entre os compartimentos claro e escuro (Pultrini *et al.* 2006). No presente estudo, não foi observado aumento significativo no número de entradas no compartimento escuro, após 24 h do treino, sugerindo que os animais tratados permaneceram com memória de curta duração íntegra, sem prejuízo das funções cerebrais de memória com a administração do EO de *Lippia origanoides*. Segundo Izquierdo & Medina (1997), a formação da memória para esse tipo de comportamento é decorrente de uma série de eventos bioquímicos envolvendo as regiões do hipocampo, amígdala e córtex parietal.

O teste da barra giratória (Rota-rod) avalia a integridade da função motora dos animais, verificando efeitos como incoordenação e relaxamento muscular, os quais podem ser induzidos por drogas depressoras do sistema nervoso central, considerando a intensidade deste efeito o curto tempo de equilíbrio sobre a barra (Oliveira *et al.* 2008). Tais resultados permitem detectar enfraquecimento neurológico, incluindo ataxia e relaxamento muscular, efeitos característicos da neurotoxicidade (Pultrini & Galindo & costa 2006). Oliveira *et al.*, (2008) ao avaliar frações etanólicas de *Synadenium umbellatum* Pax, verificou que estas não apresentaram influências motoras nas doses de 25, 50 e 100 mg kg⁻¹. Da mesma forma, nossos resultados foram satisfatórios quanto à integridade motora, uma vez que observamos que os animais controles e testes apresentaram uma média de tempo semelhante na permanência sobre a barra giratória. Assim supõe-se que, nas doses avaliadas, o óleo essencial da espécie

Lippia origanoides não apresenta efeitos toxicológicos neurocomportamentais, uma vez que em nenhum dos testes realizados foi verificada alguma atividade depressora sobre o SNC indicativa de neurotoxicidade.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

L. origanoides (Verbenaceae) é uma planta aromática utilizada na medicina tradicional no tratamento de problemas gastrointestinais, infecções microbianas em geral e de doenças das vias respiratórias, incluindo asma, bronquites, gripes, resfriados e tosse. Em estudos prévios, tais atividades foram atribuídas aos constituintes majoritários do óleo essencial de *L. origanoides*, timol, carvacrol e *p*-cimeno. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos sugerir que o óleo essencial desta espécie apresenta alto grau de toxicidade frente ao bioensaio com *A. salina*, conferindo a este óleo potencial farmacológico frente à microorganismos patogênicos como vírus, fungos e bactérias.

Em camundongos, quando administrado por via oral, o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou baixa toxicidade, com valores de DL₅₀ superiores a 1g/mL; e não causou efeitos toxicológicos neurocomportamentais nas doses testadas. Desta forma, tendo em vista as potencialidades farmacológicas dessa espécie, e a baixa toxicidade determinada no presente trabalho, podemos inferir que o óleo essencial de *L. origanoides* apresenta um importante potencial para utilização como recurso terapêutico, sendo necessária a realização de estudos químicos e farmacológicos que busquem isolar os compostos ativos responsáveis pelas ações farmacológicas verificadas por diferentes autores, bem como determinar o seu mecanismo de ação, assim como, estudos mais aprofundados sobre sua toxicidade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, A.M.; CASTAÑEDA, M.L.; BLANCO, K.M.; CARDENAS, C.Y.; REYES, J.A.; KOUZNETSOV, V.V.; STASHENKO, E.E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 33: 125-128, 2007.
- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus* 2009a.
- ANDRADE, A.F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. *Toxicologia na prática clínica*, p. 263, 2001.
- ANDRADE, V.A.; Almeida, A.C.; Souza, D.S.; Colen, K.J.F.; Macêdo, A.A.; Martins, E.R.; Fonseca, F.S.A.; Santos, R.L: Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. *Pesq. Vet. Bras.* 2014, 34: 1153-1161.
- ARAÚJO, E. J. F. **Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz.** 2013. 101 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BANDONI, A. (2003). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.* Buenos Aires, CYTED. 417 p.
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003
- BECHARA, A.; TRANEL, D.; DAMASIO, H.; ADOLPHS, R.; ROCKLAND, C.; DAMASIO, A.R. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humanus. *Science*, v. 269, n. 5227, p. 1115-1118, 1995
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica nº 90 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos.** DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria de Políticas Agrícolas, 2004_Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução –RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 14, de 31 de março DE 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 5 de abril de 2010. DOU nº 63.

BUENO-SÁNCHEZ, J.G.; MARTÍNEZ-MORALES, J.R.; STASHENKO, E.E.; RIBÓN, W. Antitubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica*, 29: 51-60, 2009.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 2012, 50, 62-65.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 2, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, G. D.; CAMPELO R. T.; MIRANDA, V. C.; SANTOS, M. E. P.; CITÓ, A. M. G. L.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, A. P. Efeito vasorrelaxante de *Lippia organoides* H.B.K. em anéis de artéria mesentérica de ratos. Anais do I Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste. Parnaíba: UFPI, 2013.

COELHO, A.G. *Lippia organoides* H.B.K.: obtenção do extrato pafronzado, avaliação do efeito hipotensor e desenvolvimento de comprimidos- 2015, 118f.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.13, p.167-170, 1980.

CUNHA, A. P. & ROQUE, O. R. (2013). *Aromaterapia - Fundamentos e Utilização*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

DAMASCENO, Evelyn Ivana Trindade. Composição e capacidade antioxidante do óleo essencial e extrato metanólico e análise sensorial de *Lippia grandis schau* (Verbenaceae) — Belém, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, p 434-448, 2002.

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

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. **Principles of toxicology**. Em: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5a ed. McGraw-hill, New York, 1995.

EICHENBAUM, H. 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.*, 1: 41-50.

ESCOBAR, P.; LEAL, M.S.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010, 105, 184–190.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquiraçu. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, v. 13, n. 2, p. 121-128, 2011.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FIGUEIREDO, AC ET AL. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v.23, n.4, p. 213-26, 2008. Galindo, LA, Pultrini, AM, Costa, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines*, v.64, n.4, p. 436-41, 2010.b

FRANCO, CAROLINE DA SILVA. Avaliação da composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Lippia gracillis* e *Lippia organóides* da Amazônia Oriental / Caroline da Silva Franco; orientador, José Guilherme Soares Maia, co-orientadora, Joyce Kelly do Rosário da Silva — 2012.

GARGANO, A. C. Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas de frutos de espécies do gênero *Citrus*. Botucatu, 2007. 58p. (Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista –UNESP).

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Ecl. Quím.* v. 36 , p. 64-77, 2011. GRAEFF, F. G., ZANGROSSI Jr, H. Animal models of anxiety disorders. In: D’Haenen H, den Boer JA, Willner P (eds). *Biological Psychiatry*. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd; 2002. p 96–103.

HUET, R. Les huiles essentielles d’agrumes. *Fruits*, v. 46, n. 4, p. 501-513, 1991.

IZQUIERDO I, MEDINA JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68:285-316.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. (2009) *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 632 p. KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. 2ª ed. São Paulo: Artmed, 2012.

LARINE, L. **Toxicologia**. p. 43-58. 3a ed. Manole, Sao Paulo, 1997.

LI, A.A.; LEVINE, T.E.; BURNS, C.J.; ANGER, W.K. Integration of epidemiology and animal neurotoxicity data for risk assessment. *Neurotoxicology*, v. 33, p. 823-832, 2012.

LIMA, L. Fitoterápicos e usos de plantas medicinais. *Jornal da Unesp*, ano XVI, n. 166. Disponível em: <<http://www.unesp.br/aci/jornal/166/farmacologia.htm>>. Acessado em: 5 Novembro. 2006.

LIMA, M. d. S., et al. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology* 699, pp.112-117. [Em linha]. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299912009715>> [Consultado em 12-09-2014].

LOPES, W.B.; MORONI, F.T.; BRANDEBURGO, M.; HAMAGUCHI, I. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação de toxicidade de extratos vegetais. **Revista Horizonte Científico**, v.1, p.1-10, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHAVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADALOSSO, R. C. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MENEZES, R.; TORRES, F.A.; STASHENKO, E.; OCAZONEZ, R.E.; Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS* 41: 236-243, 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp : a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, Victoria Island, 1982.

MITRA, S. (2003) Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry. Wiley Interscience.

MONTGOMERY KC (1958). The elevated plus-maze. *Pharmac. Methodol. Ethology Psychopharmacol.* 53(1):334-342.

MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo Timol. **Revista Acta Amazônica**. v. 2, n. 1, p. 45-46, 1972.

MORRIS M (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal Neuroscience Methods* 11:47-60.

MURDOCH, B.E. The cerebellum and language: Historical perspective and review. **Cortex**, v. 46, p. 858-868, 2010. New Jersey. 458 p.

O'LEARY, N.; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. (2012). Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbanaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of Linnean Society*, v. 170, 197-219.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline:423.http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. Acesso em março de 2008.

OGA, SEIZE; CAMARGO, Márcia M. A.; BATISTUZZO, José A. O. Fundamentos de Toxicologia. Editora Atheneu. 3.ed, p.696, 2008.

OLIVEIRA RB, NASCIMENTO MVM, VALADARES MC, PAULA JR, COSTA EA, CUNHA LC (2008). Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(3):485-491.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, 101: 236-240, 2007.

OLIVEIRA, F.P. *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Review Brazilian Farmacognosy*, v.16, n.4, p.510-6, 2006.

OMS. 2002. Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005, Genebra, 2002. <Disponível em: http://www.opas.org.br/medicamentos/site/uploadarq/trm_srat_spam.pdf> acessado em 06 de junho de 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Alma-Ata, 1978. Cuidados Primários de Saúde, p. 64, Brasília, 1979.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395-400, Jena, 2001.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201-214, 2001.

PETTENUZZO LF. Efeito da administração crônica pós-natal dos ácidos propiônicos e metilmalônico sobre o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Water Maze) e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em hipocampo. [Dissertação]. Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

USHAKOVA, G.A.; BEREZIN, V.A.; SKIBO, G.G. 1995. Neural cell adhesion molecule (NCAM) distribution may predict the effect of neurotoxins on the brain. *Official Journal of the International Society on Toxinology*, 33: 577-581.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A., SILVA, L. G. F. and BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemiasalina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine* v. 10, p. 209-212, 2003

- PULTRINI, A. D. E. M., GALINDO, L. A., COSTA, M. Effects of essential oils from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.*, v.78, n.15, p.1720–5, 2006.
- RODRIGUES, A.G.; SANTOS, M.G.; AMARAL A.C.F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In: Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília: (DF); p.9 – 28, 2006.
- SALIMENA, F. R. G. (2000). Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). São Paulo: Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SARRAZIN, S.L.F.; OLIVEIRA, R.B.; BARATA, L.E.S.; MOURÃO, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry*, v.134, p. 1474–1478, 2012.
- SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; ASSUNÇÃO, A.P.F.; OLIVEIRA, R.B.; CALAO, V.Y.P.; SILVA, R. STASHENKO, E.E.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules*, 20: 1860-1871, 2015.
- SILVA, A. J. R.; PÉREZ SABINO, J. F.; MÉRIDA REYES, M. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Lippia substrigosa* Turcz. Growing wild in Guatemala. *Journal of Essential Oil Research*, v.22, 107-108.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento - Óleos Voláteis*. Editora: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis/SC, 2007.
- SIMÕES, C. M.O.; et. al. *Farmacognosia: da planta ao Medicamento*. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina. 5ª Edição. 2010.
- SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Estatística anual de casos de intoxicação e Envenenamento. Disponível em: <www.sinitox.icict.fiocruz.br>. Acesso em: 29 jun.2010.
- SIVIRA, A.; SANABRIA, M.E.; VALERA, N.; VÁSQUEZ, C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neotropical Entomology*, 40: 375-379, 2011.
- SLIKKER JR., W.; BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 206, n. 2, p. 255-260, 2005.
- SOUSA, T. O. Contribuição ao estudo químico e biológico das folhas de *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae). 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. 2ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 704p.

STASHENKO, E. E.; MARTINÉZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. (2010). *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, v. 33, 93-103.

SUAREZ, A.G., CASTILLO, G. AND CHACÓN, S. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia organoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetic Research**, 90: 455-465, 2008.

TAIZ L, ZEIGER E (2009) *Fisiologia Vegetal*, 4th edn. Artmed Editora Porto Alegre.
TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta Bragança Paulista*, v. 21, p. 7-13, 2003.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova, São Paulo*, v. 28, n. 3, Junho 2005.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. (2013). Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. *Phytotherapy research*, v.27, 179-185.

VIAUD-DELMON, I.; VENAULT, P.; CHAPOUTHIER, G. Behavioral models for anxiety and multisensory integration in animals and humans. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1391–1399, 2011.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, v. 81, p. 343–349, Oct. 2010.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. (2002). Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham.. *Flavour and Fragrance Journal*, v.17, 29-31.