



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Extração e caracterização química, estudos farmacológicos e avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES

TERESINA - PIAUÍ

2015

ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia*
origanoides H.B.K**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Antônia Maria das Graças Lopes Citó

TERESINA - PIAUÍ

2015

ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
origanoides* H.B.K**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03/12/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Departamento de Química – UFPI

Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto
Departamento de Microbiologia – UFPI

Prof^ª Dr. Chistiane Mendes Feitosa
Departamento de Química – UFPI

Prof^ª Dr. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho
Departamento de Farmacologia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

DEDICATÓRIA

*A Deus e aos grandes amores da minha
vida: meus pais, meus irmãos e meu
namorado Victor Hugo. Pessoas
especiais e importantes que Deus me
concedeu.*

AGRADECIMENTOS

À professora Graça Citó, grande exemplo, por quem tenho a honra de ser orientada;

Ao professor Rivelilson Mendes de Freitas, que abriu as portas do mundo científico para mim e por todas as considerações iniciais inerentes a este trabalho;

À professora Graça Medeiros, pelo fornecimento do material vegetal;

À aluna de iniciação científica Brenda Nayranne, por todas as horas dedicadas a este estudo;

Ao meu grande irmão e amigo Guilherme Lopes, que está presente em todos os momentos, não importa a distância nem os fusos horários;

Aos meus colegas de turma de mestrado, especialmente ao Alexandre e a Maria, que me dirimiram muitas dúvidas no decorrer dos experimentos;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria e o homem que adquire conhecimento”.

Provérbios 3: 13

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”.

Louis Dearborn LaMoore

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides* H.B.K. ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES. Orientadora: Antônia Maria das Graças Lopes Citó. Qualificação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Curso de Farmácia, UFPI, 2015.

RESUMO

Lippia organoides H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto aromático utilizada popularmente para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais. Não há evidência científica de eficácia e segurança em relação ao uso do óleo essencial de *Lippia organoides*. O objetivo do presente estudo foi isolar, caracterizar e investigar a toxicidade e propriedades farmacológicas inerentes ao óleo em estudo visando futuramente contribuir com o desenvolvimento de fitomedicamentos. Para tanto, uma prospecção científica e tecnológica foi realizada em bases de dados, avaliação qualitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase pelo teste de Ellman, avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, hidroxila e óxido nítrico. Além disto, foi verificada sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica por meio da determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, bem como o seu potencial redutor nas concentrações 100, 300 e 900 µM. O ensaio de toxicidade aguda foi seguido se utilizando do método de classe tóxica aguda do Guia 423 da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) nas doses de 300 e 2000 mg/kg via oral. Durante 14 dias após o tratamento foram observados a toxicidade geral, taxa de letalidade, evolução do peso corporal, consumo de água e alimentos, e ainda produção de excretas. Após este período, os animais foram anestesiados com cetamina (0,1ml/10g; i.p.) para coleta de sangue para análises hematológicas e bioquímicas, bem como análise dos principais órgãos (fígado, coração, rins, pulmão, baço e cérebro) para estudo macroscópico e morfológico. Também foi avaliada a atividade locomotora e coordenação motora dos animais tratados com óleo essencial de *L. organoides* nos testes do campo aberto e da barra giratória, respectivamente. O óleo essencial de *L. organoides* apresentou 25 constituintes, tendo como majoritários os compostos timol com 23,89%, seguido do com carvacrol 21,78% e p-cimeno com 18,87%. Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem concluir que o óleo se demonstrou promissor quanto à inibição da acetilcolinesterase. Na avaliação antioxidante *in vitro*, em todos os testes, o óleo apresentou significativa capacidade antioxidante. No ensaio de toxicidade aguda, não foram identificados sinais de toxicidade e a DL₅₀ para o extrato categorizou-se como indeterminada. Com relação aos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos não foram observadas alterações e nem efeitos sobre a atividade locomotora e coordenação motora entre animais após tratamento com óleo essencial de *Lippia organoides* nos diferentes protocolos. Além disto, não foi visto mudanças quanto aos aspectos macroscópicos e morfológicos dos principais órgãos. Os resultados sugerem que óleo essencial de *Lippia organoides* pode ser seguro em ensaios pré-clínicos, e que o mesmo demonstra potencial farmacológico que precisa ser melhor explorado para esclarecer uma possível ação no sistema nervoso central. Estes resultados ampliam as perspectivas para a realização de outros testes que possam corroborar com a segurança e eficácia da utilização do óleo essencial de *Lippia organoides* como produto de importância biotecnológica.

Palavras-chave: Plantas medicinais, antioxidante, toxicidade, sistema nervoso central, *Lippia*.

EXTRACTION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION, PHARMACOLOGICAL STUDIES AND EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF *Lippia origanoides* H.B.K. ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES. Advisor: Antônia Maria das Graças Lopes Citó. Master's dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. UFPI, 2015.

ABSTRACT

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) is an aromatic bush commonly used for the treatment of gastrointestinal and respiratory diseases. There is no evidence of scientific efficacy and safety regarding the use of essential oil of *Lippia origanoides*. The aim of this study was to isolate, characterize and investigate the toxicity and pharmacological properties inherent to the oil under consideration for future contribute to the development of phytomedicines. For this, a scientific and technological prospecting was conducted in databases, qualitative evaluation of the inhibitory activity of acetylcholinesterase by Ellman's test, potential antioxidante avaluation in vitro by 2,2difetil-1-picrylhydrazyl, hydroxyl and nitric oxide. Moreover, it was verified its capacity to inhibit lipid peroxidation by determining substances reactive with thiobarbituric acid, and its potential in reducing concentrations of 100, 300 and 900 μ M. The acute toxicity test was followed using the acute toxic class method OECD 423 guide the doses of 300 and 2000 mg / kg orally. For 14 days after treatment were observed general toxicity, lethality rate of evolution of the body weight, food and water consumption, and yet production excreta. After this period, the animals were anesthetized with ketamine (0.1 ml / 10g; ip) for blood collection to hematological and biochemical analysis as well as analysis of major organs (liver, heart, kidney, lung, spleen and brain) to study macroscopic and morphological. It also evaluated the locomotor activity and coordination of animals treated with essential oil *Lippia origanoides* in the open field test and the swivel bar, respectively. The *Lippia origanoides* essential oil presented 25 constituents having as the major thymol compounds of 23.89%, followed by carvacrol and p-cymene to 21.78% with 18.87%. Results of acetylcholinesterase inhibition studies support the conclusion that the oil has shown promise for the inhibition of acetylcholinesterase. In vitro antioxidant evaluation in all tests, the oil showed significant antioxidant capacity. For tests on acute toxicity, they were not identified signs of toxicity and LD50 for up-categorized extract as undetermined. Regarding the physiological, biochemical and hematological parameters were observed and changes or effects on locomotor activity and coordination between animals after treatment with essential oil of *Lippia origanoides* in different protocols. In addition, it was not seen as changes about macroscopic and morphological aspects of the principal organs. The results suggest that essential oil of *Lippia origanoides* can be safe in preclinical testing, and demonstrate pharmacological potential that needs to be better exploited to clarify a possible action in the central nervous system as shown in this study. The results of this study broaden perspectives to perform other tests that might corroborate the safe and effective use of essential oil of *Lippia origanoides*, as a product of biotechnological importance.

Keywords: medicinal plants, antioxidant, toxicity, central nervous system, *Lippia*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1	<i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	28
Figura 2	Folhas e inflorescências de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	29
Figura 3	Desequilíbrio entre agentes oxidantes e defesa antioxidante	32
Figura 4	Comparação entre o cérebro normal e o de portador de Alzheimer	33

Capítulo I

Figura 1	Esquema da prospecção científica e tecnológica nas bases de dados	50
Figura 2	Fluxograma da avaliação, exclusão e análise das publicações a respeito da espécie <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	51
Figura 3	Principais flavonoides encontrados em <i>L. origanoides</i>	54

Capítulo II

Figura 1	Mapa do Piauí destacando o município de José de Freitas	68
Figura 2	Cromatograma dos íons totais (TIC) dos constituintes voláteis, com os majoritários identificados, obtidos por hidrodestilação das partes aéreas de <i>L. origanoides</i>	75
Figura 3	Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação das partes aéreas de <i>L. origanoides</i>	76
Figura 4	Resultado qualitativo da atividade inibidora da acetilcolinesterase do OELO	77
Figura 5	Mecanismo de ação presente no Teste de Ellman	78
Figura 6	Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica do OELO comparado com o padrão fisostigmina	79

Capítulo III

Figura 1	Esquema do estudo da toxicidade dose única (aguda) do óleo (OELO)	90
----------	---	----

Figura 2	Esquema do estudo da realização dos testes de análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com OELO	94
Figura 3	Parâmetros observados no experimento do teste do campo aberto em camundongos tratados com OELO	95
Figura 4	Protocolo experimental do OELO no teste do campo aberto	96
Figura 5	Parâmetros observados no experimento do teste da barra giratória em camundongos tratados com o OELO	97
Figura 6	Protocolo experimental do OELO no teste da barra giratória	97
Figura 7	Efeito do OELO sobre a atividade locomotora espontânea dos animais no teste do campo aberto	107
Figura 8	Efeito do OELO sobre o <i>grooming</i> dos animais	108
Figura 9	Efeito do OELO sobre o <i>rearing</i> dos animais	108
Figura 10	Efeito do OELO sobre o tempo de permanência dos animais na barra giratória do Rota rod	110

Capítulo IV

Figura 1	Representação do método do radical DPPH•	124
Figura 2	Representação do método radical hidroxila (OH•)	125
Figura 3	Representação do método de inibição do Oxido nítrico (NO•)	126
Figura 4	Representação do método da peroxidação lipídica (níveis de TBARS)	127
Figura 5	Representação da avaliação do potencial redutor	128
Figura 6	Reação entre o radical DPPH• e um composto antioxidante	131
Figura 7	Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) com o radical DPPH•.	132
Figura 8	Processo reacional de quantificação do malonaldeído (MDA)	134
Figura 9	Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) com o radical hidroxila	135
Figura 10	Mecanismo de reação para determinação do nitrito, segundo método de <i>Griess</i>	137

Figura 11	Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) contra a formação de íons nitritos	138
Figura 12	Formação do TBARS a partir do malonaldeído	140
Figura 13	Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) contra a formação de radical lipídico, formado durante a peroxidação lipídica	141
Figura 14	Mecanismo de reação para determinação do potencial redutor	142

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo I

Quadro 1	Principais atividades farmacológicas do óleo essencial da <i>L. organoides</i> H.B.K.	54
Tabela 1	Total de depósitos de patente pesquisada nas bases do WIPO, INPI, USPTO, EPO e LATIPAT	57
Tabela 2	Principais características das patentes analisadas	58

Capítulo II

Tabela 1	Composição dos voláteis identificados no óleo essencial de <i>L. organoides</i> H.B.K.	72
----------	--	----

Capítulo III

Quadro 1	Parâmetros das atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo e descrição para avaliação dos parâmetros	92
Tabela 1	Efeito da administração via oral (v.o.) do OELO em dose única sobre os hábitos fisiológicos diários dos animais	100
Tabela 2	Efeitos do OELO por via oral após administração em dose única sobre os parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	102
Tabela 3	Efeitos do OELO por via oral após administração em dose única sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	104
Tabela 4	Peso dos órgãos tratados com óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> (OELO) na toxicidade aguda	106
Tabela 5	Efeito do OELO sobre o número de quedas dos animais	110

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo III

Gráfico 1	Efeito da administração do OELO em dose única sobre o peso corporal dos animais	101
-----------	---	-----

Capítulo IV

Gráfico 1	Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações na inibição do radical DPPH•	130
Gráfico 2	Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações na remoção de radicais hidroxilas	133
Gráfico 3	Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações contra a formação de íons nitritos gerados	136
Gráfico 4	Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações pela inibição da peroxidação lipídica (inibição dos níveis de TBARS)	139
Gráfico 5	Potencial redutor (Fe^{3+}/Fe^{2+}) do OELO	142

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido ascórbico
AchE	Acetilcolinesterase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
CCA	Centro de Ciência Animal
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CIP	Comissão Internacional de Patentes
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DA	Doença de Alzheimer
DL50	Dose letal 50%
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Regulação de Medicamentos)
EPM	Erro padrão da média
EPO	<i>European Patent Office</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência de Regulação de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)
Fe	Ferro
FID	<i>Flame ionization detector</i>
GESEF	Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia
GHS	Globally Harmonized System
HNO	Ácido nitroso

IC50	Concentração inibitória 50%
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Fármacos de Uso Humano)
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil
IR	Índice de retenção
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IV	Infravermelho
LATIPAT	Patentes da América Latina e Espanha
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MAD	Malonaldeído
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval Sistem on-line</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
NO	Óxido nítrico
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia)
OELO	Óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	<i>Principal component analysis</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
SCIELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TP	Tempo de permanência
UFPI	Universidade Federal do Piauí

USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular Médio
WHO	World Health Organization
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 O uso de plantas medicinais.....	22
3.2 Óleos essenciais.....	24
3.3 Família Verbenaceae.....	26
3.4 <i>Lippia origanoides</i>.....	28
3.5 Estudos de toxicidade.....	29
3.6 Estresse oxidativo.....	31
3.7 Doença de Alzheimer.....	32
REFERÊNCIAS.....	35
4 CAPÍTULO I: <i>Lippia origanoides</i> H.B.K: uma prospecção científica e tecnológica	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	51
Conclusão.....	59
Referências.....	59
5 CAPÍTULO II: Extração, caracterização química e avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i> do óleo essencial da <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	63
Resumo.....	64
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão.....	70
Conclusão.....	80
Referências.....	80

6 CAPÍTULO III: Estudo da toxicidade aguda e do possível efeito no sistema nervoso central do óleo essencial da <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	85
Resumo.....	86
Abstract.....	87
Introdução.....	88
Material e Métodos.....	89
Resultados e Discussão.....	98
Conclusão.....	111
Referências.....	111
7 CAPÍTULO IV: Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> do óleo essencial da <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	119
Resumo.....	120
Abstract.....	121
Introdução.....	122
Material e Métodos.....	123
Resultados e Discussão.....	129
Conclusão.....	143
Referências.....	143
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	148
9 PERPECTIVAS.....	149
PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	150
ANEXOS.....	151

1 INTRODUÇÃO

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, sendo tão antiga quanto a espécie humana; e por muito tempo, produtos de origem mineral, vegetal e animal foram as principais fontes de fármacos (SIVIERO et al., 2012).

O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, representando mais de 20% do número total de espécies conhecidas e apresenta a flora mais diversificada, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total global. Essa biodiversidade é seguida por uma ampla aceitação da utilização das plantas medicinais. A maioria da população brasileira consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis comercialmente e dependem quase exclusivamente de medicamentos de origem natural. Numerosos estudos sobre a farmacologia de plantas medicinais têm sido realizados, uma vez que constituem uma fonte potencial para a produção de novos medicamentos (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

No início da década de 90, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimava que 65 a 80% da população de nações em desenvolvimento dependiam exclusivamente de plantas medicinais para os cuidados básicos de saúde. Mais de 13.000 espécies de plantas são utilizadas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitas das quais servem de modelo para a síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES et al., 2010).

Plantas com atividade psicoativa exercem importantes efeitos sobre a consciência, memória, emoções e cognição e, devido a esses efeitos, têm sido utilizadas há bastante tempo com finalidades terapêuticas, espirituais e recreacionais. A investigação farmacológica de produtos naturais que apresentam atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) auxiliam a compreensão das bases neuroquímicas de muitas doenças. Extratos vegetais e produtos isolados exercem suas ações através de interações com moléculas endógenas transdutoras de sinal (neurotransmissores) (CARDOSO et al., 2008; QUINTANS JÚNIOR et al., 2008; SOUSA et al., 2008; SUBHAN, 2008).

Dentre as desordens neurológicas destaca-se a doença de Alzheimer, uma patologia neurodegenerativa mais frequentemente associada com a idade, cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas advêm de uma deficiência progressiva e uma eventual incapacitação pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, caracterizando-se por ser neuroinflamação ocasionada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e pela formação de radicais livres (ZHAO; TANG, 2002; JANUS; WESTAWAY, 2001; FASSBENDER et al., 2001).

A espécie *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae), objeto de estudo deste trabalho, tem sido comumente utilizada pela população com fins medicinais. Na Colômbia é conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida como “Alecrim-do-campo”, sendo amplamente dispersa na região. A presença de óleo essencial na espécie, bem como sua composição, determina o aroma específico da planta e o sabor de seu condimento (OLIVEIRA et al, 2007). É geralmente utilizada como tempero e seu uso na medicina tradicional se destina ao tratamento de doenças gastrintestinais e respiratórias (resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma) (PASCUAL et al., 2001; VICUÑA et al., 2010). Diversas atividades farmacológicas já foram demonstradas para esta espécie, tais como propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antimaláricas e anti-giardia (PASCUAL et al., 2001).

Nesse sentido, esta dissertação intitulada “Obtenção e caracterização química, estudos farmacológicos e avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.” foi desenvolvida com o intuito de agregar valor ao óleo essencial da *L. origanoides* por meio de estudos farmacológicos sobre possível atividade a nível de sistema nervoso central (SNC) e avaliação de possível atividade antioxidante no combate aos radicais livres, o que auxiliará no desenvolvimento de uma nova opção fitoterapêutica com maior eficácia e menor toxicidade (CAMPELO et al., 2011; SILVA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

Este trabalho foi organizado em capítulos que darão origem a artigos científicos, os quais serão submetidos a publicação em revistas internacionais com extensa divulgação na comunidade científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K, desenvolvendo um estudo pré-clínico para avaliar a toxicidade aguda em roedores e possível atividade a nível do sistema nervoso central em modelos experimentais já preconizados, bem como verificar seu potencial antioxidante e potencial anticolinesterásico *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica relativa a *L. origanoides*;
- Extrair o óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides*;
- Identificar os constituintes do óleo essencial de *L. origanoides* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Investigar a possível atividade anticolinesterásica do óleo essencial de *L. origanoides*;
- Avaliar o uso do óleo essencial da *L. origanoides* na utilização e formulação de produtos fitoterápicos para a prevenção e/ou tratamento da doença de Alzheimer;
- Determinar a toxicidade aguda em camundongos *swiss* tratados com óleo essencial da *L. origanoides*;
- Estabelecer possíveis efeitos antioxidantes *in vitro* do óleo essencial de *L. origanoides* por métodos que utilizam radicais não biológicos como 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•);
- Analisar a capacidade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *L. origanoides* por métodos que utilizam radicais biológicos como radicais hidroxila (OH•), óxido nítrico (NO•), potencial redutor e peroxidação lipídica através do método TBARS;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O uso de plantas medicinais

O uso de plantas e suas preparações na medicina é o modo mais frequente de terapia do mundo todo. Foram estudados registros que sugerem que há aproximadamente 5000 anos as ervas já eram utilizadas e documentadas em sistemas na Índia, China, Egito, Roma e Grécia. Países da América, da Arábia e Japão já faziam uso tradicional de ervas desde os tempos antigos (KELLER et al., 2003; MUJHERJEE, 2008; KAMBOJ, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como todo e qualquer vegetal que apresente em suas composições, substâncias que têm uso com fins terapêuticos ou que tenham características de serem precursores de fármacos semissintéticos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; CORP; PENDRY, 2013).

Com base em estudos encontrados, existem variadas ervas medicinais presentes em residências, onde os moradores de algum modo realizam agricultura urbana, o que acaba permitindo uma redução de gastos significativos para a família quanto à saúde (SIVIERO et al., 2012). Entre as espécies de plantas medicinais mais utilizadas na agricultura urbana da América do Sul encontram-se a babosa (*Aloe vera L.*), o alecrim (*Rosmarinum officinalis L.*) e a hortelã (*Mentha L.*) (EMBRAPA, 1994; VEIGA JÚNIOR et al., 2005; SIVIERO et al., 2012).

Supõe-se que aproximadamente 30% das drogas usadas para fins terapêuticos são derivadas de produtos totalmente naturais, podendo ser plantas, animais ou até microorganismos. Para doenças mais complexas, como é o caso do câncer, preparações naturais são uma importante fonte para produção de novos produtos químicos, sendo que se mostram como suportes com privilégio de terem sido selecionados através dos mecanismos de evolução ao longo de milhões de anos (CALIXTO, 2000).

Diante das principais descobertas de várias pesquisas com plantas medicinais, cita-se entre elas os compostos bioativos isolados para uso direto como fármacos, tais como a digoxina, digitoxina, reserpina, morfina, taxol, vimblastina, vincristina; os compostos bioativos de estruturas identificadas que podem ser modificadas com vistas a produção de novas entidades químicas semi-sintéticas (FERRARINI et al., 2008), com atividade mais potente e/ou uma menor toxicidade; as ferramentas farmacológicas, como por exemplo, a dietilamida do ácido lisérgico e a ioimbina; o uso da planta inteira ou parte dela como fitoterápico, tais como, o alho, a *Ginkgo biloba* e outros (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). As mais importantes vantagens das substâncias de produtos retirados da natureza estão relacionadas com

especificidade de suas atividades biológicas e com a habilidade de ligar-se aos receptores biológicos (VILLAS BOAS; GADELHAS, 2007).

As observações da população quanto ao uso e efetividade das plantas medicinais são importantes no auxílio à descoberta das propriedades terapêuticas dos vegetais, que são prescritos com base nos efeitos medicinais que proporcionam, mesmo não tendo conhecimento dos seus constituintes químicos. Assim sendo, os indivíduos que fazem uso de plantas medicinais no mundo todo, mantêm vivo o ato de utilizar produtos fitoterápicos tomando como verdade as informações terapêuticas que se acumularam com o passar dos séculos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

Embora tenha havido um grande crescimento da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, ainda existem problemas básicos no seu uso por parte das populações carentes, que vão desde ter acesso ao atendimento hospitalar a adquirir exames e remédios. Tais motivos, associados ao fato de ser tradição o uso de plantas medicinais, colaboram para o seu uso por parte da população de países em fase de desenvolvimento (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; CHENG et al., 2013).

De certo modo, este tipo de tradição medicinal desperta interesses em pesquisadores que estudam áreas como farmacologia, botânica e fitoquímica, que associadas tornam rico o conhecimento sobre as plantas do mundo. Diversas abordagens para fazer a seleção de espécies de origem vegetal têm sido apontadas na literatura, entre elas, existem três tipos que são mais investigados: abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; abordagem quimiotaxonômica ou filogenética - seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família e a abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico. Na seleção randômica, é maior a probabilidade de serem descobertas substâncias nunca antes vistas, podendo ser ou não bioativas. Porém, na seleção etnofarmacológica é mais provável que sejam descobertas novas substâncias bioativas (MACIEL et al., 2002; BOUDJELAL et al., 2013).

O principal problema no uso destes produtos que tem origem vegetal é a crença de que eles não podem apresentar reações adversas e efeitos adversos (RODRIGUES et al., 2011). A toxicidade de plantas medicinais é um grave problema que diz respeito a saúde pública. Ocorrem de forma comum os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outros fármacos). As plantas medicinais no Brasil são consumidas sem nenhuma ou pouca comprovação dos seus produtos farmacológicos, divulgadas pelo comércio ou usuários. Em algumas vezes, essas plantas são utilizadas para fins

medicinais diferentes daqueles para as quais de fato ela tem utilidade (MACIEL et al., 2002; VEIGA JÚNIOR et al., 2005; CHENG et al., 2013).

Em virtude de todos esses aspectos, tem-se visto um aumento no interesse de estudar a utilização de plantas medicinais, tendo como objetivo fins terapêuticos, aliados à uma boa aceitação de tais produtos no ambiente farmacêutico e altas cifras que estão associadas ao comércio de fitomedicamentos, constatados nos últimos anos (NOLDIN et al., 2006).

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais e extratos oriundos de plantas foram vistos como as mais relevantes fontes de produtos naturais (BAKKALI et al., 2008; VEIGA JUNIOR et al., 2005). Segundo a International Standard Organization (ISO), os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, constituída por um complexo de constituintes químicos caracterizados pela sua volatilidade (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Há relatos de conhecimento sobre óleos essenciais há alguns séculos, e a obtenção de tais óleos está diretamente ligada a países do Oriente, principalmente Pérsia, Egito, China, Índia e Japão. A partir do século XVIII a produção de óleos essenciais evoluiu de forma significativa quando foram iniciados os estudos para sua caracterização química, resultando atualmente no grande e crescente número de vegetais e plantas conhecidos por serem fontes de óleos essenciais interessantes economicamente (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são produzidos na natureza como metabólitos secundários e têm um papel importante em garantir a proteção da planta contra fungos, bactérias, insetos, herbívoros e vírus. Também são importantes por realizar o papel de atrair insetos para que aconteça a polinização das espécies vegetais e também para repelir outros (SIMÕES; SPITZER, 2003). São extraídos de diversas partes vegetais, sendo levadas em consideração aspectos e variações quantitativos e qualitativos, os quais podem ser associados a função de cada parte do vegetal e a fatores edafoclimáticos como o clima, a adubação, o tipo de solo e a localização (BURT, 2004, CARVALHO FILHO et al., 2006).

Variados setores industriais, tais como, na fabricação de fármacos, perfumes, cosméticos, produtos de higiene e limpeza, alimentos e bebidas que tem utilizado os óleos essenciais como fonte de produção. O óleo pode ser extraído de caules, flores, frutos e raízes de diversas espécies de vegetais aromáticas e possuem diversas aplicações. Por exemplo, na indústria alimentícia podem atuar como antioxidantes e antibacterianos, além de conferir o sabor e odor agradável (BUSATTA et al., 2008; SILVA et al., 2013). Considerando o fato de

que os óleos essenciais e os seus constituintes são utilizados em cosméticos e produtos farmacêuticos, é de grande relevância analisar o potencial farmacológico destes compostos.

Muitos óleos voláteis apresentam uma diversidade de atividades farmacológicas: ansiolítica (ALMEIDA et al., 2012), antiepiléptica (COSTA et al., 2012) e/ou antinociceptiva (CAMPELO et al., 2011). Tais efeitos provavelmente são derivados da diversidade estrutural dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas (MELO et al., 2010). As propriedades biológicas dos óleos essenciais, geralmente, atribuem-se aos componentes majoritários, que em geral, estão incluídas em dois grupos químicos principais: terpenos e fenilpropanóides, destes, os componentes fenólicos são os mais ativos, e parecem agir principalmente como promotores de permeação de membrana celular (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; BASER, 2008; BRITO et al., 2009).

A utilização dos óleos essenciais como fontes alternativas está em ascensão comparado ao uso de outros produtos disponíveis no mercado, já que são misturas complexas de substâncias lipofílicas, odoríferas e líquidas, além de que seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, cumarinas, dentre outros, na qual a grande maioria se constitui de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides (SIMÕES et al., 2004).

As metodologias de extrações dos óleos essenciais sofrem variação conforme o material vegetal disponível e a finalidade de utilização deste. Um método de extração é considerado ideal quando apresenta um rendimento satisfatório, baixo custo, fácil processo operacional e que não interfira na integridade do óleo. Dentre os principais métodos de extração encontram-se a enfloração, arraste por vapor d'água, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por CO₂ supercrítico (SIMÕES; SPITZER, 2000).

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos pode ser realizada através de técnicas de Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscópicas, dentre as quais as mais frequentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN ¹H e ¹³C, respectivamente) e a Espectrometria de Massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de grande número de substâncias identificadas (SIMÕES; SPITZER, 2000).

O estabelecimento de parâmetros de qualidade para matéria-prima farmacêutica é de fundamental importância para que a qualidade do medicamento seja assegurada, independente de sua origem. Em relação as matérias-primas vegetais, a obtenção de características aceitáveis é difícil de se alcançar em virtude de que estas matérias sofrem variadas influencias, tais como

a variabilidade biológica, mudanças endo-climáticas, as formas de cultivo e de coleta, além de alterações referentes às operações posteriores, exemplificada por secagem, armazenamento e moagem, que podem alterar de forma significativa o perfil de composição do material vegetal (CALIXTO, 2000; SENA et al., 2010; SINGH et al., 2010). Desta forma, assegurar uma melhor reprodutibilidade na qualidade de um fitomedicamento é fundamental e requer a elaboração de rígidos protocolos de controle que contemplem desde a produção do material vegetal até a forma farmacêutica final (RAO et al., 2004; RAMIREZ-DURON et al., 2007; YEH et al., 2007).

3.3 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae é constituída de aproximadamente 75 gêneros e 3000 espécies, pertencente à ordem Lamiales, ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (BONZANI et al., 2003; GOMES et al., 2011). Os representantes desta família apresentam hábitos diversos, podendo ser arbustivas, trepadeiras ou herbáceas, muitos sendo exclusivamente brasileiros. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (GOMES et al., 2011). Muitas das espécies desta família se caracterizam por possuírem um elevado conteúdo de óleos essenciais (mais que 1%), com uma grande diversidade de usos nas indústrias farmacêutica, alimentar, têxtil, química, cosmética e de perfumaria (VEGA-VELA et al., 2013).

Os óleos essenciais de algumas espécies desta família têm sido relatados por suas propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmaus*. Além disso, a importância econômica da família Verbenaceae pode ser atribuída ao largo uso das espécies, como frutíferas e ornamentais (MONTIEL et al., 2007; STASHENKO, 2010).

Em relação a sua caracterização botânica, a família pode ser identificada por um conjunto de atributos, dentre eles as inflorescências racemosas, flores zigomorfas, pentâmeras, gamopétalas, monoclinas; corola hipocrateriforme ou infundibuliforme, com lobos curtos; androceu geralmente com 4 estames didínamos; ovário súpero, com 1 ou 2 óvulos por lóculo, fruto do tipo drupa ou esquizocarpo seco ou carnoso. As anteras se posicionam ao redor do estigma, reduzindo a luz corolína e fazendo com que os grãos de pólen sejam aderidos às peças bucais do visitante floral quando este retira o néctar da flor (VENÂNCIO, 2010).

O gênero *Lippia* caracteriza-se por ser o segundo maior da família Verbenaceae e contém cerca de 200 espécies, entre herbáceas e arbustivas, distribuídas nas Américas Central

e do Sul, além de África tropical. Estas espécies têm seu valor econômico atribuído ao seu uso como fonte de óleos essenciais e extratos possuindo uma variedade de propriedades, tais como antibacteriana, antifúngica, larvicida, atividade inseticida, dentre outras (BARRETO et al., 2014; SARTORATTO et al., 2004; STASHENKO et al., 2013).

Um dos principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* está localizado em território brasileiro, na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Em torno de 120 espécies de *Lippia* encontram-se no Brasil, distribuídas pelo cerrado e caatinga, dois dos importantes biomas brasileiros, onde se destacam por sua floração chamativa e por seu aroma forte e geralmente agradável (GOMES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013).

Inúmeras espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina tradicional direcionadas ao tratamento de diversas patologias. Considerando-se a região nordeste do Brasil, as espécies desse gênero são popularmente utilizadas, para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse. As folhas ou partes aéreas e as flores são partes das plantas usadas em muitos casos, na forma de infusão ou decocto, administradas oralmente ou através de emplastos (OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001).

Em virtude do amplo uso popular, diversas espécies vêm sendo investigadas do ponto de vista farmacológico, revelando propriedades distintas e relevantes, tais como ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória, antipirética, antisséptica, cicatrizante, antimalárica, hipotensora, no combate à sarna e tratamento da tosse e bronquite (GOMES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001).

As atividades farmacológicas apresentadas pelas espécies do gênero *Lippia*, podem ser relacionadas à diversidade de metabólitos secundários produzidos, especialmente à presença de monoterpenos característicos deste gênero, tais como citral, limoneno, citroneol, alfa e beta pineno, etileugenol, linalol, entre outros presentes nos óleos essenciais (GOMES et al., 2011; SOUSA, 2012; SOUZA et al., 2010). Embora sejam evidenciados principalmente os constituintes voláteis, outras substâncias como flavonóides, iridóides e naftoquinonas também são citadas com frequência (GOMES et al., 2011).

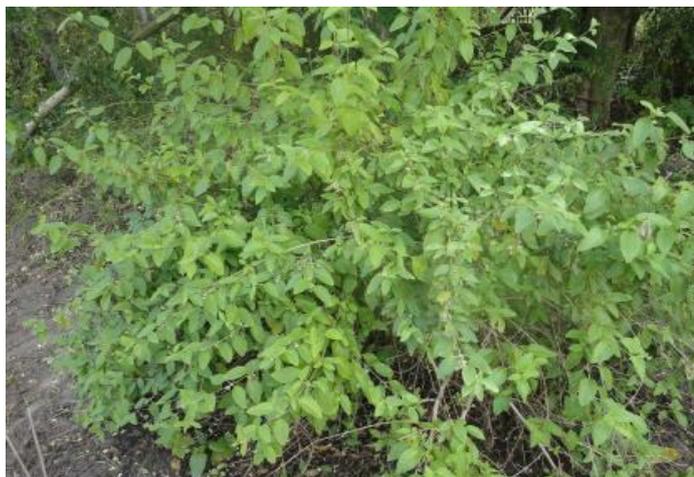
No gênero *Lippia*, já foram identificados aproximadamente 56 flavonóides, sendo eles tanto derivados de flavona como de flavanona (GOMES, 2009; SOUSA, 2012). Como supracitado, a indústria alimentícia também pode beneficiar-se de características apresentadas por espécies da família Verbenaceae. Neste aspecto, ressalta-se a importância de *Lippia dulcis* Trevir., cujo principal componente das folhas e flores é a (+)- hernandulcina, uma molécula 1.000 vezes mais doce que a sacarose (PASCUAL et al, 2001).

3.4 *Lippia origanoides* H.B.K.

Lippia. origanoides H.B.K. é um arbusto aromático que chega a atingir até 3 m de altura (**figura 1**), nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e Antilhas.

Na Colômbia é conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida pela população como “Alecrim-do-campo” e nesta região a espécie é dispersa, já tendo sido encontrada, por exemplo, nos municípios de Cabeceiras, Campo Maior e José de Freitas (BARRETO et al., 2014; SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al, 2010; VICUÑA et al., 2010).

Figura 1 – *Lippia origanoides* H.B.K.



Fonte: SOUSA, 2012.

A abordagem pioneira sobre a *L. origanoides* H.B.K foi realizada por Moraes et al. (1972), onde relata-se que a semelhança olfativa com o orégano se tornou tão sugestiva que inspirou este nome aos botânicos Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K).

Na oportunidade de uma viagem feita à Amazônia, os Drs. Samuel Ribeiro dos Santos e Alcides d’Andrea Pinto adquiriram no Mercado do Ver-o-Peso, Belém (Pará) uma erva vendida sob o nome de “alecrim d’Angola”, muito utilizada como tempero na culinária local. 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)”, uma espécie da flora amazônica.

Este arbusto tem folhas opostas simples (**figura 2**), de tamanhos variados, devido a possíveis adaptações morfológicas e fisiológicas em resposta a exposição à luz. Apresenta inflorescências caracterizadas por flores brancas (**figura 2**), pequenas e pediculadas (em média 4 mm de tamanho) e um alto rendimento de frutos secos e sementes por planta. *L. origanoides* tem um odor pungente, semelhante ao orégano, devido à presença de metabolitos secundários, tais como o carvacrol, timol e *p*-cimeno, dentre outros compostos fenólicos responsáveis pelo aroma e sabor particulares deste condimento. A atração de agentes polinizadores pode ser atribuída também à presença de tais compostos odoríferos (SUÁREZ et al., 2008; VEGAVELA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2012).

Figura 2 – Folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* H.B.K.



Fonte: SOUSA, 2012.

Na medicina tradicional, folhas ou partes aéreas da espécie são utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, além de ser também utilizada para alívio de cólicas uterinas, doenças vaginais, desordens menstruais, febre e como antisséptico geral para infecções de boca, garganta, vagina e para a limpeza de feridas (OLIVEIRA et al., 2014; VICUÑA et al., 2010).

Assim como outras espécies de *Lippia*, a *L. origanoides* tem sido utilizada também no reflorestamento de áreas mineradas. Na Venezuela esta espécie foi pioneira em regiões de minério de ferro que foram desativadas ou abandonadas (GOMES et al., 2011).

3.5 Estudos de toxicidade

A toxicidade de uma substância em relação a um organismo vivo pode ser compreendida como a capacidade desta em promover danos graves ou morte, havendo uma relação entre

concentração e tempo de exposição quando da ocorrência de tais danos (BARROS; DAVINO, 2003).

Dentro desse contexto, deve-se considerar que plantas medicinais, em virtude da presença de xenobióticos, são compostas de substâncias que podem desencadear reações adversas ao organismo, sendo necessário enfrentar a falsa ideia de que os fitoterápicos, por terem seus constituintes obtidos da natureza, possuem uma naturalidade inócua, ou seja, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos. Desta forma, para que os recursos originados da medicina popular possam ser adequadamente incorporados à medicina científica, torna-se imprescindível a avaliação de eficácia e segurança destes produtos, através dos estudos de toxicidade aguda ou crônica (MADALOSSO, 2011; MELLO et al., 2007; SILVA, 2007).

De acordo com 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. Neste documento, constam, dentre outros, os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração), que devem ser efetuados quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos (BRASIL, 2010).

Além disso, a Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF da ANVISA, publicou em 2013 o GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS, onde este guia disponibiliza uma orientação para a condução de estudos pré-clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos e sua elaboração se baseou em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMA), e de instituições internacionais de interesse na área (ICH, OECD, NCI, WHO). De acordo com este guia, estudos de toxicidade de dose única (aguda) se caracterizam por 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.

Dentre os métodos atualmente aceitos para o estudo de toxicidade aguda oral frequentemente adotado encontra-se o Guia 423 da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), onde realizam-se etapas sequenciais de teste e prioriza-se a utilização de pequena quantidade de animais (apenas 3 por etapa), sendo animais do mesmo sexo e usualmente do sexo feminino. São preestabelecidas no máximo cinco doses diferentes a serem utilizadas (5, 50, 300 ou 2000 mg/kg, além da dose de 5000 mg/kg, quando justificada por uma necessidade regulatória específica). O método não é direcionado inicialmente para o

cálculo específico da DL₅₀, embora permita determinar faixas de exposição em que se esperaria a letalidade, uma vez que a proporção de animais mortos continua sendo o alvo final desse teste (MADALOSSO, 2011; OECD, 2001).

No ensaio de toxicidade aguda pelo método de classes, de acordo com o guia 423 da OECD, após a etapa inicial de teste da primeira dose administrada, a ausência ou presença de mortalidade dos animais relacionada à substância em teste, irá determinar a próxima etapa do ensaio, que pode ser não necessitar de mais testes ou administrar a mesma dose a três animais adicionais ou administrar a próxima dose maior ou a próxima dose menor a três animais adicionais.

A dose inicial de escolha para o teste pode ser de 2000 mg/Kg quando as informações disponíveis sobre a substância em estudo apontarem que a mortalidade é improvável na maior dose inicial. Quando não existirem informações sobre a toxicidade da substância em questão recomenda-se a dose inicial de 300 mg/kg.

De acordo com a proporção de mortalidade apresentada nas etapas sequenciais do ensaio, pode-se estimar uma DL₅₀ de acordo com os padrões estabelecidos pela GHS (Globally Harmonized System) (OECD, 2001).

3.6 Estresse oxidativo

Os radicais livres constituem-se de espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados (FREEMAN; KELLER, 2012). Estes radicais são produzidos continuamente durante variados processos metabólicos, atuando como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo, tais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (ALVES et al., 2010).

O estresse oxidativo se caracteriza por um desequilíbrio entre o sistema de geração de radicais livres, incluindo espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), e a eficiência do sistema de defesa antioxidante, uma vez que a sua produção em excesso resulta em efeitos prejudiciais ao organismo favorecendo alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, dentre elas neoplasias, envelhecimento, doenças hepáticas, doenças no trato respiratório, disfunções cognitivas, doenças degenerativas e neurológicas (**figura 3**) (LUCENA, 2010; LEITE et al., 2012).

Há diversos sistemas não enzimáticos que agem por meio da inativação das reações induzidas por radicais livres, tais como os antioxidantes naturais, porém na maioria das vezes

estes não são suficientes (ALCANTARA et al., 2010). Por este motivo, a busca por moléculas antioxidantes, especialmente derivados de produtos naturais e sintéticos, vem aumentando de forma significativa (ALAM et al., 2012).

Figura 3 - Desequilíbrio entre agentes oxidantes e defesa antioxidante.



Fonte: Adaptação de LUCENA, 2010.

Diversos estudos apresentam o envolvimento do estresse oxidativo em inúmeras doenças (AVERY, 2011). Com relação ao sistema nervoso central (SNC), os radicais livres de forma facilitada se espalham pelas membranas causando a propagação desses radicais, se constituindo em um dos mecanismos fisiopatológicos que atua nas doenças neurodegenerativas, desta forma, o desenvolvimento de fitofármacos com ação antioxidante tem sido importante (ALMEIDA et al., 2012).

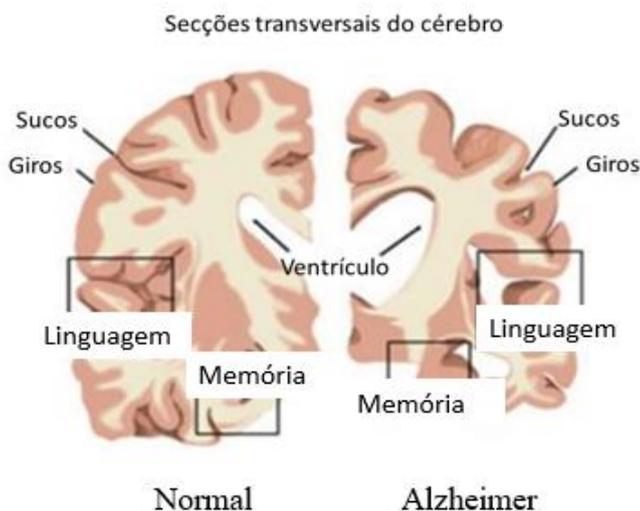
3.7 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) se caracteriza por ser uma desordem neurodegenerativa que afeta o cérebro nas áreas de memória e linguagem (**figura 4**), dotada de grande impacto sócio-econômico, responsável por 60% do número total de casos de demência dentre pessoas de 65 anos (VIEGAS et al., 2004). Dados epidemiológicos apontam que uma potencialidade considerável de aumento na incidência da doença nas próximas duas décadas inclui o aumento mundial na expectativa de vida (JOHNSON et al., 2000).

O processo degenerativo progressivo das funções psicomotoras e cognitivas, descrito no início pelo patologista alemão Alois Alzheimer em 1907, dura cerca de 8 a 10 anos, desde o

aparecimento dos primeiros sintomas clínicos até a morte. Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65 a 69 anos, 21% entre 85 a 86 anos e 39% acima de 90 anos, acometendo cerca de 15 milhões de pessoas em todo o mundo. Dentre as regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, encontram-se o córtex frontal e hipocampo, estruturas mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes de DA (VIEGAS et al., 2004).

Figura 4 – Comparação entre o cérebro normal e o de portador de Alzheimer.



Fonte: VIEGAS et al., 2004

Dentre as causas mais evidentes da gênese da DA estão à ocorrência de deposição extracelular de peptídeo β -amilóide (derivado do precursor amilóide de proteína – APP) em plaquetas senis e a formação errática de neurofibrilas intracelulares, originando emaranhados neurofibrilares intraneurais. Esses emaranhados neurofibrilares apresentam uma forma anormal, hiperfosforilada, de uma proteína associada aos microtúbulos, à proteína TAU (VIEGAS et al., 2004).

A nível celular, a DA se associa com déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, dentre eles a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. A morte de neurônios colinérgicos leva a redução de 80 a 90% da produção de colina-acetil-transferase no hipocampo e córtex temporal e entre 40 e 70% nos córtex parietal e frontal (DAVIES, 1978; GUELA; MESULAM, 1994). Existe uma clara diminuição dos receptores muscarínicos e nicotínicos em portadores da doença de Alzheimer, especialmente nos terminais colinérgicos pré-sinápticos (DELUCIA; OLIVEIRA-FILHO, 2004; WARPMAN et al., 1993).

Geralmente, o primeiro aspecto clínico observado é a deficiência da memória recente, enquanto as lembranças remotas permanecem preservadas até um certo estágio da doença. Além das dificuldades de atenção e fluência verbal, dentre outras, as funções cognitivas deterioram à medida que a patologia evolui, entre elas a capacidade de fazer cálculos, as

habilidades visuo-espaciais e as de uso de objetos comuns e ferramentas. O grau de vigília e a lucidez do paciente não são afetados até a doença estar em estado bem avançado. A fraqueza motora também não é observada, embora as contraturas musculares sejam uma característica de caráter quase que universal nos estágios avançados da patologia (LINDEBOOM; WEINSTEIN, 2004).

O tratamento sintomático da DA, a princípio, gira em torno da restauração da função colinérgica. O fundamento da Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer sugere que a degeneração dos neurônios colinérgicos dos núcleos basais do prosencéfalo associada à perda de neurotransmissão colinérgica no córtex cerebral e em outras áreas promove a deterioração das funções cognitivas observadas em pacientes com DA. Acredita-se, portanto, que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar um dos sinais da doença, a deficiência de aprendizagem (FRANCIS et al., 1999; TREVISAN et al., 2003).

Várias abordagens terapêuticas foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos objetivando otimizar o funcionamento do sistema colinérgico dos portadores de DA. A estratégia que se mostrou mais eficaz até o momento se constitui na utilização de substâncias inibidoras da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor colinérgico acetilcolina (ALMEIDA, 1998). Estas substâncias sensibilizam tanto as sinapses colinérgicas periféricas quanto as centrais e agem na estabilidade das funções cognitivas em um período de cerca de um ano em aproximadamente 50% dos pacientes. Em alguns pacientes, cerca de 20%, esta estabilidade cognitiva pode se manter por um período maior que 24 meses (GIACOBINI, 2003).

Muitos esforços têm sido realizados para a compreensão e tratamento da doença de Alzheimer; entretanto, a terapia utilizada atualmente está longe de ser satisfatória. De fato, embora o tratamento realizado por meio da utilização de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) tenha consistentemente demonstrado eficácia sintomática e uma redução na progressão da patologia, esses medicamentos produzem algum tipo de melhora em aproximadamente 30 a 40% dos pacientes portadores da doença de Alzheimer leve a moderada (KIHARA et al. 2004).

A rivastigmina, atualmente, é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, em virtude de ser capaz de inibir tanto a enzima acetilcolinesterase quanto a butirilcolinesterase, apresentando, desta forma, uma maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de acetilcolina. Entretanto, esse medicamento ocasiona vários efeitos colinérgicos adversos quando a dose é elevada de forma abrupta. Além de que esse

medicamento apresenta efeitos adversos gastrointestinais com associação ao aumento de peso (GROSSBERG, 2003).

REFERÊNCIAS

ALAM, S.; PANDA, J.J.; CHAUHAN, V.S. Novel dipeptide nanoparticles for effective curcumin delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4207- 4222, 2012.

ALCANTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Composição química de óleos essenciais de espécies de Aniba e Licaria e suas atividades antioxidante e antiagreganteplaquetária. **Química Nova**, v.33, p. 141-145, 2010.

ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2013.

ALMEIDA, O.P. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, p. 688-696, 1998.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

AVERY, S.V. Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 434, p. 201-210, 2011.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 7, 2014.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BASER, K.H.C. Biological and pharmacological activities of Carvacrol and Carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.

BONZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOZA, G. E. Estudio anatómico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. In: Anales del Instituto de Biología, **Universidad Nacional Autónoma de México**, Serie Bot 74, p. 31-45, 2003.

BOUDJELAL, A.; HENCHIRI, C.; SARI, M.; SARRI, D.; HENDEL, N.; BENKHALED, A.; RUBERTO, G. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, p. 395-402, 2013.

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.

BRITO, M.B.; BARIN, G.B.; ARAUJO, A.A.S.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; LIRA, A.A.M. e NUNES, R.S. The action modes of Lippia sidoides (Cham) essential oil as penetration enhancers on snake skin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 1, p. 323-327, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R.S.; POPIOLSKI, A.S.; MOSSI, A.J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M.R.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; VLADIMIR, J, OLIVEIRA. R.L. Application of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R. L.M.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and Antinociceptive effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1-8, 2011.

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R. L.M.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and Antinociceptive effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1-8, 2011.

CARDOSO LOPES, E.M.; CARREIRA, R.C.; AGRIPINO, D.G.; TORRES, L.M.B.; CORDEIRO, I.; BOLZANI, V.S.; DIETRICH, S.M.C.; YOUNG, M.C.M. Screening for 31 antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 655-660, 2008.

CARVALHO-FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 24-30, 2006.

CHENG, J.T. YEH, C.H.; WANG, H.E.; Application of bioassay in the safety and/or quality control of herbal products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 4, p. 372-376, 2007.

CORP, N.; PENDRY, B. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, p. 157-170, 2013.

COSTA, J.P.; OLIVEIRA G.A.L.; ALMEIDA, A.A.C.; ISLAMA, M, T.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain research**, v.1547, p. 34 – 42, 2013.

CRISTIANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G. MICIELI, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300–6308, 2007.

DAVIES, P. Studies on the neurochemistry of central cholinergic systems in Alzheimer's disease, in *Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders*. In: R. Katzmana, R.D. Terry, K.L. Bick (eds.). **Raven Press**, New York, p. 453–459, 1978.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA FILHO, R.M. **Farmacologia Integrada**. 2º ed. Revinter, São Paulo, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília: Editora Terra Viva, 256 p, 1994.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. SUPPLEMENT 1, p. 69-75, 2001.

FASSBENDER, K.; SIMONS, M.; BERGMANN, C.; STROICK, M.; LUTJOHANN, D.; KELLER, P. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid

peptides abeta 42 and abeta 40 in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5856-5861, 2001.

FERRARINI, S.R.; GRAEBIN, C.S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R.F.S.; DIAS, D.O.; ROSA, R.G.; MADEIRA, M.D.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis of limonene beta-amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 773-777, 2008.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer Disease: A Review of Progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FREEMAN, L.R.; KELLER, J.N. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 5, p. 822-829, 2012.

GIACOBINI, E. Cholinergic inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmaceutical Research**, v. 50, p. 433-440, 2003.

GOMES, S. V. F. **Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer**. 2009. 163 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Sergipe. Sergipe, 2009.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**, v. 64, n. 4, p. 216-235, 2003.

GUELA, C.; MESULAM, M.M. Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease*. In: R.D. Terry, R. Katzman, K.L. Bick (eds.). **Raven Press**, New York, p. 263-291. 1994.

JANUS, C.; WESTAWAY, D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 5, p. 873-86, 2001.

JOHNSON, N.; DAVIS, T.; BOSANQUET, N. The epidemic of Alzheimer's disease; how can we manage the costs? **Pharmacoeconomics**, v. 18, p. 215-223, 2000.

KAMBOJ, V.P. Herbal medicine. **Current Science**, v. 78, p. 35-39, 2000.

KELLER, K.; KNÖSS, W.; REH, K.; SCHNÄDELBACH, D. Phytopharmaka. Begriffsbestimmungen und Hintergründe. In: **Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz**, v. 46, p 1036–1039, 2003.

KIHARA, T.; SAWADA, H.; NAKAMIZO, T.; KANKI, R.; YAMASHITA, H.; MAELICKE, A. Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks abeta-enhanced glutamate toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 3, p. 976-982, 2004.

LEITE, L.E.A.; RESENDE, T.L.; NOGUEIRA, G.M.; CRUZ, I.B.M.; SCHNEIDER, R.H.; GOTTLIEB, M.G.V. Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.15, p. 365-380, 2012.

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 3, p. 83-86, 2004.

LUCENA, C.F. Antioxidantes em exercícios aeróbios em exercícios aeróbi em exercícios aeróbios: papel do os: papel do selênio e glutathione peroxidase. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 9, p.54-61, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 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.

MELLO, F. B.; LANGELOH, A.; MELLO, J. R. B. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifolia*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 230-237, 2007.

MELO, M. S.; SENA, L. C. S.; BARRETO, F.J.N.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, vol. 48, p. 411–416, 2010.

MONTIEL, J.; ARANGO, A. C. M.; DÚRAN, C.; BUENO, J. G.; GALVIS, L. B.; STASHENKO, E. Evaluación de la actividad anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown quimiotipo carvonalimoneno y su asociación com sus componentes mayoritarios. **Scientia Et Technica**, v. 13, n. 33, p. 243-246, 2007.

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.

MUJHERJEE, P.K. **Quality control of herbal drugs**, 1st ed. New Delhi: Business Horizons Pharmaceutical Publications; 2008.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: Head of Publications Service, 2001.

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 organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

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

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

RAMIREZ-DURON, R.; CENICEROS-ALMAGUER, L.; SALAZAR-ARANDA R; SALAZAR-CAVAZOS, M.L, WAKSMAN, T.N. Evaluation of thin-layer chromatography methods for quality control of commercial products containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Passiflora incarnata*, and *Tilia occidentalis*. **Journal of Aoac International**; v. 90, n. 4, p. 920-924, 2007.

RAO, M.R.; PALADA, M.C.; BECKER, B.N. Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. **Agroforestry Systems**, v. 61, n. 1, p. 107-122. 2004.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SENA, J.G.; XAVIER, H.S.; BARBOSA FILHO J.M.; DUR.;INGER, J.M. A Chemical Marker Proposal for the Lantana genus: Composition of the Essential Oils from the Leaves of Lantana radula and L. canescens. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 4, p. 635-640, 2010.

SILVA, F.; PARK, K.J.; MAGALHÃES, P.M.; MARTINS, G.N.;GAMA, E. V.S. Avaliação do teor de óleo essencial de Baccharis trimera (Less.) DC. em diferentes embalagens durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p.54-58, 2013.

SILVA, F.O.; CERQUEIRA, G.S.; SABINO, E.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Central nervous system effects of Iso-6-spectaline isolated from Senna spectabilis var. excelsa (schrad) in mice. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, p. 232-236, 2011.

SILVA, J. G. **Avaliação do potencial farmacológico de Kalanchoe brasiliensis Cambess.** 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, N.C.C; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 402-413, 2010.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Florianópolis: UFRGS Editora. p. 230-239. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, cap.18, p. 467-495, 2004.

SINGH, S.K.; JHA, S.K.; CHAUDHARY, A.; YADAVA, R.D.S; RAI, S.B. Quality control of herbal medicines by using spectroscopic techniques and multivariate statistical analysis. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 134-141. 2010.

SIVIERO, A.; DELUNARDO, T. A.; HAVERROTH, M.; OLIVEIRA, L. C.; MENDONÇA, A. M. S. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 598-610, 2012.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUSA, F.C.F., MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTENELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

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, M. F.; SOUZA JUNIOR, I. T; GOMES, P. A.; FERNANDES, L. A.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A.; SAMPAIO, R. A. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 401-405, 2010.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 192-202, 2013.

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

SUÁREZ, A. G.; CASTILLO, G.; CHACÓN, M. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub *Lippia origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetics Research Cambridge**, v. 90, p.455-465, 2008.

SUBHAN, N. Bioactivity of *Excoecaria agallocha*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 521-526, 2008.

TATSADJIEU, L.N.; NGASSOUM, M.B.; NUKENINE, E.N.; MBAWALA, A.; YAOUBA, A. Antifungal and anti-insect activities of three essential oils on *Aspergillus flavus* link and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1291-1294, 2007.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, IN K.; VERPOORTE, R. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.

VEGA-VELA, N. E. e CHACÓN-SÁNCHEZ, M. A. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 11, p. 2669–2681, 2012.

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. A. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v 31, n. 1, p. 7-17, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENÂNCIO, D. F. A. **Entomofauna visitante das flores de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Lamiales, Verbenaceae) em Juiz de Fora**. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

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

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.B.; BAREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, no. 6, p. 1463-1471, 2007.

VITTI, A.M.S.; BRITO, O.J. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ 2003.26p. (Documentos Florestais).

WARPMAN, U.; ALAFUZO, V.I.; NORDBERG, A. Coupling of muscarinic receptors to GTP proteins in postmortem human brain: alterations in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 150, p. 39-43, 1993.

YEH, C.H.; WANG, H.E.; CHENG, J.T. Application of bioassay in the safety and/or quality control of herbal products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 4, p. 372-376, 2007.

ZHAO, Q.; TANG, X.C. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, n. 3, p. 101-107, 2002.

Lippia origanoides H.B.K: uma prospecção científica e tecnológica

***Lippia origanoides* H.B.K: uma prospecção científica e tecnológica**

RODRIGUES, AMX^{1,3}; SANTOS, BNG²; CARVALHO, MGF¹; FREITAS, RM^{1,3}; SOUSA, AAC⁴; SOUSA, TO⁴; CITÓ, AMGL^{1,4}

¹ Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³ Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

A considerável ausência de informações sistematizadas disponíveis na literatura e a ampla utilização da medicina popular, justificam a importância de uma prospecção sobre os aspectos agrônômicos, genéticos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos a respeito de *Lippia origanoides* H.B.K., além de que a pesquisa tecnológica é considerada como um agente propulsor do desenvolvimento de medicamentos com base em plantas medicinais, diante das descrições científicas sobre as atividades biológicas promissoras da espécie *L. origanoides*. Este estudo teve como objetivo averiguar o estado da arte, realizando uma prospecção científica e tecnológica da espécie *L. origanoides* H.B.K., levantando as produções científicas da última década, bem como seu desenvolvimento tecnológico a partir de pesquisa realizada em bases de dados eletrônicas científicas: *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com>), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) (<http://www.lilacs.bvsalud.org>), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) (<http://www.scielo.org>), *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line* (MedLine) (<http://www.bases.bireme.br>) e em outras relativas às patentes de invenção e modelos de utilidade: Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT) e *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) utilizando o nome científico da espécie, bem como de seus compostos como descritores para a busca. Apenas 21 artigos e 12 patentes foram encontradas e analisados na busca com o descritor *Lippia origanoides* H.B.K. A prospecção científica reflete as lacunas da análise tecnológica, apresentando o potencial farmacológico que vem sendo testado e atribuído a esta espécie, bem como de seus majoritários.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, patente, artigos.

ABSTRACT

A considerable absence of systematized information available in the literature and the wide use of folk medicine, justify the importance of prospecting on the agronomic aspects, genetic, phytochemicals, toxicological and pharmacological about *L. origanoides* H.B.K., and that technological research is considered as a propellant development of medicines based on medicinal plants. Faced with scientific descriptions of the promises of the biological activities of the species *L. origanoides* H.B.K., this study aimed to verify the state of the art, performing a scientific and technological exploration of the species *L. origanoides* HBK, raising the scientific productions of the last decade and as their technology development from research conducted in scientific electronic databases: Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>), Latin American and Caribbean Health Sciences (Lilacs) (<http://www.lilacs.bvsalud.org>) Scientific Electronic Library Online (SciELO) (<http://www.scielo.org>), Medical Literature Analysis and Retrieval System online (MedLine) (<http://www.bases.bireme.br>) and other relating to patents and utility models: National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI), European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO) Patent Latin America and Spain (LATIPAT) and United States Patent and Trademark Office (USPTO) using the scientific name of the species, as well your majorities as descriptors for the search. Only 21 articles and 12 patents were found and analyzed in the search with the descriptor *Lippia origanoides* H.B.K. The scientific survey reflects the gaps in technological analysis, presenting the pharmacological potential that has been tested and assigned to this species, as well as their majority.

Keywords: *Lippia origanoides*, patente, articles.

INTRODUÇÃO

O uso medicinal das plantas e suas preparações têm sido repassados por séculos, e ainda é a forma mais comum de medicamento tradicional em todo o mundo. As plantas medicinais são parte integrante dos sistemas tradicionais de medicamentos. Os primeiros registros sugerem que os medicamentos à base de ervas têm sido utilizados e documentados em sistemas medicinais na Índia, Roma, China, Egito e Grécia há aproximadamente 5000 anos. O uso tradicional de ervas medicinais tem sido praticado desde os tempos antigos em Países da América e da Arábia e Japão (KELLER et al., 2003; MUJHERJEE, 2008).

Pesquisas científicas envolvendo a composição química, botânica e atividade farmacológica de plantas medicinais tornaram-se relevante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. Um dos maiores e mais importantes fatores para esse interesse em novos compostos com propriedades farmacológicas é a enorme diversidade de constituintes químicos que podem ser selecionados, devido à complexidade da constituição química de plantas medicinais (BADKE et al., 2012).

O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, representando mais de 20% do número total de espécies conhecidas. Apresenta a flora mais diversificada, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total global. Essa biodiversidade é seguida por uma ampla aceitação da utilização das plantas medicinais. A maioria da população brasileira, aproximadamente 80% consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis comercialmente e dependem quase exclusivamente de medicamentos de origem natural. Numerosos estudos sobre a farmacologia de plantas medicinais têm sido realizados, uma vez que constituem uma fonte potencial para a produção de novos medicamentos (SILVA; FERNANDES JUNIOR, 2010).

A família Verbenaceae reúne cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, incluindo o gênero *Lippia*, que possui cerca de 200 espécies, sendo a espécie *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK) utilizada pela medicina tradicional principalmente para tratar problemas respiratórios, gastrointestinais e de pele, além de apresentarem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antimaláricas e antiúlcera (VICUÑA et al., 2010).

A pesquisa tecnológica é considerada como um agente propulsor do desenvolvimento de medicamentos com base em plantas medicinais, gerando tecnologias inovadoras para o desenvolvimento do setor no Brasil. A ampla utilização de *L. origanoides* na medicina popular e a considerável ausência de informações sistematizadas disponíveis na literatura justificam a

importância de uma prospecção sobre os aspectos agronômicos, genéticos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos realizados com *Lippia origanoides*, além de que a pesquisa tecnológica é considerada como um agente propulsor do desenvolvimento de medicamentos com base em plantas medicinais, gerando tecnologias inovadoras para o desenvolvimento do setor brasileiro.

Diante das descrições científicas sobre as potencialidades das atividades biológicas da espécie *L. origanoides* H.B.K., este estudo teve como objetivo averiguar o estado da arte, realizando uma prospecção científica e tecnológica da espécie *L. origanoides* H.B.K., levantando as produções científicas da última década, bem como seu desenvolvimento tecnológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

As prospecções científicas e tecnológicas foram desenvolvidas com busca nos bancos de dados eletrônicos sobre as publicações que envolvem a espécie *L. origanoides* H.B.K. nos últimos quinze anos (2001 a 2015). Esta avaliação foi realizada por meio de uma pesquisa bibliográfica abrangente e sistemática em artigos científicos e patentes.

Os artigos foram pesquisados em banco de dados: *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com>), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) (<http://www.lilacs.bvsalud.org>), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) (<http://www.scielo.org>), *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line* (MedLine) (<http://www.bases.bireme.br>). Foram incluídos para análise neste estudo todos os artigos científicos publicados no período delimitado e indexados em algum destes bancos de dados que versavam em seu conteúdo sobre a *L. origanoides* H.B.K.

Foram utilizados, para a realização da prospecção científica, os seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa, inglesa ou espanhola: "*Lippia origanoides* H.B.K.", "*L. origanoides* H.B.K", "estudos agronômicos", "estudos químicos", "estudos genéticos", "estudos toxicológicos" e "atividades farmacológicas".

Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos completos originais e de revisão publicados em português, inglês ou espanhol; artigos na íntegra que retratassem a temática referente à revisão integrativa e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados.

Os critérios de exclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em outros idiomas; artigos repetidos nas bases de dados, não disponíveis e sem resumo que retratassem a temática referente à revisão de integrativa. Para o estudo foram lidos apenas os artigos selecionados para a elaboração do manuscrito.

Em seguida a busca de patentes foi realizada na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT) e *United States Patent and Trademark Office* (USPTO). Foram incluídos neste estudo as patentes que mencionassem a espécie no resumo e/ou no título, independente do tempo transcorrido desde o depósito, considerando todos os pedidos de patente depositados até o presente momento.

Para a realização da prospecção tecnológica os termos utilizados foram *Lippia origanoides* H.B.K. e *Lippia origanoides*. Um fluxograma mostrando as etapas da realização desta pesquisa está demonstrado na **figura 1**.

Figura 1 - Esquema da prospecção científica e tecnológica nas bases de dados eletrônicas.



Fonte: Autoria própria (2015)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão científica e a prospecção tecnológica geralmente são usadas como instrumento na mensuração e processo avaliativo do desenvolvimento técnico, científico e socioeconômico de um determinado país (OLIVEIRA JÚNIOR; ALMEIDA, 2012).

Reportando-se ao Brasil, o estudo se fundamenta como base sustentadora para construção de novas diretrizes com vistas à pesquisa científica e delineamento industrial sobre os produtos naturais (MONTECCHI et al., 2013).

Apesar da importância e recentes descrições de atividade farmacológica atribuída à *L. origanoides* H.B.K., é notória a baixa exploração, especialmente tecnológica desta espécie.

Resultados referentes a prospecção científica

A estratégia de pesquisa identificou 99 publicações, 34 provenientes da base de dados Scielo, 16 da base de dados Lilacs, 16 da base de dados MedLine e 33 da base de dados Science direct. Quarenta e quatro artigos foram excluídos por análise do título e palavras-chave que não continham a combinação dos descritores cinquenta e cinco artigos foram avaliados. Destes, 21 artigos foram selecionados e analisados por completo. Os passos detalhados desta pesquisa estão apresentados na **figura 2**.

Figura 2 - Fluxograma da avaliação, exclusão e análise das publicações a respeito da espécie *Lippia origanoides* H.B.K.



Fonte: Autoria própria (2015)

Aspectos agronômicos, botânicos e genéticos da L. origanoides

Lippia origanoides Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK) é um arbusto aromático que chega a atingir até 3 m de altura, nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e Antilhas. Na Colômbia é conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida como “Alecrim-do-campo”, sendo amplamente dispersa na região (STASHENKO et al., 2010).

O gênero *Lippia* possui cerca de 200 espécies, distribuídas nas Américas do Sul e Central e na África tropical. No Brasil, a ocorrência destas espécies é de 70 a 75% (PASCUAL et al., 2001)

Esta espécie é pertencente à família Verbenaceae, que reúne cerca de 175 gêneros e 2800 espécies distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas do Hemisfério Norte. É uma espécie dominante em ambientes desfavoráveis, especialmente zonas semiáridas caracterizadas por solos secos, pobres em nutrientes e com alta incidência luminosa (VICUÑA et al., 2010; PASCUAL et al., 2001; ARANGO et al., 2012).

A elucidação dos constituintes ativos presentes nas plantas, suas propriedades farmacológicas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (KELLER et al., 2003; VEGA-VELA et al., 2013).

Estudos fitoquímicos da L. origanoides

Variados estudos demonstram uma diferença na composição química do óleo da *L. origanoides*. Os compostos carvacrol e timol foram identificados como majoritários no óleo essencial de *L. origanoides*, além de outros monoterpenos (α -terpineno, γ -terpineno, 1,8-cineole, *p*-cymene) e sesquiterpenos (β -caryophyllene) (PASCUAL et al., 2001).

Em virtude disto, cromatografia gasosa (GC / FID, GC / MS) e análise estatística (PCA) do óleo essencial de cerca de dez espécimes de *L. origanoides* foi usada para classificar esta espécie em três diferentes quimiotipos (rico em *p*-cimeno quimiotipo A, rico em carvacrol quimiotipo B e

rico em timol quimiotipo C), de acordo com os principais constituintes do óleo (SILVA; FERNANDES JUNIOR, 2010; STASHENKO et al., 2010).

O óleo de quimiotipo A apresentou um aroma cítrico com a predominância de p-cimeno (12%), (E)-cariofileno (9%), α -felandreno (8%), β -felandreno (6%), limoneno (5%), α -humuleno (5%) e 1,8-cineol (4%). O óleo de quimiotipo B apresenta odor de orégano e o constituinte dominante é o carvacrol (40%), p-cimeno (13%), γ -terpineno (cerca de 11%) e timol (11%), característica semelhante encontrada nos óleos de amostras existentes no Pará, Brasil. O óleo de quimiotipo C também tem aroma de orégano, mas o constituinte majoritário é o timol (56%), seguido por p-cimeno (9%) e γ -terpineno (cerca de 5%), por conseguinte, com um perfil similar ao observado em Mérida, Venezuela (RIBEIRO et al., 2014; ZAPATA et al., 2009).

Foi relatado um novo quimiotipo de *L. origanoides*, caracterizado por um óleo essencial rico em (E)-cinamato de metilo e (E)-nerolidol, com odor de frutas (reminiscência de canela, morango e madeira). Este novo quimiotipo pode ter importância ecológica, quimiosistemática e importância taxonômica na gestão e utilização econômica da espécie (RIBEIRO et al., 2014).

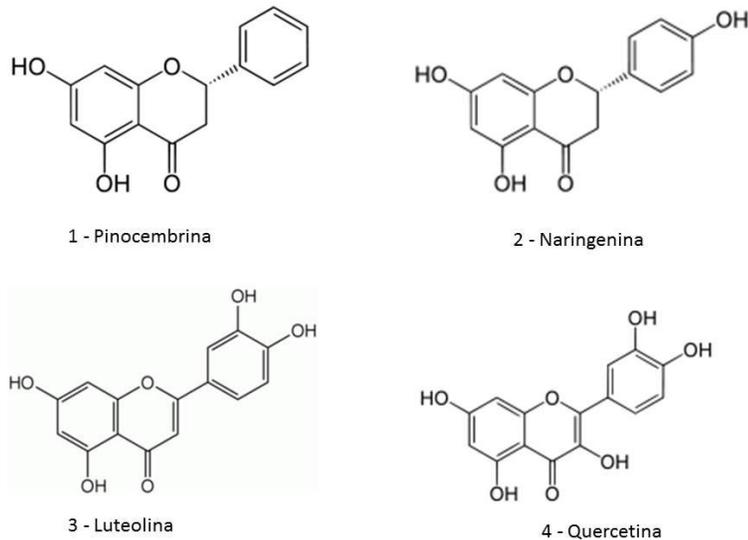
Adicionalmente, os extratos a partir destes quimiotipos de *L. origanoides* apresentaram diferentes perfis de flavonoides por análise de cromatografia gasosa (CG), Pinocembrina (5,7-dihydroxyflavanona) (1), naringenina (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one) (2) e luteolina (2-(3,4-dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4-chromenone) (3) foram identificados em todos os quimiotipos, mas com rendimento variado, enquanto a quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona) (4) estava presente apenas em dois destes quimiotipos. A **figura 3** apresenta a estrutura destes flavonoides (OLIVEIRA et al., 2013).

Embora a maioria dos estudos sobre a composição química de espécies de *Lippia* esteja relacionada ao seu óleo essencial, compostos não-voláteis de diferentes classes também foram identificados neste gênero. Os mais frequentemente relatados são flavonóides, iridóides e naftoquinonas. De acordo com Gomes e colaboradores (2011), cerca de 56 flavonóides foram isolados a partir de espécies de *Lippia*.

Estudos sazonais e circadianos demonstraram que na estação chuvosa os monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados foram as mais altamente representados nos óleos, seguidos pelos hidrocarbonetos sesquiterpenos e hidrocarbonetos monoterpenos. Na estação seca, houve uma predominância dos hidrocarbonetos monoterpenos e monoterpenos oxigenados,

seguido dos sesquiterpenos oxigenados e os sesquiterpenos (RIBEIRO et al., 2014; SARRAZIN et al., 2015a).

Figura 3 - Principais flavonoides encontrados em *L. organoides*.



Estudos farmacológicos da espécie *Lippia organoides* H.B.K.

Os estudos encontrados de maior relevância e que retratavam os aspectos farmacológicos já estudados com a utilização do óleo essencial de *L. organoides* H.B.K. encontram-se no **quadro 1** e serão discutidos posteriormente.

Quadro 1 - Principais atividades farmacológicas do óleo essencial da *L. organoides* H.B.K.

Majoritário (%)	Objetivo do estudo	Protocolo in vitro / Modelo Experimental	Dose / Concentração	Autores/Ano de publicação
<i>Carvacrol</i> 37,3% <i>Timol</i> 22,4% <i>γ-terpineno</i> 10,9%	Investigar a atividade do óleo contra formas epimastigota, tripomastigota e amastigotas de <i>T. cruzi</i> .	Cultura de células Vero infectadas pelo <i>T. cruzi</i>	15,6; 31,3; 62,3; 125 e 250 μM/mL	BORGES et al., 2012

Timol 45% <i>γ</i>-terpineno 13,5% <i>p</i>-cimeno 10%	Avaliar o crescimento micelial e formação de esclerótidos em <i>Sclerotium cepivorum</i>	Cultura de <i>S. cepivorum</i>	60, 120, 250, 650 e 1350 µL/L	OSPINA et al., 2011
Timol 54,5 % <i>p</i>-cimeno 10 % <i>γ</i>-terpineno 5%	Avaliar a possível atividade antifúngica	Espécie <i>Moniliophthora roreri</i> isolados a partir do cacau	25, 50, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL	LOZADA et al., 2012
Carvacrol 8,6% Timol 18,5% <i>p</i>-cimeno 0,3%	Avaliação da atividade antimicrobiana	Método de difusão com cepas <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>S. aureus</i> MRSA, <i>S. aureus</i> , <i>L. casei</i> e <i>S. mutans</i> .	10 µL/placa de petri	OLIVEIRA et al., 2007
Timol 34,5% Carvacrol 25,8% <i>p</i>-cimeno 9,3%	Avaliar o efeito protetor do óleo contra a genotoxicidade do DNA induzida por bleomicina.	Ensaio de genotoxicidade induzida por bleomicina com utilização de cepas de <i>E. coli</i> .	1,8; 3,7; 7,4; 14,8; 29,7; 59,3; 118,7; 237,5 e 475 mg/mL	VICUÑA et al., 2011
Óleo essencial de <i>L. organoides</i>	Avaliar o potencial antibacteriano e moduladora da resistência aos antibióticos	Método da microdiluição utilizando cepas de <i>S. aureus</i> MRSA.	128 µg/mL	BARRETO et al., 2014
Timol 56,3% <i>e</i>-cimeno 11,8% <i>γ</i>-terpineno 7,3%	Avaliar a capacidade antioxidante	Testes in vitro DPPH e ABTS	0,10; 3,05; 6,01 e 8,97 µg/mL	ARANGO et al., 2012
<i>p</i>-cimeno 15,7% Timol 53,6% Carvacrol 38,8%	Avaliar a atividade contra as formas livres e intracelulares de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Cultura de epimastogotas de <i>T. cruzi</i> e promastigotas de <i>L. chagasi</i>	100 µg/mL	ESCOBAR et al., 2010
Carvacrol 44% Timol 15% <i>γ</i>-terpineno 10%	Investigar o efeito inibitório na replicação do vírus da febre amarela.	Cultura de células infectadas pelo vírus	3,7; 11,1; 33,3 e 100 µg/mL	MENESES et al., 2009
Carvacrol 29% <i>o</i>-cimeno 25,57% Metil Timol Eter 11,5%	Avaliação da toxicidade aguda	Toxicidade aguda oral (dose fixas) - OECD 420	30, 60 e 120 mg/kg	ANDRADE et al., 2014
Carvacrol 47,2% Timol 12,8% <i>p</i>-cimeno 9,7%	Avaliar a capacidade antioxidante	Testes in vitro DPPH	5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL	SARRAZIN et al., 2015b
Carvacrol 47,2% Timol 12,8% <i>p</i>-cimeno 9,7%	Avaliação da toxicidade aguda	Determinação da dose letal DL ₅₀	3000 mg/Kg	SARRAZIN et al., 2015b

O óleo essencial da *L. origanoides* demonstrou ser mais efetivo contra formas tripomastigota e amastigota do *Trypanosoma cruzi*, não apresentando efeito citotóxico significativo, o que demonstra que esse óleo essencial é seletivo contra os parasitas. Podendo este óleo ser utilizado como agente quimioterapêutico potencial contra o *T. cruzi* (BORGES et al., 2012; ESCOBAR et al., 2010).

Os óleos essenciais de plantas consistem em uma mistura complexa de maioria monoterpenos e sesquiterpenos que se acumulam em folhas de algumas espécies principalmente para evitar o ataque de herbívoros e patógenos. Um estudo etnobotânico realizado na cidade de Oriximiná (Pará, Brasil), destacou o amplo uso desta planta como tempero, além de uma infusão de suas folhas e flores indicado para o tratamento da dor de barriga, cólica, indigestão, diarreia, azia, náuseas, flatulência, corrimentos vaginais, bem como um anti-séptico geral para a boca, garganta e feridas (TEZARA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007).

As partes aéreas desta espécie é comumente usada na preparação de comidas, estimulante do apetite, desordens gastrointestinais e doenças respiratórias (gripe, bronquite e asma) (PASCUAL et al., 2001).

Uma potente atividade antimicrobiana de *L. origanoides* foi relatada contra *Candida spp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*. Atividade esta atribuída de forma mais significativa para os compostos majoritários do óleo essencial, carvacrol e timol. Estes compostos também apresentam propriedades antioxidantes. Atribui-se também ao óleo essencial da *L. origanoides* atividade antibacteriana, moduladora da resistência aos antibióticos, antifúngica, antiviral e larvicida contra *Aedes aegypti* (BARRETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007; NAZIR et al., 2007; MENESES et al., 2009; LOZADA et al., 2012; SARRAZIN et al., 2015b).

Estudos apontam para o potencial uso de *L. origanoides* em algumas áreas da indústria, tais como alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, como fontes de novas especiarias, perfumes e medicamentos fitoterápicos (OSPINA et al., 2011). Outra atividade biológica referida ao óleo essencial em estudo foi a capacidade de proteção contra genotoxicidade do DNA (VICUÑA et al., 2011).

Estudos toxicológicos da espécie Lippia origanoides H.B.K.

Poucos estudos foram encontrados correlacionando *L. origanoides* e toxicidade. Um deles avaliou a exposição do óleo essencial de *L. origanoides* contra insetos, demonstrando também alta

atividade repelente. O óleo essencial demonstrou toxicidade (mortalidade) dependendo de dose e tempo de exposição, sendo observado uma mortalidade máxima (5%) após 72 horas de exposição (OSPINA et al., 2011).

No estudo de Zapata et al (2009) avaliou-se citotoxicidade in vitro pelo método direto (MTT), onde o óleo essencial da *L. origanoides* apresentou maior atividade citotóxica sobre células HeLa (adenocarcinoma de cérvix) com valor de IC_{50%} (concentração mínima do composto capaz de inibir a proliferação de 50% das células) de 9,1 µg/mL. Resultados semelhantes são observados nos estudos de Tangarife-Castaño et al. (2011) e Betancur-Galvis et al. (2011).

Resultados referentes a prospecção Tecnológica

Foram encontrados no campo palavra-chave, no título ou resumo o total de 12 documentos com a palavra-chave *Lippia origanoides* e 2 documentos com a palavra-chave *Lippia origanoides* H.B.K., dados estes apresentados na **tabela 1**.

Com a palavra-chave *Lippia origanoides* obtiveram-se 10 documentos na base de dados WIPO e 2 documentos na base do INPI, já nas bases USPTO, EPO e LATIPAT não foram encontrados nenhum documento. Já com a palavra-chave *Lippia origanoides* H.B.K. encontraram-se 2 documentos para a base do INPI, sendo que eram documentos duplicados em relação ao outro descritor utilizado (*Lippia origanoides*). Nenhum documento foi encontrado nas outras bases estudadas.

Há um número em crescimento de patentes decorrentes, principalmente, das mais diversas aplicações possíveis das substâncias produzidas pelo metabolismo de plantas nativas de regiões tropicais. Este mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de uma vasta biodiversidade, como o Brasil, e que possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas, ou seja, transformando-as em produtos beneficiados.

Tabela 1 - Total de depósitos de patente pesquisada nas bases do WIPO, INPI, USPTO, EPO e LATIPAT.

Palavras-chave	WIPO	INPI	USPTO	EPO	LATIPAT	TOTAL
<i>Lippia origanoides</i>	10	2	0	0	0	12
<i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	0	2	0	0	0	0

A **tabela 2** apresenta em detalhes as patentes analisadas no presente estudo, na qual se pode inferir que o ano de maior prevalência foi 2003 (25%), seguido do ano de 2002 e 2010 (16,66%). Os países com maior número de patentes analisadas neste estudo foram os Estados Unidos da América (41,66%) e o Canadá (41,66%), seguido do Brasil (16,66%).

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (CIP), a subclasse de maior frequência foi a A61K (75%), que corresponde as preparações de novas formulações farmacêuticas que sejam mais eficazes no tratamento de enfermidades; seguida da A01N (16,66%) que sugere conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos e da A23K (8,33%) que se refere a produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; métodos especialmente adaptados para a produção dos mesmos.

Tabela 2 - Principais características das patentes analisadas.

TÍTULO	PAÍS	ANO	CÓDIGO
Formulação farmacêutica derivada de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	Brasil	2011	A61K
Medicamento para tratamento da hipertensão arterial	Brasil	1993	A61K
Composition for treatment of infections of humans and animals	Canadá	2001	A61K
Compositions for injection or intravenous administration for the treatment of internal infection or inflammation in humans and animals	Estados Unidos	2002	A61K
Pesticidal compounds and compositions	Canadá	2002	A01N
Compositions and methods for increasing milk production in animals	Canadá	2003	A23K
Antimicrobial therapeutic compositions and methods of use	Estados Unidos	2003	A61K
Antimicrobial therapeutic compositions for oral and topical use	Estados Unidos	2003	A61K
Enhanced antimicrobial activity of plant essential oils	Canadá	2009	A01N

Use of in-vitro culture to design or test personalized treatment regimens	Estados Unidos	2010	A61K
Enhanced antimicrobial activity compositions of blends of plant essential oils	Estados Unidos	2010	A61K
Composition for treating pain and/or inflammation comprising eugenol and beta-caryophyllene	Canadá	2015	A61K

A escassez de resultados encontrados na base de dados nacional e de dados estrangeiras podem ser vistos como um alerta às comunidades industrial e acadêmica, para a pesquisa e desenvolvimento de produtos contendo *L. origanoides* H.B.K., dadas as propriedades terapêuticas já comprovadas da espécie e, além disso, ressaltando-se a facilidade de cultivo da mesma em solo brasileiro.

CONCLUSÃO

Apesar da amplitude do uso de plantas medicinais, a maioria dos artigos publicados não disponibiliza informações suficientes sobre os aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos de seus constituintes químicos, demonstrando-se, portanto, como área promissora de novas pesquisas. Através dos resultados obtidos nas bases de dados da pesquisa, é possível concluir que, apesar do avanço tecnológico, em relação ao óleo essencial de *Lippia origanoides* existem poucas patentes. Tornando esta uma área promissora para pesquisas, necessitando valorizar e incentivar novas pesquisas e investigação tecnológica das atividades farmacológicas do óleo de *Lippia origanoides* HBK.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, V.A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153-1161, 2014.
- ARANGO, O.; SANTACRUZ, L.; HURTADO, A.M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patia. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 79-86, Dez 2012.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. **Texas Board of Nursing**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BARRETO, H.M.; LIMA, I.S.; COELHO, Q.M.R.N.; OSÓRIO, L.R.; MOURÃO, R.A.; SANTOS, B.H.C.; COUTINHO, H.D.M.; ABREU, A.P.L.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 30, p. e1-e5, 2014.

BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antifungal, Cytotoxic and Chemical Analyses of Essential Oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 43, n. 2, p. 141-148, 2011.

BORGES, A.R.; AIRES, J.R.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.C.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **E Parasitology**, v. 132, p.123-8, 2012.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p.184-190, 2010.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis Schauer*. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, 2011, p. 64-77, 2011.

KELLER, K.; KNÖSS, W.; REH, K.; SCHNÄDELBACH, D. Phytopharmaka. Begriffsbestimmungen und Hintergründe. In: **Bundesgesundheitsblatt –Gesundheitsschutz**, v. 46, p. 1036-1039, 2003.

LOZADA, B.S.; HERRERA, L.V.; PEREA, J.A.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao L.*). **Acta Agronómica**, v. 61, n. 2, p. 102-110, 2012.

MENESES, R.; OCAZONEZ, R.E.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 8, p. 1-6, 2009.

MONTECCHI, T.; RUSSO, D.; LIU, Y. Searching in Cooperative Patent Classification: Comparison between keyword and concept-based search. **Advanced Engineer Informatic**, v. 27, p. 335-345, 2013.

MUJHERJEE, P.K. **Quality control of herbal drugs**. 1 ed. New Delhi: Business Horizons Pharmaceutical Publications. 2008.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M.A.; TANEJA, S.C.; AHMAD, S.F.; BANI, S.; QAZI, G.N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis - A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 401-405, 2007.

OLIVEIRA, F.C.; LEITÃO, G.G.; FERNANDES, P.D.; LEITÃO, S.G. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). **Bio Science Ecology**, v. 51, p. 328-330, 2013.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de *Ananas comosus* (Bromeliaceae). **Revista Geintec**, v. 2, n. 5, p. 505-513, 2012.

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 organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v.101, p.236-40, 2007.

OSPINA, D.I.; ÁLVAREZ, V.; TORRES, H.G.; SÁNCHEZ, M.S.; BONILLA, C.R. Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. **Acta agronómica**, v. 60, n. 4, p.306-11, 2011.

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

RIBEIRO, A.F.; ANDRADE, E.H.A.; SALIMENA, F.R.G.; MAIA, J.G.S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Bio Science Ecology**, v. 55, p. 249-259, 2014.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype oil from *Lippia organoides* Kunth. **Molecules**, v. 20, p. 1860-1871, 2015a.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 145-152, 2015b.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p.402-413, 2010.

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

TANGARIFE-CASTAÑO, V. et al. Anti-Candida albicans effect, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plant. **Infection**, v. 15, n. 3, p. 160-167, 2011.

TEZARA, W.; CORONELA, I.; HERERRA, A.A.; DZIBB, G.; CANUL-PUC, K.; CALVO-IRABIÉN, L.M.; GONZÁLEZ-MELERCA, M. Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in the Yucatán península. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p.1-9, 2014.

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. A. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v 31, n. 1, p. 7-17, 2013.

VICUÑA, G.C.; STASCHENKO, 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.343-9, 2011.

ZAPATA, B.; DURAN, C.; STASHENKO, E.; CORREA-ROYERO, J.; BETANCUR-GALVIS, L. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. **Revista Salud UIS**, v. 41, p. 215-222, 2009.

*Extração, caracterização química e avaliação da atividade
anticolinesterásica do óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K.*

Extração, caracterização química e avaliação do potencial *anticolinesterásico in vitro* do óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K.

RODRIGUES, AMX^{1,3}; FEITOSA, CM^{3,4}; SANTOS, BNG²; CARVALHO, MGFM¹; FREITAS, RM^{1,3}; CITÓ, AMGL^{1,4}

¹ Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³ Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Os óleos essenciais possuem a capacidade de proteção dos sistemas biológicos em virtude de sua atividade antirradical livre protegendo de danos ocasionados pelo estresse oxidativo, o qual é considerado a principal causa das doenças neurodegenerativas, tal como a doença de Alzheimer, uma desordem progressiva que afeta principalmente a população idosa. Os avanços obtidos com vistas a compreender a evolução da doença têm demonstrado que o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase constitui-se na forma mais eficiente de controle da doença. Existe uma associação entre a ação de inibir a enzima acetilcolinesterase das espécies estudadas de diferentes famílias com a presença de constituintes com atividade sequestradora de radical livre, como ocorre com alguns dos metabólitos secundários presentes no óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi extrair e realizar a caracterização química do óleo essencial de *L. origanoides*, bem como determinar de forma qualitativa e quantitativa o poder ativo deste óleo como possível inibidor da enzima acetilcolinesterase. O óleo foi extraído por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Ellman, adaptada por Rhee. A análise dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* resultou na identificação de 25 constituintes, representando 98,21% do total. O timol com 23,89%, seguido do carvacrol com 21,78% e *p*-cimeno com 18,87% constituem os compostos majoritários, assemelhando-se ao quimiotipo C desta espécie. Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem concluir que o óleo essencial de *L. origanoides* demonstrou ser promissor quanto à inibição da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, *p*-cimeno, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Essential oils have the protective ability of biological systems because of its free antiradical activity protect from damage caused by oxidative stress, which is considered the main cause of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), a progressive disorder that primarily affects the elderly. The advances made in order to understand the evolution of the disease have shown that the use of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) inhibitors constitutes the most efficient way to control the disease. There is an association between the action of inhibiting the enzyme acetylcholinesterase of the studied species from different families with the presence of constituents with free radical scavenging activity, as with secondary metabolites present in the essential oil of *Lippia origanoides* HBK. Given the above, the objective of this study was to obtain and perform chemical characterization of the essential oil of *L. origanoides* HBK and determine qualitatively and quantitatively the active power of this oil as a possible inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase. The oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC - MS). The inhibition assay of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) activity was evaluated following the methodology described by Ellman et al. (1961), adapted by Rhee et al. (2001). Analysis of volatile constituents present in the essential oil of aerial parts of *L. origanoides* HBK resulted in the identification of 25 constituents, representing 98.21% of the total. Thymol with 23.89%, followed by carvacrol 21.78% and *p*-cymene with 18.87% are the major compounds, similar to the C chemotype of this species. Results of acetylcholinesterase inhibition studies support the conclusion that the essential oil of *L. origanoides* HBK proved to be promising as the inhibitor of acetylcholinesterase. This result reinforces the need to continue the study in order to perform the quantitative part of the test in order to know the percentages of inhibition of this enzyme.

Keywords: *Lippia origanoides*, essential oil, *p*-cymene, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais possuem a capacidade de proteção dos sistemas biológicos em virtude de sua atividade antirradical livre. Esta ação pode ser observada de forma especial nas membranas lipídicas, as protegendo de danos ocasionados pelo estresse oxidativo, o qual é considerado a principal causa do envelhecimento, das doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e de células tumorais (GULCIN et al, 2003; ATOUI et al., 2005; SACCHETTI et al., 2005; HOUGHTON et al. 2007).

Há uma maior frequência de doenças relativas a idade em virtude do aumento da expectativa de vida da população mundial, tal como a doença de Alzheimer (DA). A DA é uma desordem neurodegenerativa, progressiva que afeta principalmente a população idosa. Suas causas ainda são indeterminadas e, desta forma, até o momento somente a sintomatologia pode ser amenizada (VIEGAS JUNIOR et al. 2004).

Os avanços obtidos com vistas a compreender a evolução da doença têm demonstrado que o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) constitui-se na forma mais eficiente de controle da doença. O medicamento mais efetivo na inibição da AChE, utilizado no tratamento da DA, é o alcaloide galantamina, isolado inicialmente de *Galanthus woronowii* (LÓPEZ et al., 2002). Apesar de ser considerado o melhor tratamento disponível atualmente, esta substância apresenta variados efeitos colaterais e um preço oneroso no mercado. A constante busca por novos fármacos que possuam uma baixa toxicidade, que sejam mais efetivos no controle da enzima AChE e com um menor valor de mercado, torna-se uma necessidade (TREVISAN et al., 2003).

Os trabalhos de Berkov et al. (2008) e Barbosa Filho et al. (2006) apresentam em seus resultados uma associação entre a ação de inibir a enzima acetilcolinesterase das espécies estudadas de diferentes famílias com a presença de alcaloides, com base no fato de que a maioria das substâncias que apresentam atividade inibidora de acetilcolinesterase constituem-se em alcaloides. Sendo assim, as famílias detentoras desta classe de metabólitos se tornam uma fonte promissora para a utilização de métodos para analisar esta atividade.

A *L. origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK), família Verbenaceae, é um arbusto aromático que chega a atingir até 3 m de altura, nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e Antilhas. Na Colômbia é conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida como “Alecrim-do-campo”, sendo amplamente dispersa na

região e muito utilizada no tratamento de distúrbios gastrointestinais e respiratórios (SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al, 2010).

Vários estudos demonstram uma diferença na composição química do óleo da *L. origanoides*, tendo como principais componentes majoritários o carvacrol e o timol, monoterpenos fenólicos presentes em óleos essenciais da família *Verbenaceae*, sendo responsáveis pelas principais atividades farmacológicas e apresentando também outras substâncias metabólicas secundárias como alcaloides, flavonoides, taninos, dentre outras (SIVIRA et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi extrair e realizar a caracterização química do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K., bem como determinar de forma qualitativa e quantitativa o potencial farmacológico deste óleo como possível inibidor da enzima acetilcolinesterase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *L. origanoides* H.B.K. foi realizada no mês de maio de 2013, no município de José de Freitas (latitude 04°45'23" sul e longitude 42°34'32" oeste), Piauí, Brasil, conforme é apresentado na figura 1.

A determinação da espécie foi realizada pela botânica Fátima Salmena Pires e uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário "Graziela Barroso" do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí sob o número TEPB 09205.

Figura 1 - Mapa do Piauí destacando o município de José de Freitas.



Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Piaui_Municip_Josedefreitas.svg

Obtenção do óleo essencial

As partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K. (500,0 g) foram submetidas à extração por hidrodestilação por um período de 4 h, em aparelho de tipo Clevenger modificado acoplado a um balão de 5L.

Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG - EM)

Os constituintes voláteis foram analisados em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu modelo GC-17A, acoplado a um espectrômetro de massas GCMS-QP5050A equipado com coluna capilar J&W Scientific DB-5 HT (95% metilpolisiloxano e 5% fenil, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura do filme da fase fixa). A programação de injeção e corrida das amostras foi injetor a 220 $^{\circ}\text{C}$, interface a 240 $^{\circ}\text{C}$ e coluna programada para operar a 60 $^{\circ}\text{C}$, com elevação de temperatura de 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se hélio como gás de arraste, mantido ao fluxo constante de 1,0 mL min^{-1} .

Os constituintes voláteis, foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional Wiley229®, bem como pela comparação

dos respectivos índices de retenção (IR), e espectros de massas em comparação com os disponíveis na literatura (ADAMS, 2007).

Avaliação qualitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

O ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), adaptada por Rhee et al. (2001).

A amostra foi aplicada em CCD e em seguida efetuou-se a pulverização da placa com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico, DTNB) e uma solução de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) em tampão, deixando-se secar. Após este procedimento, pulverizou-se a placa com a enzima AChE (5 units/mL). Decorridos alguns minutos (aproximadamente 10 minutos), a inibição enzimática pôde ser constatada pela ausência da cor amarela e concomitante surgimento de um halo branco. Como padrão positivo de atividade foi utilizada a cafeína.

Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

O teste quantitativo foi realizado pelo método espectrofotométrico. Para tanto, 1mg da amostra (padrão e OELO) foi adicionada a 1 mL de solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10% de metanol, partindo-se, portanto, de uma solução estoque de 1000 µg/mL. Esta solução foi então submetida a diluições seriadas de razão 2 (1/2) em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10% de metanol, obtendo-se soluções de concentração 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL. O padrão utilizado foi um fármaco de referência no tratamento da DA, fisostigmina.

Retirou-se da primeira concentração 100µL e colocou-se em um tubo de ensaio adicionando-se 100 µL da enzima 10U com tampão e albumina e 200 µL de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1% BS. Se repetiu esse processo para as demais concentrações. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como branco utilizou-se 100 µL de 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % metanol adicionado a 300 µL de Tris-HCl, 50 mM, pH 8, 0,1% BSA.

Todas as amostras foram levadas para o banho Maria durante 5 minutos. Ao retirar as amostras do banho Maria acrescentou-se em todas 500 µL de Solução tampão com DTNB+ NaCl + MgCl₂.

Essas amostras foram transferidas para uma cubeta de vidro, com leitura em 412 nm, onde se acrescentou 100 µL de solução tampão com iodeto de acetilcolina e realizou-se a absorvância inicial no espectrofotômetro, após 5 minutos realizou-se novamente a absorvância final.

O cálculo de inibição enzimática foi obtido pela expressão (SEIDL, 2010):

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{variação da reação amostra} / \text{variação da reação controle} \times 100).$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

Os constituintes químicos identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) no óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K. estão apresentados na Tabela 1 e Figura 2.

O óleo essencial de *L. origanoides* apresentou 25 constituintes, representando 98,21% do total. O timol com 23,89%, seguido do carvacrol com 21,78% e *p*-cimeno com 18,87% constituem os compostos majoritários e os espectros de massas desses constituintes estão representados na Figura 3. A *L. origanoides* H.B.K. possui alguns quimiotipos diferenciando-se pelo majoritário, o óleo estudado apresentou similaridade com o quimiotipo C, com predominância de timol.

Os resultados diferem daqueles encontrados por Santos et al. (2004) que analisou três coleções de *L. origanoides* encontrando como constituintes majoritários o carvacrol (33,5%), seguido pelo *p*-cimeno (11,9%) e timol (5,1%). Diferindo também dos dados descritos por Escobar et al. (2010) que analisou o óleo essencial de diversas coleções de *L. origanoides* na Colômbia obtendo como majoritário o carvacrol (20,5%), seguido do *p*-cimeno (14,8%) e do timol (13,4%). De acordo com Bandoni e Czepak (2008) as variações na composição química dos óleos essenciais podem ser devidas à época de colheita, origem botânica e geográfica da planta, além de fatores naturais, procedimentos de cultivo, adubos e de obtenção dos óleos essenciais.

O *p*-cimeno contém um grupo isopropil ligado a um anel benzênico com grupo metil em para (1-metil-4-isopropil), constituindo-se em um hidrocarboneto natural, monoterpene monocíclico, com fórmula molecular C₁₀H₁₄. Vários estudos apontam algumas das principais ações relativas ao *p*-cimeno, das quais cita-se o uso como produto alimentício, herbicida, além de possuir atividade antimicrobiana, antioxidante, antinociceptiva, agente anticarcinogênico,

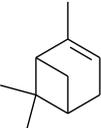
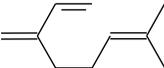
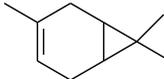
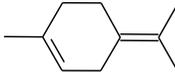
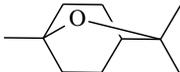
dentre outras (SANGSTER, 1989; SANTANA et al., 2011; BURT, 2004; CRISTANI, 2007; SHAPIRA; MIMRAN, 2007; MARTIN-LUENGO, 2008).

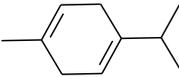
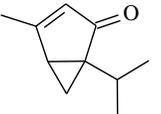
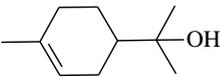
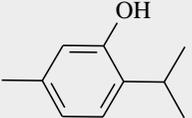
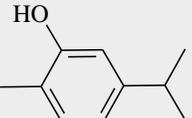
Estudos demonstram que a obtenção do *p*-cimeno ocorra a partir da aromatização do γ -terpineno e a partir daí o *p*-cimeno poderá dar origem a vários outros monoterpenos por hidroxilação, dando origem ao timol ou seguido por hidroxilação no C-2 do anel, no caso do carvacrol (MARTIN-LUENGO, 2008).

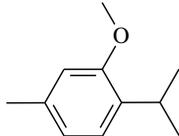
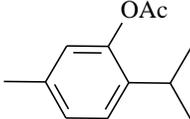
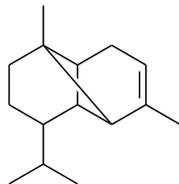
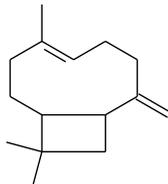
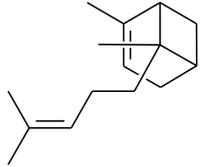
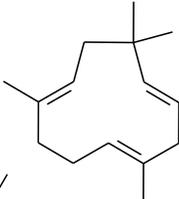
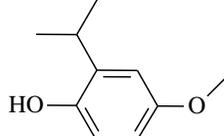
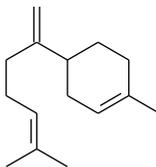
Timol e carvacrol são conhecidos por inibir efetivamente o crescimento de patógenos orais, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica, uma potente atividade contra protozoários, efeito anticarcinogênico, atividade antiproliferativa, anti-inflamatória, antiplaquetária antioxidante, larvicida e ovicidasua atividade antimicrobiana de amplo espectro a qual foi alvo de algumas investigações *in vitro* (CARVALHO et al., 2003; TASDEMIR et al., 2006; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; BOTELHO et al., 2007; DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001) e *in vivo* (ADAM et al., 1998; MANOHAR et al., 2001).

Uma informação de grande relevância para este estudo é que já foi demonstrado que tanto o Carvacrol quanto o Timol possuem a capacidade de inibir a atividade da acetilcolinesterase (JUKIC et al., 2007).

Tabela 1 - Composição dos voláteis identificados no óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K.

Tempo de Retenção	Composto	IR _(lit.)	IR _(calc.)	Estrutura	Área (%)
5,979	α -pineno	932	954		0,46
7,516	β -mirceno	988	988		2,54
8,206	δ -3-careno	1008	1011		0,31
8,431	Terpinoleno	1086	1016		0,93
8,868	limoneno	1024	1027		0,77
8,943	1,8-cineol	1026	1030		1,07

9,203	<i>p</i> -cimeno	1020	1021		18,87
9,938	γ -terpineno	1054	1056		1,19
11,445	linalol	1095	1097		0,74
14,429	3-tujen-2-ona	924	1167		0,50
14,757	4-terpineol	1175	1174		1,64
15,334	α -terpineol	1188	1186		0,29
17,166	Timol	1289	1284		23,89
17,121	Carvacrol	1298	1299		21,78

17,129	Timil-metil-eter	1232	1230		3,57
22,249	Acetato de timila	1340	1346		3,27
23,674	α -copaeno	1374	1379		1,36
25,515	<i>trans</i> -cariofileno	1417	1422		8,28
26,171	α -bergamoteno	1432	1438		0,55
26,937	α -humuleno	1452	1456		2,92
28,001	Butil-hidroxianisol	1488	1482		0,78
29,145	β -bisaboleno	1505	1509		0,55

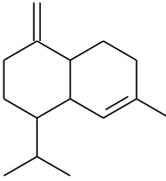
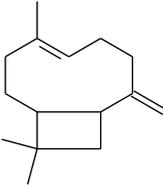
29,774	δ -cadineno	1522	1525		0,91
32,097	Cariofileno	1417	1598		1,04
TOTAL IDENTIFICADO					98,21 %

Figura 2 – Cromatograma dos íons totais (TIC) dos constituintes voláteis, com os majoritários identificados, obtidos por hidrodestilação das partes aéreas de *L. origanoides*.

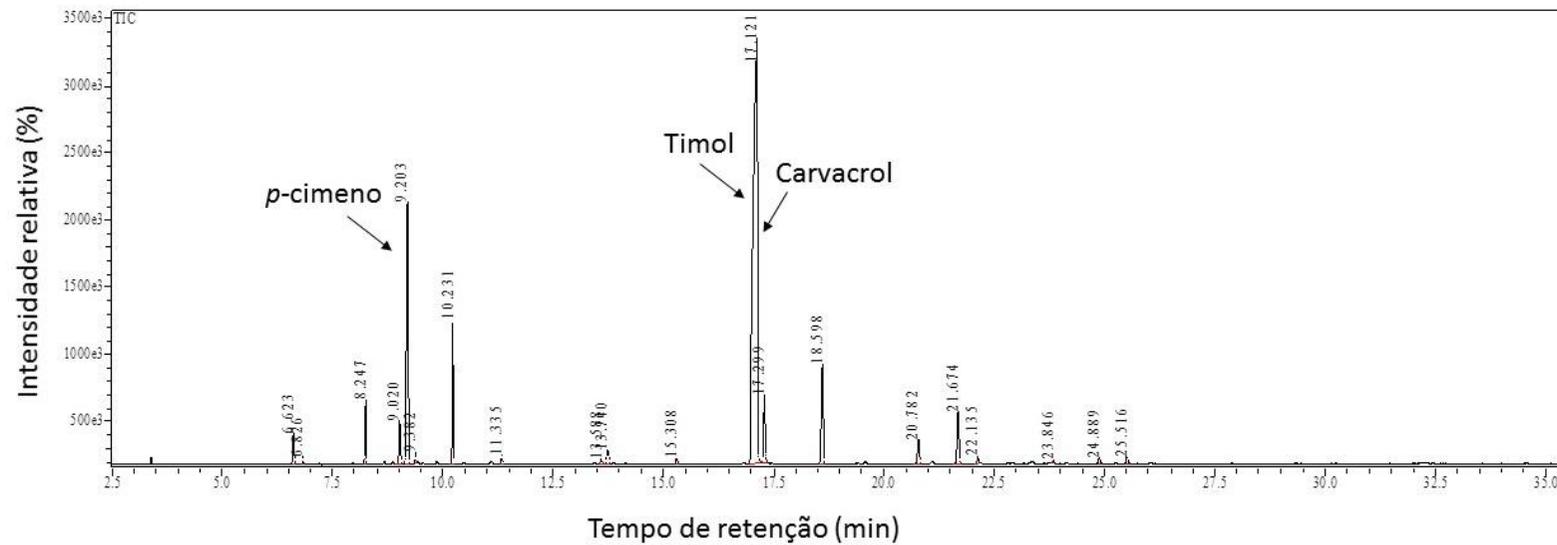
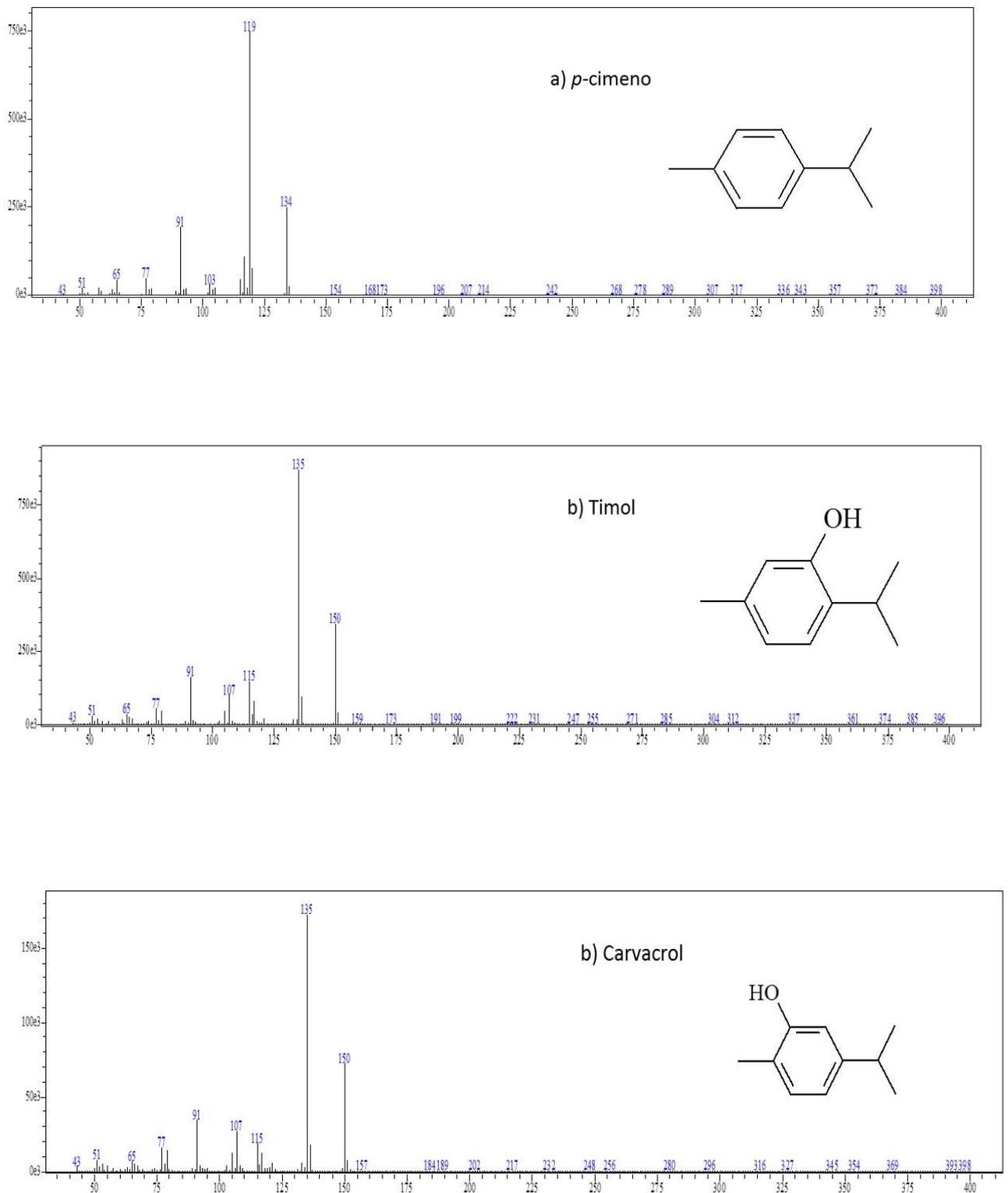


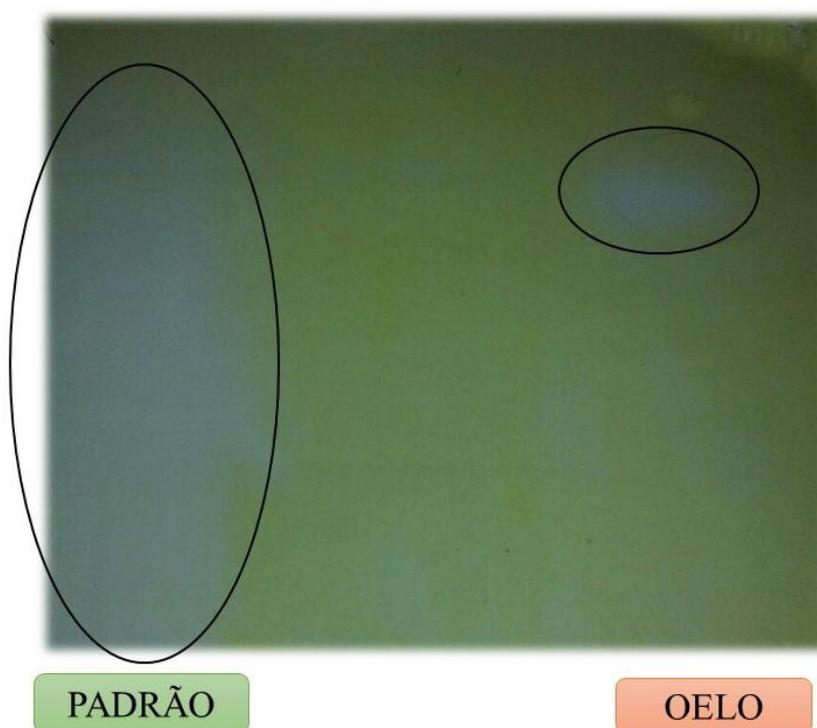
Figura 3 – Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação das partes aéreas de *L. origanoides*.



Avaliação qualitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

A análise qualitativa da atividade acetilcolinesterásica revelou que o óleo essencial de *L. origanoides* foi capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase, conforme pode ser observado na Figura 4. Dessa forma, tal espécie é candidata a um possível estudo bioguiado visando investigações quantitativas, assim como isolamento e elucidação estrutural das substâncias ativas.

Figura 4 - Resultado qualitativo da atividade inibidora da acetilcolinesterase do OELO.



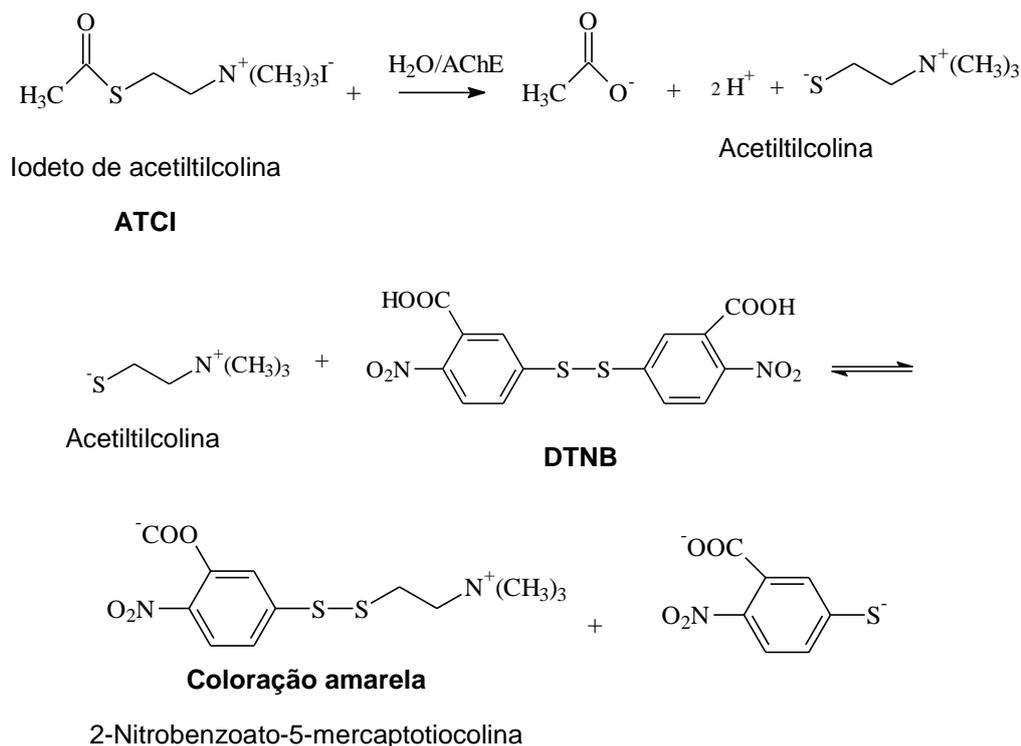
Fonte: Autoria própria, 2015.

Ellman e colaboradores descreveram, em 1961, um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica. O método se baseia na medição da taxa de produção da tiocolina à medida que a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase.

Décadas depois, Rhee e colaboradores (2001) desenvolveram um sistema rápido e eficaz para a detecção de substâncias inibidoras de acetilcolinesterase, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). Neste teste é visualizado um campo amarelo com manchas brancas na placa de CCD, sendo esses halos brancos o indicativo da inibição da enzima que impede a

formação de complexo colorido da tiocolina com o reagente de Ellman. A reação que normalmente ocorre pode ser visualizada na Figura 5.

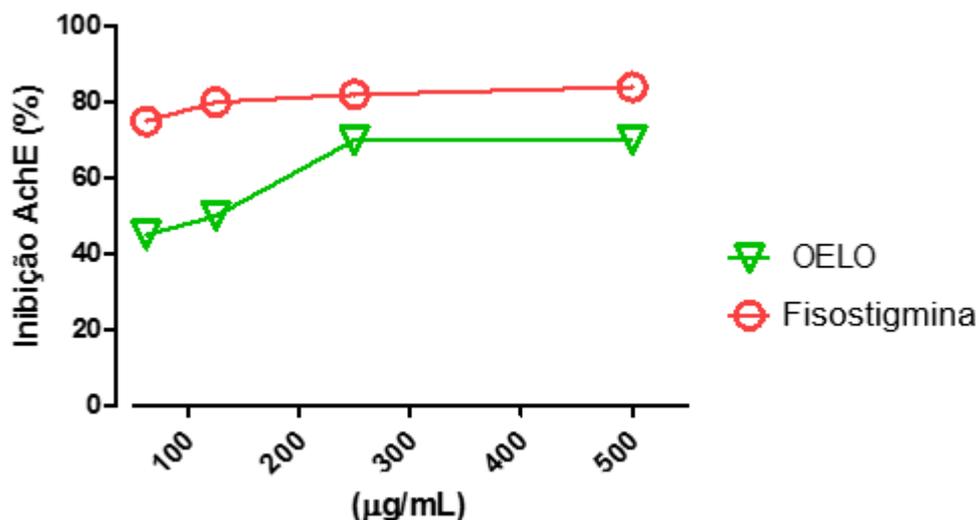
Figura 5 - Mecanismo de ação presente no Teste de Ellman.



Avaliação quantitativa da atividade inibidora da acetilcolinesterase do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

O OELO demonstrou um potencial inibidor na avaliação quantitativa quando comparado com o padrão fisostigmina, como pode ser observado na Figura 6. Obteve-se que o óleo nas concentrações testadas (62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) inibiu, respectivamente, 45%, 50%, 70% e 70% a atividade da AchE, demonstrando em termos quantitativos uma faixa de ação potencial para essa atividade farmacológica, de acordo com a dose utilizada.

Figura 6 - Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica do OELO comparado com o padrão fisostigmina. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (em % de inibição da AChE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica.



O OELO mostrou-se ativo no ensaio quantitativo apresentando o valor da CI_{50} de 387,5 $\mu\text{g/mL}$. Porém esse resultado foi muito inferior se comparado ao fármaco utilizado como controle positivo e na clínica médica, fisostigmina que apresentou o valor da CI_{50} de 105,6 $\mu\text{g/mL}$.

Por essa razão torna-se necessário saber o mecanismo de ação deste óleo, bem como de seus majoritários envolvidos na inibição da enzima acetilcolinesterase. Complementando os resultados, no estudo de Anderson e Coats (2012) a inibição da AChE foi avaliada como possível mecanismo de ação do carvacrol em artrópodes, demonstrando que este composto possui atividade inibitória desta enzima em moscas, carrapatos e baratas.

Além do carvacrol, Jukic e colaboradores (2007) em seus estudos também indicam a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo composto timol, observando que estes composto também apresenta a capacidade de inibir a AChE, porém em níveis menores que os observados para o carvacrol, sugerindo que a posição do grupo hidroxila na estrutura molecular do composto desempenha papel importante para o efeito inibidor da enzima.

Tong e colaboradores (2013) realizaram seus ensaios levando em consideração a hipótese de ligação do carvacrol com os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) em insetos, onde os resultados inferiram que o composto apresenta uma inibição da ligação $[^{14}\text{C}]$ -nicotina de forma dependente da concentração numa preparação de membranas de mosca contendo os receptores neuronais da acetilcolina nAChR.

A procura por inibidores da AChE é de grande interesse, em virtude de algumas das substâncias já utilizadas como medicamento para o tratamento de Alzheimer se apresentarem limitantes, com alta hepatotoxicidade e baixa biodisponibilidade, acrescentando ao fato de medicamentos provenientes de fontes naturais proporcionarem efeitos colaterais mais brandos em doses terapêuticas (ALMEIDA, 1998).

CONCLUSÃO

A análise dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K. resultou na identificação de 25 constituintes, representando 98,21% do total. Destacando-se como majoritários o timol, o carvacrol e o *p*-cimeno sendo, portanto semelhante ao quimiotipo C.

Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem concluir que o óleo essencial de H.B.K. demonstrou ser promissor quanto à inibição da acetilcolinesterase, inibindo 70% da atividade da enzima acetilcolinesterase na concentração 250 µg/mL. Este resultado reforça a necessidade da continuidade do estudo de forma a realizar testes *in vivo*, a fim de se determinar o efeito que a utilização do óleo essencial de *L. origanoides* possa proporcionar.

REFERÊNCIAS

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739–1745, 1998.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation Carol Stream, Illinois. 2007, 804 p.

ALMEIDA, O.P. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, p. 688-696, 1998.

ANDERSON, J.A.; COATS, J.R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 124 – 128, 2012.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 999-1003, 2001.

BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623p.

BARBOSA FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.; BATISTA, L.M., ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.

BERKOV, S.; BATISDA, J.; NIKOVA, M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Rapid TLC/CG-MS Identification of Acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. **Phytochemical analysis**, v. 19, p. 411-419, 2008.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, 84 G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007.

BURT, S.A.; Essential oils: The antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288–294, 2007.

CARVALHO, A.F., MELO, V.M., CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I., BANTIM, M.B., RABELO, E.F., Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 569-571, 2003.

CRISTANI, M.T. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308, 2007.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

ELLMAN, G. L., Courtney, D. K., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major componentes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p.184-190, 2010.

GULCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisun* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382 2003.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M.; MILOS, M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 259-61, 2007.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity oh some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extratcts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, p. 111-117, 2001.

MARTÍN-LUENGO, M.A; YATES, M.; MARTÍNEZ, D.; CASAL, B. IGLESIAS, M.; ESTEBAN, M.; RUIZ-HITZKY, E. Synthesis of p-cymene from limonene, a renewable feedstock. **Applied Catalysis B: Evironmental**, v. 81, p. 218-224, 2008.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p.217-223, 2001.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, 91 p. 621-632, 2005.

SANGSTER, J. Octanol- water Partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physics and Chemistry**, v.18, n.3, p. 1111-1227, 1989.

SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G.B.; GUMIRÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S. SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S; BONJARDIM, L.R. P-cymene redices orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.8, p. 1138-1143, 2011.

SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.D.; CITO, A.M.G.L.; OLIVEIRA, A.E.H.B.; LIMA, S.G.; REIS, F.A.M. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 504-506, 2004.

SHAPIRA, R.; MIMRAN, E. Isolation and characterizantion of Escherichia coli mutants exhibiting altered response to thymol. **Microbial Drug Resistance**, v. 94, p. 223-253, 2004.

SIVIRA A; SANABRIA ME; VALERA N; VÁSQUEZ C. Toxicity of Ethanolic Extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 375-379, 2011.

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

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; DEMIRCI, F.; BASER, K.H.C. Essential oil of Turkish *Origanum onites* L. and its main components, carvacrol and thymol show potent antiprotozoal activity without cytotoxicity. **Planta Med.**, v. 72, p. 1006, 2006.

TONG, F.; GROSS, A.D.; DOLAN M.C.; COATS J.R. The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest Management Science**, v. 69, p. 775–780, 2013.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, IN K.; VERPOORTE, R. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E.J. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

ZANIN, S.M.W.; LORDELLO, A.L.L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, p. 92-98, 2007.

Estudo da toxicidade aguda e do possível efeito no sistema nervoso central do óleo essencial da Lippia origanoides H.B.K.

Estudo da toxicidade aguda e do possível efeito no sistema nervoso central do óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K.

RODRIGUES, AMX^{1,2}; SANTOS, BNG³; PRADO, AC⁴; CARDOSO, JFS⁴; CARVALHO, MGFM¹; FREITAS, RM^{1,2}; CITÓ, AMGL^{1,5}

¹ Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³ Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴ Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁵ Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Os óleos essenciais obtidos de plantas apresentam várias atividades biológicas, como antioxidante, antinociceptiva, anticonvulsivante, antidepressivo, sedativo e ansiolítico. No entanto, faz-se necessário atentar-se avaliação da segurança e eficácia de plantas medicinais, pois as reações tóxicas e efeitos adversos dos fitomedicamentos são um problema de saúde pública. O presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. *in vivo* em camundongos fêmeas adultos, com intuito de avaliar sua segurança para uso como substância bioativa em formulações farmacêuticas, também objetivou analisar os efeitos no sistema nervoso central da administração aguda do óleo, por meio do teste de campo aberto e barra giratória. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas pesando entre 25-30 g e separados 3 grupos de 3 animais. O óleo essencial foi solubilizado em *Tween* 80 0,05%, dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrada por via oral (300 e 2000 mg/kg). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí. As manifestações comportamentais de toxicidade, como o estado de consciência, a disposição, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos, as atividade sobre o sistema nervoso central (tremores, crises epilépticas, fenômenos de “straub”, hipnose e anestesia) e a atividade sobre o sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptose palpebral, micção, piloereção, hipotermia, respiração e hiperemia) não foram evidenciadas em nenhum dos animais tratados com as doses de 300 e 2000 mg/kg. Não houveram alterações significativas nos dados fisiológicos, bioquímicos e hematológicos dos animais ($p > 0,05$). O óleo essencial de *L. origanoides* não interferiu na atividade locomotora e coordenação motora dos animais. O estudo de toxicidade dose única indicou que o tratamento com o óleo essencial de *L. origanoides* por via oral, nas doses selecionadas, apresentou perigo relativamente baixo de toxicidade em todos os animais em

teste, sugerindo sua segurança para posteriores investigações não clínicas. No entanto, mais estudos sobre a toxicidade com doses repetidas deste óleo são necessários, para garantir seu uso de forma segura sem problemas relacionados à saúde humana.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, toxicidade aguda, camundongos.

ABSTRACT

The essential oils obtained from medicinal plants exhibit various biological activities such as antioxidant, anti-nociceptive, anticonvulsant, antidepressant, sedative and anxiolytic. However, it is necessary to pay attention to assessing the safety and efficacy of medicinal plants as toxic reactions and adverse effects of phyto are a public health problem. This study aimed to assess the acute toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides* HBK in a study in mice adult females, designed to evaluate their safety for use as bioactive substance in pharmaceutical formulations, also aimed to analyze the effects of acute oil administration central nervous system through the rotary rod and the open field test. Swiss female mice weighing between 25-30 g and 3 separate groups of 3 animals were used. The essential oil of *L. origanoides* H.B.K. It was solubilized in 0.05% Tween 80, dissolved in 0.9% saline (vehicle) and administered orally (vo) (300 to 2000 mg / kg). The experimental protocols and procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Piauí (EAEC / UFPI No. 064/2014). The behavioral manifestations of toxicity, such as the state of consciousness, the provision, coordination, muscle tone, reflexes, the activity on the central nervous system (tremor, seizures, phenomena of "straub", hypnosis and anesthesia) and the activity of the autonomic nervous system (lacrimation, ptosis, urination, piloerection, hypothermia, breathing and hyperemia) were not seen in any of the animals treated with doses of 300 and 2000 mg / kg. There were no significant changes in physiological characteristics, biochemical and haematological animals ($p > 0.005$). The essential oil of *L. origanoides* H.B.K. did not affect the locomotor activity and motor coordination of the animals. The single-dose toxicity study indicated that treatment with the essential oil orally in selected doses, with relatively low risk of toxicity in all test animals, suggesting their safety for further non-clinical investigations. However, more studies on the toxicity with repeated doses of this oil are needed to ensure its safe use without problems related to human health.

Keywords: *Lippia origanoides*, essential oil, acute toxicity, mice.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais está associado ao fato de se constituir em uma importante fonte para obtenção de substâncias moleculares com potencial farmacológico. Países em desenvolvimento fazem uso das plantas medicinais por tradição. Já em países desenvolvidos se observa um maior uso de fitomedicamentos, principalmente devido ao modismo associado ao consumo desses produtos (BETTEGA et al., 2011).

Pesquisas científicas que relatam tanto a composição química como a atividade farmacológica de plantas medicinais se tornaram de suma importância na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. A enorme diversidade de constituintes químicos se constitui no maior e mais importante fator para esse interesse em novos compostos com propriedades farmacológicas, em virtude da complexidade da constituição química de plantas medicinais (BADKE et al., 2012).

Os óleos essenciais oriundos de plantas medicinais apresentam várias atividades biológicas, como antioxidante, antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2001.), anticonvulsivante, antidepressivo, sedativo e ansiolítico (ALMEIDA et al., 2004; BUCHBAUER et al., 1993; CAMPÊLO et al., 2011). Alguns estudos apontam que a inalação de substâncias voláteis derivadas da maioria dos óleos essenciais de plantas gera uma possível ação depressora destes compostos no sistema nervoso central (ROLSETH et al., 2002; KOMIYA et al., 2006).

A população de forma generalizada adota um conceito perigoso a respeito do uso de plantas medicinais, alegando que não representa quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e por já terem sido utilizadas e testadas por meio da utilização na medicina popular (VEIGA JÚNIOR, 2008).

Avaliar a segurança e eficácia de plantas medicinais, assim como de seus constituintes ativos faz-se extremamente necessária, em virtude de que as reações tóxicas e efeitos adversos dos fitomedicamentos se constituem em um problema de saúde pública. Além disso, podem ser observadas modificações na matéria prima e promoção de interações com outras drogas ainda não estudadas sobre os constituintes químicos presentes em plantas medicinais (BETTEGA et al., 2011).

Dentre as plantas medicinais comumente utilizadas pela população encontra-se a *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae), um arbusto apícola de pequeno porte, nativo da América Central e do nordeste da América do Sul, cujo nome advém de seu aroma característico, similar ao de orégano. É utilizada como tempero e na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, apresentando também propriedade antisséptica (BARRETO et al., 2014; VICUÑA et al., 2010). Ao longo dos anos a espécie vem sendo estudada,

especialmente no tocante à composição e possíveis atividades de seu óleo essencial (SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al, 2010).

O gênero *Lippia*, possui cerca de 200 espécies, distribuídas nas Américas do Sul e Central e na África tropical. No Brasil, a ocorrência destas espécies é de 70 a 75%. As espécies de *Lippia* são utilizadas, pela medicina tradicional, principalmente para tratar problemas respiratórios, gastrointestinais e de pele, além de apresentarem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antimaláricas e antiúlcera (PASCUAL et al., 2001).

No entanto, ainda não foi investigada a segurança do uso do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. em ensaios pré-clínicos. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda do óleo em estudo em camundongos fêmeas adultos, com intuito de avaliar sua segurança para uso como substância bioativa em formulações farmacêuticas, também objetivou analisar os efeitos da administração aguda do óleo essencial de *L. organoides* H.B.K. no sistema nervoso central, por meio do teste campo aberto e barra giratória.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Foi utilizado como material vegetal para o estudo, as partes aéreas de *L. organoides* H.B.K. A coleta ocorreu no município de José de Freitas, Piauí, Brasil. Do espécime vegetal foi depositada uma exsicata no Herbário “Graziela Barroso”, do departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí, com o número: TEPB 09205.

Obtenção do óleo essencial de *L. organoides* H.B.K. (OELO)

As partes aéreas de *L. organoides* H.B.K. (500,0 g) foram submetidas à extração por hidrodestilação por um período de 4 h, em aparelho de tipo Clevenger modificado acoplado a um balão de 5L.

Reagentes e protocolos experimentais

O óleo essencial foi emulsificado com Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a óleo nas doses de 300 e 2000 mg/Kg via oral em uma única dose e observados durante 14 dias.

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, fêmeas, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias – (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

No período de aclimatação, os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Todos os testes comportamentais foram realizados em salas silenciosas nas mesmas condições referidas acima e isoladas de ruídos externos (HOR et al., 2011).

Todos os animais foram tratados em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008). Todos os experimentos propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 064/14).

O delineamento experimental para realização dos testes de toxicidade aguda da GFC está detalhado no esquema abaixo (**figura 1**).

Figura 1 - Esquema do estudo da toxicidade dose única (aguda) do óleo (OELO).



Fonte: Autoria própria, 2015

Toxicidade aguda

O ensaio foi realizado de acordo com o Guia 423 da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), o Método de Classes para Toxicidade Aguda, onde realizam-se etapas sequenciais de teste e prioriza-se a utilização de pequena quantidade de

animais (3 por etapa). Este guia estabelece no máximo cinco doses diferentes a serem utilizadas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg – podendo chegar a 5000 mg/kg).

Neste experimento, as doses utilizadas e administrada do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K. foi de 300 e 2000 mg/kg, em uma única administração, já que as informações disponíveis sobre a amostra em estudo apontam que a mortalidade é improvável na maior dose inicial, como preconiza o guia supracitado.

Para o preparo das doses, foi respeitada a proporção de 1 mL de amostra para cada 100 g de peso do animal. Os camundongos foram inicialmente divididos em três grupos, de três animais cada, sendo ao grupo 1 administrado o OELO na dose de 300 mg/Kg, ao grupo 2 administrado o OELO na dose de 2000 mg/Kg e ao grupo 3 (Controle) foi administrado *Tween* 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%.

Como parâmetros de análise após a administração, foi monitorizado continuamente durante 1 hora após a dosagem, e, em seguida, diariamente a massa corporal dos animais, bem como o consumo de ração, água e quantidade de excretas, além da realização do *screening* hipocrático por meio de observações individuais dos animais durante 14 dias de observação. Os animais foram observados quanto à função comportamental, motora e sensorial para verificar os potenciais efeitos neurotóxicos.

Essa avaliação seguiu a metodologia adotada por Costa (2013), com modificações, e consistiu em analisar a presença ou não de alterações respiratórias, digestivas e neurológicas com o objetivo de quantificar os efeitos da administração aguda sobre os parâmetros apresentados no **quadro 1**. A quantificação dos efeitos foi observada utilizando a seguinte classificação: (0): sem efeito, (-): efeito diminuído; (+): efeito presente e (++) : efeito intenso.

As alterações nas atividades normais dos camundongos e os seus pesos (g) foram monitorizados, além do peso da ração (g) e volume da água (mL) consumida e o peso das excretas (fezes e urina) produzidas (g), bem como a patologia clínica (hematologia e bioquímica) ao final do experimento, foram registradas (MALONE; ROBICHAUD, 1983; CUNHA et al., 2009).

No 14º dia após o início do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose de cetamina (0,1ml/10g; i.p.), seguindo-se as determinações da Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Foram então retirados e analisados macroscopicamente o coração, fígado, pulmão, baço, cérebro e rins dos animais.

Quadro 1 - Parâmetros das atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo e descrição para avaliação dos parâmetros.

Função	Parâmetro	Descrição para avaliação do parâmetro
SNC - Estimulante	Hiperatividade	Observar se os animais estão hiperativos e excitados.
	Irritabilidade e agressividade	Soprar o animal e tocá-lo levemente para examinar reação.
	Tremores	Observar se estão presentes ou não.
	Convulsão	Observar a presença ou não.
	Piloereção	Verificar se há eriçamento de pelos.
SNC - Depressora	Movimento intenso das vibrissas	Verificar aumento no movimento das vibrissas.
	Hipnose	Verificar se os animais dormem agrupados.
	Ptose	Olho fechado ou semi-fechado mesmo após estímulo.
	Sedação	Observar se o animal está quieto, sem movimento, mas se tocado responde ao estímulo.
	Anestesia	Ausência de resposta a estímulo doloroso.
	Ataxia	Observar se há irregularidades das ações musculares ou falta de coordenação destas ações.
	Reflexo de endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta à sua posição normal.
	Resposta ao toque diminuída	Tocar o animal com uma pinça e examinar as respostas.
Reflexo corneal	Aproximar um algodão, lentamente, até os olhos do animal e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los.	

	Reflexo auricular	Estalar os dedos para observar os reflexos.
SNA	Diarreia	Verificar presença ou não.
	Constipação	Verificar ausência de bolos fecais.
	Defecação aumentada	Verificar aumento dos bolos fecais.
	Respiração forçada	Observar se a respiração do animal está aumentada.
	Lacrimejamento	Examinar nos olhos dos animais a presença de secreção e tonalidade avermelhada.
	Micção	Verificar se há aumento de micção.
	Salivação	Verificar se há aumento da salivação.
	Tônus muscular	Retirar o animal da gaiola e verificar se a musculatura está flácida
	Força para agarrar	Avaliar a capacidade do animal em permanecer seguro à grade superior da gaiola.

Fonte: Adaptado de COSTA (2013).

Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com cetamina (0,1ml/10g; i.p.) e a coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca.

O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Os valores para hemácias, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio de um analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com MayGrunwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (MALONE, 1977; ROSIDAH et al., 2009).

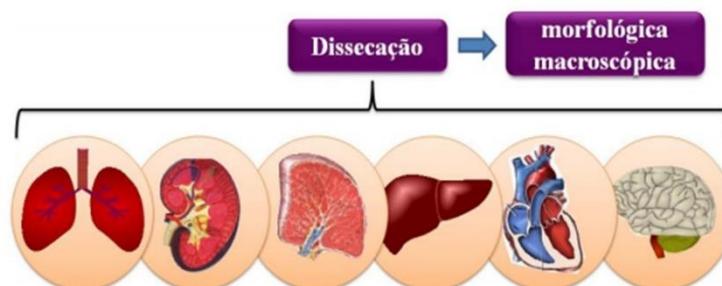
Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 r.p.m. durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e globulina. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest) com sistemas comerciais da Labtest® (MOHAMED et al., 2011).

Análise macroscópica dos órgãos

Após os 14 dias de observação do ensaio de toxicidade dose única do OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg, os animais receberam cetamina (0,1ml/10g; i.p.) e foi realizada a eutanásia. Para tanto, foi feita a análise morfológica macroscópica dos órgãos à vista desarmada com auxílio de lupa, além da pesagem do cérebro, fígado, pulmão, coração, rins e baço para determinar os pesos e verificar se houve ou não alteração morfológica macroscópica nos órgãos avaliados.

A condução experimental para realização dos testes de análise macroscópica dos órgãos está detalhada na **figura 2**.

Figura 2 - Esquema do estudo da realização dos testes de análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com OELO.



Fonte: SILVA (2014)

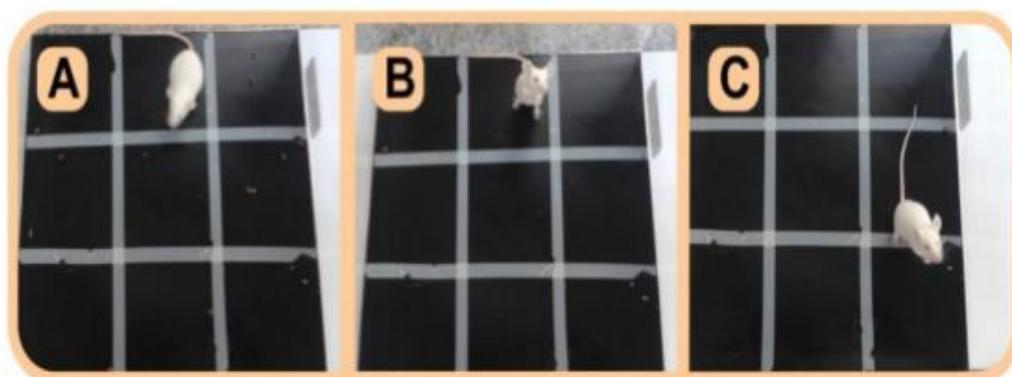
Avaliação geral preditiva da atividade do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO) no Sistema Nervoso Central (SNC) em camundongos

Teste de movimentação espontânea (Campo aberto)

Este teste é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973). Este método comportamental tem sido usado em animais de laboratório para avaliar o nível de excitabilidade, sugerindo que drogas que reduzem a locomoção tenham efeito inibitório. O método consiste em colocar o animal em um novo ambiente e a tendência dele é explorá-lo apesar do estresse provocado (AMOS et al., 2005; ALMEIDA et al., 2012).

O protocolo consiste em posicionar o animal no centro do aparato de campo aberto e registrar os comportamentos por meio da observação sistemática do pesquisador. Os parâmetros avaliados (**figura 3**) foram o número de cruzamentos nos quadrantes invadidos com as quatro patas pelo animal (crossing); o número de empinamentos do animal apoiado apenas sobre as patas traseiras (rearing) e o reflexo de autolimpeza do animal, no qual o roedor desliza as patas dianteiras nas vibrissas, orelhas e cabeça (grooming).

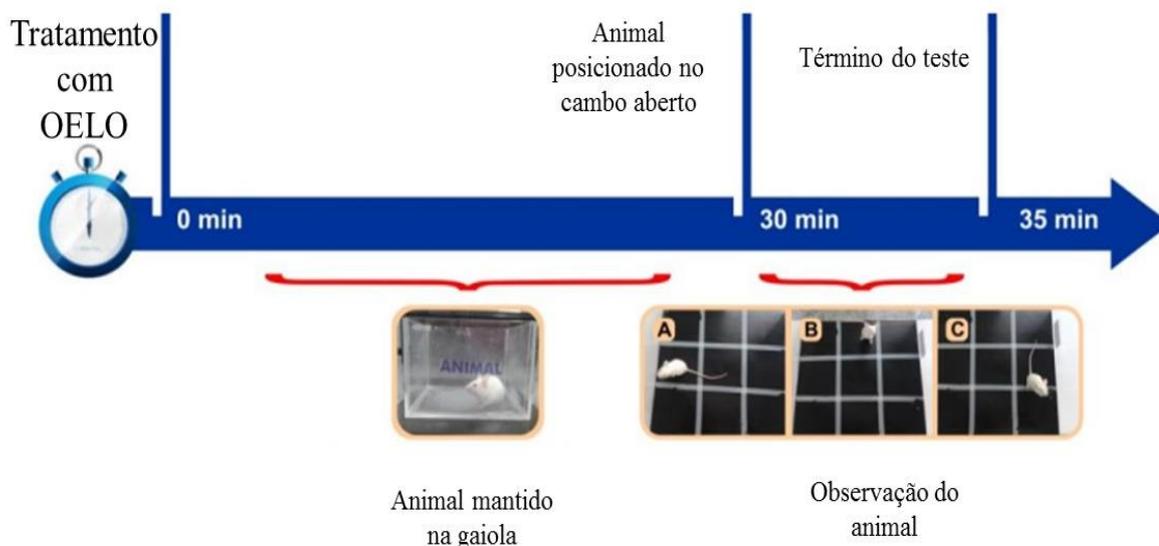
Figura 3 - Parâmetros observados no experimento do teste do campo aberto em camundongos tratados com OELO.



Legenda: (A) Animal realizando *Crossing*. (B) Animal efetuando *rearing*. (C) Animal fazendo *grooming*. **Fonte:** Autoria própria (2015).

No estudo do campo aberto os camundongos foram reunidos em três grupos de 3 animais (n=3), sendo um grupo controle tratado com veículo (*Tween* 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), dois grupos com OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg, respectivamente, todos por via oral. Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal foi submetido individualmente ao teste e observado por cinco minutos (**figura 4**).

Figura 4 - Protocolo experimental do OELO no teste do campo aberto.



Fonte: Autoria própria (2015).

Após a observação de cada animal foi realizada a limpeza da caixa com álcool 70% para remover quaisquer sujeiras que pudessem atrapalhar a deambulação espontânea ou observação do animal seguinte.

Teste de coordenação motora (barra giratória)

O teste da barra giratória (*rota rod*) foi inicialmente descrito por Dunham e Miya (1957) e validado por Carlini e Burgos (1979). Essa metodologia é útil para a triagem de drogas com possível atividade neurotóxica/miorrelaxante e consiste em avaliar a coordenação motora do animal, por meio do tempo de permanência deste em uma barra giratória (PEDERSEN et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012).

O pressuposto deste teste é que algumas drogas podem alterar a coordenação motora dos animais, podendo ser um indicativo de efeito indesejado da substância investigada.

Cada animal foi avaliado quanto ao número de quedas (até três quedas) e o tempo de permanência na barra giratória (DUNHAM; MIYA, 1957) (**figura 5**).

Figura 5 - Parâmetros observados no experimento do teste da barra giratória em camundongos tratados com o OELO.



Legenda: (A) Permanência do animal na barra. (B) Quedas do animal da barra.
Fonte: Arquivo pessoal (2015)

Neste estudo, os camundongos foram reunidos em três grupos de 3 animais ($n=3$), sendo um grupo controle tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), dois grupos com OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg, respectivamente, todos por via oral. Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal foi posicionado individualmente na barra giratória e a movimentação espontânea dos animais foi verificada (**figura 6**).

Figura 6 - Protocolo experimental do OELO no teste da barra giratória.



Fonte: Autoria própria (2015).

Após a observação de cada animal foi realizada a limpeza do equipamento com álcool 70%, para remover os bolos fecais que pudessem atrapalhar a movimentação do animal seguinte.

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc test*. Os dados foram analisados com o *GraphPad Prism* versão 5,01 *software*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos a $p < 0,005$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada pela primeira vez a toxicidade dose única (aguda) do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K. Para atingir esta meta, foi verificada, a princípio sua toxicidade aguda por meio da determinação dos sinais de toxicidade sistêmica, e em um segundo momento se determinou os efeitos sobre o aparelho locomotor e sobre a coordenação motora por meio do teste de campo aberto e o teste da barra giratória (rota rod), respectivamente, para verificar sua influência sobre o sistema nervoso central.

Esse estudo possui caráter relevante, pois o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K. se constitui em um produto potencial para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas que precisa inicialmente ser investigada quanto a sua segurança em ensaios não clínicos.

Ensaio de Toxicidade aguda do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO) – Teste de classes (OECD 423)

Na realização do ensaio de toxicidade aguda, realizado nas doses intermediária e máxima, sendo 300 e 2000 mg/kg, respectivamente, nenhum dos animais expostos apresentou mortalidade nas primeiras 24 horas ou durante todo o período do estudo no total de 14 dias, após exposição ao OELO.

A não mortalidade dos animais também foi considerada um dado positivo no estudo, o que confere segurança no uso desta substância em animais, gerando expectativas promissoras para estudos não clínicos em doses repetidas e posteriormente ensaios clínicos com as formulações que serão desenvolvidas.

Desta forma, pode-se afirmar que a toxicidade oral aguda do OELO é superior a 2000 mg/kg, e de acordo com o Guia 423 (OECD, 2001) a amostra é considerada praticamente atóxica quando apresenta um valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg ou entre 2000 e 5000 mg/kg, não aconselhando, neste caso, a realização do teste com a dose de 5000 mg/kg, em virtude da preservação à vida dos animais utilizados nos experimentos, bem como em função das dificuldades de solubilização e administração das amostras. Sendo assim, o OELO possui DL₅₀ maior que 2000 mg/kg, que segundo o Guia 423 da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), classifica-se como indeterminada.

Sarrazin et al. (2015) determinou também a dose letal do óleo de *L. origanoides*, na qual os resultados apresentaram uma DL₅₀ de 1673,84 mg/kg, indicando uma baixa toxicidade deste óleo, complementando os resultados deste estudo.

De acordo com Costa (2013) os testes que avaliam a toxicidade aguda de substâncias podem classificá-las de acordo com seu potencial de toxicidade ou letalidade, entretanto, para que os resultados sejam aceitos pelas agências regulatórias dos diversos países, se faz necessário que os protocolos seguidos sejam internacionalmente adotados (Globally Harmonised System - GHS), fazendo uso no caso dos guias publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

A avaliação das alterações orgânicas induzidas por novas drogas em animais representa um ponto fundamental para análise de segurança, antes que sejam realizados testes em humanos pela primeira vez. Na avaliação geral da toxicidade, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos e verificadas pelas reduções na massa corporal dos animais experimentais (LI et al., 2014), bem como por mudanças associadas a redução nos consumos de água e ração, as alterações de comportamento, como a presença de piloereção, diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral, dentre outros parâmetros presentes no *screening* hipocrático.

A respeito do *screening* hipocrático realizado, a administração de OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg, não alterou o comportamento dos animais dos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle, não tendo sido observados quaisquer sinais clínicos de toxicidade, se caracterizando por uma boa tolerabilidade em roedores. Corroborando com estes resultados têm-se o estudo de Andrade et al. (2014) no qual os parâmetros fisiológicos e comportamentais não sofreram alterações utilizando o óleo de *L. origanoides* via oral nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg.

Segundo Cunha et al. (2009) e Lucio et al. (2000), a metodologia observacional do *screening* hipocrático se constitui em um ensaio útil e comumente utilizado na triagem preliminar de plantas para detecção de possíveis atividades farmacológicas e toxicológicas, uma

vez que esta análise disponibiliza uma estimativa geral da toxicidade de uma substância sobre a espécie animal investigada, no tocante à disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo.

Desta forma, sugere-se que o OELO administrado de forma aguda é bem tolerado por via oral em camundongos fêmeas. Entretanto, embora seja um resultado promissor, deve-se considerar que o comportamento observado se enquadra em uma avaliação preliminar das possíveis propriedades tóxicas do OELO e que a mesma forneceu informações acerca dos riscos resultantes de uma única exposição, apenas em animais do sexo feminino.

Consumo de alimentos, produção de excretas e pesos corporais dos animais tratados com o OELO

Durante o período de tratamento com OELO foram analisados os consumos de água, ração e produção de excretas dos animais, cujos resultados demonstraram que em nenhuma das duas doses testadas, obtiveram alterações significativas em relação ao grupo controle (**Tabela 1**). Sobre esses parâmetros, resultados semelhantes foram observados por Abdullah et al., 2009 e Khan et al., 2011 com outros compostos naturais que usaram o mesmo método de estudo toxicológico.

Tabela 1 - Efeito da administração via oral (v.o.) do OELO em dose única sobre os hábitos fisiológicos diários dos animais.

Grupos n=3	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Produção de excretas (g)
Controle	23,54 ± 0,22	9,39 ± 0,32	3,22 ± 0,22
OELO 300	18,89 ± 2,22	7,10 ± 1,05	2,61 ± 0,38
OELO 2000	21,67 ± 0,1	9,54 ± 0,62	2,72 ± 0,49

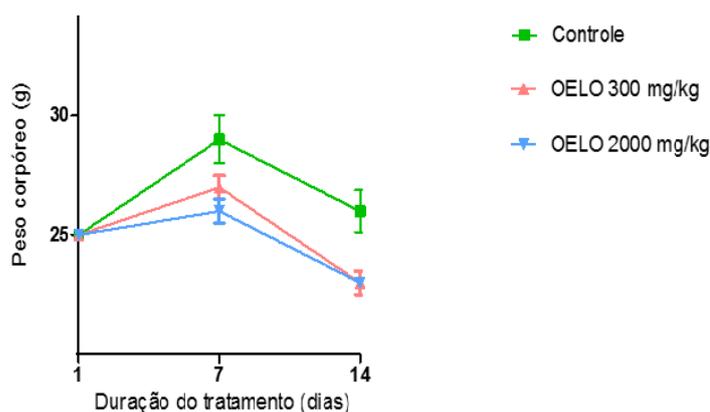
Médias do consumo de água, ração e produção de excretas dos camundongos tratados por via oral com OELO observados por 14 dias ($p < 0,05$ versus o controle). Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial de *Lippia origanoides* 300 e 2000 mg/kg). Os dados foram expressos como Média ± E.P.M. e análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* Student Newman Keuls como *post hoc* teste.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância administrada, o que possibilitou verificar que em

relação ao peso corporal dos animais, considerando ingestão, eliminação e pesagem dos mesmos, os resultados demonstraram que não houve mudanças significativas neste parâmetro, após o período agudo do tratamento ou com o aumento da dose administrada, havendo discretas diminuições conforme esses dois aspectos, mas sem significância estatística (**gráfico 1**) (DA SILVA et al., 2012).

Como regra geral, a maioria dos pesquisadores considera o aumento de peso ou perda de peso corporal de importância toxicológica se a redução é de pelo menos 10% a menos do que o valor do peso inicial do animal (HAYES, 2008; LU et al, 2014). Além disso, não há estudos comparativos sobre os efeitos dos diferentes níveis de doses do OELO em camundongos, em termos de peso corporal, o que reforça a necessidade do presente estudo.

Gráfico 1 - Efeito da administração do OELO em dose única sobre o peso corporal dos animais. Médias do peso corporal dos camundongos tratados com OELO observados por 14 dias ($p < 0,005$ versus o controle).



Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial de *Lippia origanoides* 300 e 2000 mg/kg). Os dados foram expressos como Média \pm E.P.M. e análise estatística foi realizada utilizando o teste t *Student-Newman Keuls* como *post hoc* teste.

Efeitos do OELO sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados

A avaliação dos parâmetros hematológicos pode ser utilizada na determinação da extensão dos efeitos deletérios de compostos químicos sobre os constituintes do sangue de um animal (ATTANAYAKE et al., 2013). O sistema hematopoiético constitui-se em um índice de extrema importância a respeito do estado fisiológico e patológico, tanto para animais quanto para seres humanos, já que é um sistema muito sensível a compostos tóxicos. Por isso, diversos parâmetros hematológicos importantes foram selecionados e incluídos neste estudo para avaliar a toxicidade do OELO sobre os mesmos.

Os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), plaquetas, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos não apresentaram diferença significativa, quando comparados ao controle (**tabela 2**). As fêmeas tratadas com 300 mg/kg de OELO apresentaram valores menores de concentração de neutrófilos e plaquetas em relação ao controle ($p < 0,005$), sugerindo que o OELO não produz alterações de importância clínica no perfil hematológico.

Tabela 2 - Efeitos do OELO por via oral após administração em dose única sobre os parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* fêmeas.

Parâmetros	Controle	OELO 300	OELO 2000
Hemácias (mm ³)	7,23 ± 0,21	6,16 ± 0,12	6,33 ± 0,46
Hemoglobina (g/dL)	9,66 ± 0,08	8,46 ± 0,08	8,7 ± 0,83
Hematócrito (%)	32,46 ± 0,80	27,33 ± 0,18	28,93 ± 1,93
VCM (fL)	45,00 ± 0,81	44,33 ± 0,88	45,66 ± 1,33
CHCM (%)	29,50 ± 0,60	30,83 ± 0,17	29,93 ± 0,78
Plaquetas (mm ³)	996,5 ± 0,50	913,00 ± 3,00 ^a	975,5 ± 0,50
Leucócitos (mm ³)	4,71 ± 0,07	2,57 ± 0,51 ^a	2,93 ± 0,71 ^a
Neutrófilos (%)	22,33 ± 4,80	11,66 ± 3,66 ^a	21,00 ± 1,00
Eosinófilos (%)	1,33 ± 0,33	1,33 ± 0,33	1,33 ± 0,88
Linfócitos (%)	76,33 ± 5,04	88,00 ± 4,00	78,00 ± 0,57

Legendas: VCM (Volume Corpuscular Médio); CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média); Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia organoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Os valores representam a média + E.P.M. (n=10). ^a $p < 0,005$ versus Controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Os eritrócitos são células essenciais para a manutenção da vida, tendo como função o carreamento e liberação de oxigênio para os tecidos. Uma formação deficiente da molécula de hemoglobina advém fundamentalmente de três fatores: deficiência de ferro por redução da ingestão ou absorção anormal; modificação da atividade normal dos macrófagos; e anormalidades renais que tendem a interferir na formação da eritropoietina (RODRIGUES et al., 2009).

O hematócrito é outro parâmetro que se refere a porcentagem de eritrócitos no sangue. Modificações na massa do eritrócito tendem a afetar o hematócrito e a hemoglobina (SOTO et al., 2008). Alguns estudos apresentam que monoterpenos, extrato e o óleo essencial extraído de plantas medicinais tais como a *Piper aduncum L.*, *Calendula officinalis L.*, *Spigelia anthelmia L.* e *Citrus limon B.*, não produzem alterações nos níveis de eritrócitos (SILVA et al., 2005; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; CAMPÊLO et al., 2011), o que corrobora com os resultados encontrados no estudo.

Outro parâmetro de importância é o índice de Hemoglobina Corpuscular Média que representa a quantidade média de hemoglobina por eritrócito, apresentando um valor limitado no diagnóstico diferencial das anemias, já que sua mensuração sofre alterações, estando diminuída em anemias microcítica e normocítica (WALLACH, 2009).

A avaliação das plaquetas é outro parâmetro de significativa importância, pois já se tem descrito na literatura casos de trombocitose em virtude da presença de doença crônica, deficiência de ferro, hiperadrenocorticismo, neoplasias e desordens no trato digestório. Por outro lado, uma produção de plaquetas pode estar diminuída em problemas relacionados à medula óssea (LOPES et al., 2007).

Os leucócitos se caracterizam por serem células originadas na medula óssea constituindo parte do sangue aliado aos eritrócitos e as plaquetas (FRANCO et al., 2008). Os neutrófilos são componentes da porção sanguínea com função de defesa ou imunidade do organismo, no qual sua concentração no sangue pode aumentar em virtude de infecções bacterianas e estar diminuída em outras doenças tal como a anemia falciforme (MALAFAIA; REZENDE, 2009). Dessa forma, trabalhos anteriores corroboram com o estudo, uma vez que também demonstram ausência de toxicidade pela avaliação dos parâmetros hematológicos (COSTA et al., 2011; HARIRI et al., 2011)

Os linfócitos são células diferenciais que representam um grupo heterogêneo de células morfológicas e funcionais, funcionando como base no processamento e execução da resposta imune. A linfocitose, geralmente, é ocasionada por infecções crônicas, doenças autoimunes e terapias com drogas, já a linfopenia pode estar relacionada aos efeitos de fármacos como os esteróides (FRANCO et al., 2008; WALLACH, 2009).

Por sua vez, nos parâmetros ureia, creatinina, alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e globulina não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 3**) entre os grupos tratados com OELO e o grupo controle ($p < 0,005$). No entanto, valores menores de creatinina e fosfatase alcalina foram identificados em animais tratados na dose de 300 mg/kg, em relação ao controle

($p < 0,005$), bem como uma diminuição no valor da alanina aminotransaminase (ALT) em animais tratados na dose de 2000 mg/kg, em relação ao controle ($p < 0,005$). Quanto aos valores para aspartato aminotransferase (AST), os camundongos tratados com as doses de 300 e 2000 mg/kg apresentaram maiores valores em comparação ao controle ($p < 0,005$). Apesar de ser considerada uma enzima marcadora de lesão hepática, é importante destacar que a AST se eleva em lesão hepática aguda, mas também está presente nas hemácias e músculos esqueléticos e cardíacos, não sendo então uma enzima específica do fígado (BAHIA et al., 2014).

Tabela 3 - Efeitos do OELO por via oral após administração em dose única sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* fêmeas.

Parâmetros	Controle	OELO 300	OELO 2000
Ureia (mg dL ⁻¹)	38,60 ± 4,74	39,30 ± 1,50	28,16 ± 0,67
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,195 ± 0,005	0,105 ± 0,005 ^a	0,250 ± 0,05 ^a
AST (U L ⁻¹)	133,35 ± 11,45	146,50 ± 18,80 ^a	145,05 ± 19,05 ^a
ALT (U L ⁻¹)	57,45 ± 10,65	55,05 ± 0,05	38,30 ± 2,40 ^a
Fosfatase alcalina (U L ⁻¹)	198,50 ± 0,50	157,50 ± 0,07 ^a	218,7 ± 0,14 ^a
Proteínas totais (g dL ⁻¹)	6,16 ± 0,17	5,90 ± 0,52	6,33 ± 0,67
Albumina (g dL ⁻¹)	2,60 ± 0,17	3,33 ± 0,28	2,76 ± 0,08
Globulina (g dL ⁻¹)	3,56 ± 0,31	2,56 ± 0,62	3,56 ± 0,76

Legendas: AST (Aspartato aminotransferase); ALT (Alanina aminotransferase). Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia organoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Os valores representam a média + E.P.M. (n=10). ^a $p < 0,005$ versus Controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Um parâmetro bioquímico importante na toxicidade aguda é a fosfatase alcalina, uma enzima mitocondrial encontrada em diversos tecidos, especialmente tecido ósseo, sistema hepatobiliar e mucosa gastrointestinal e em menor concentração nos rins, placenta e baço. Esta enzima é recomendada para avaliar a presença de colestase em animais (VALENTE et al., 2009).

A creatinina constitui-se em um composto orgânico nitrogenado não proteico com a função de proceder com o diagnóstico de lesões renais (VIEIRA et al., 2008). A ureia origina-se do metabolismo proteico (SPANNAUS et al., 2011), sendo que a determinação de sua

concentração é inespecífica quando se avalia a função renal, já que possui uma maior sensibilidade em alterações de grau primário (EMANUELLI et al., 2008).

Existem ainda os testes de função hepática, que incluem as enzimas hepáticas, compostas por variadas avaliações laboratoriais bioquímicas que são realizadas objetivando o fornecimento de informação a respeito do estado hepático de um paciente. A maioria das doenças hepáticas apresenta sintomatologia leve inicialmente, o que torna esses testes vitais para que tais doenças sejam detectadas precocemente (BAHIA et al., 2014).

Entre as enzimas citam-se a Alanina transaminase (ALT), também chamada transaminase glutâmica pirúvica sérica (SGPT ou TGP) ou alanina aminotransferase (ALAT), uma enzima presente nos hepatócitos. Quando há lesão celular, a ALT atinge a corrente sanguínea e seus níveis séricos podem, portanto, ser mensurados; Aspartato transaminase (AST), também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (SGOT ou TGO) ou aspartato aminotransferase (ASAT), é similar à ALT de modo que é outra enzima associada às células parenquimais do fígado (BAHIA et al., 2014).

Baseado nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos em camundongos fêmeas adultos pode ser sugerido que a administração do OELO não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros analisados de camundongos fêmeas Swiss adultos e pode ser usado de forma segura em outros ensaios não clínicos para estabelecer a toxicidade em outras espécies por um período maior de tempo e com doses repetidas do óleo.

No entanto, novos estudos precisam ser realizados para avaliar os efeitos desse óleo após o tratamento subcrônico e crônico para determinar a dose letal 50% (DL₅₀) e avaliar de forma mais detalhada se não há riscos quanto ao seu uso.

Análise morfológica macroscópica e pesos relativos dos órgãos de camundongos tratados com OELO

Na avaliação macroscópica dos órgãos removidos e estudados (cérebro, baço, coração, fígado, pulmão e rins) dos animais submetidos a tratamento dose única (aguda) com OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg não foram observadas alterações visuais significativas quando comparados ao grupo controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), o que reforça os achados nos demais parâmetros quanto à baixa toxicidade deste óleo.

Não ocorreu variação estatisticamente significativa nos pesos dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do OELO em relação ao grupo controle, após tratamento dose única (aguda) observados por 14 dias (**tabela 4**).

Tabela 4 - Pesagem dos órgãos tratados com óleo essencial de *Lippia organoides* (OELO) na

	Coração	Pulmão	Rim	Fígado	Cérebro	Baço
Controle (n=3)	0,175 ± 0,003	0,422 ± 0,102	0,486 ± 0,117	1,568 ± 0,437	0,478 ± 0,081	0,153 ± 0,028
300 mg/kg (n=3)	0,140 ± 0,006	0,340 ± 0,089	0,407 ± 0,045	1,332 ± 0,128	0,464 ± 0,031	0,140 ± 0,050
2000 mg/kg (n=3)	0,166 ± 0,034	0,530 ± 0,293	0,478 ± 0,091	1,615 ± 0,493	0,458 ± 0,038	0,231 ± 0,044

toxicidade aguda.

Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); Dados expressos em média ± desvio padrão com significância $p > 0,005$ e n = número de animais e análise estatística foi realizada utilizando o teste t *Student-Newman Keuls* como *post hoc* teste.

A investigação de efeitos tóxicos, sejam eles em dose única ou em doses repetidas, provocados por substâncias possivelmente farmacológicas, é de grande relevância, visto que podem interferir em vários mecanismos biológicos, inclusive na produção de células sanguíneas ou na lesão de órgãos nobres, que revelam papel importante nas funções vitais do organismo (KOTAN et al., 2008; AMENYA et al., 2011).

Avaliação geral preditiva da atividade do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. (OELO) no Sistema Nervoso Central (SNC) em camundongos

Efeito do OELO no teste da movimentação espontânea (Campo Aberto)

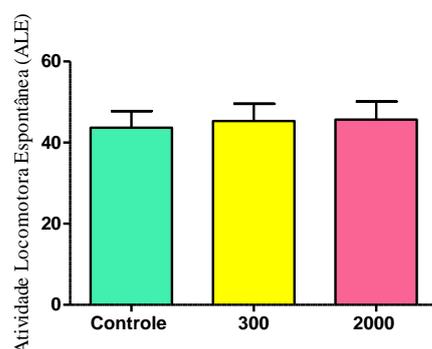
O teste do campo aberto é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais, como medida de emocionalidade em roedores (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (HEREDIA et al., 2014). Outro ponto verificado neste teste é que os animais parecem preferir a periferia ao centro do campo aberto, normalmente ambulados em contato com as paredes, apresentando tigmotaxia que estaria relacionada com a ansiedade no campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003; HSIAO et al., 2012).

Desta forma, o número de cruzamentos (locomoção), rearing e grooming em roedores, observados no teste do campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas. Para tanto, foi registrada a frequência de locomoção, que é o ato do animal se locomover com o tronco afastado

do chão por meio de movimentos coordenados das quatro patas, realizando deslocamento horizontal sobre a base do campo aberto nas quais o animal penetrou com as quatro patas.

Na análise da atividade locomotora espontânea (**figura 7**), os resultados demonstraram que o OELO não alterou a atividade locomotora em nenhuma das doses testadas 300 mg/Kg ($45,33 \pm 4,22$) e 2000 mg/Kg ($45,67 \pm 4,44$) quando comparadas com o grupo que recebeu somente o veículo ($43,67 \pm 4,09$) durante todo o tratamento.

Figura 7 - Efeito do OELO sobre a atividade locomotora espontânea dos animais no teste do campo aberto.



Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3). ^ap<0,005 versus controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

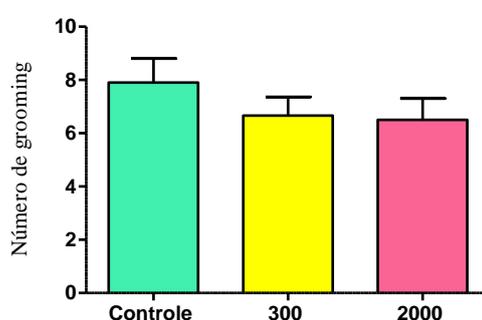
Dados da literatura demonstram que a redução na atividade exploratória espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade sobre o SNC (MANSUR et al., 1971; ALMEIDA et al., 2012) e, esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão sobre o SNC (CHIOCA et al., 2013). O efeito de diversas drogas tem sido investigado por meio do teste no campo aberto, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (benzodiazepinas, ligantes de serotonina), estimulantes (anfetamina, cocaína), sedativos (neurolepticos) ou indutoras de prostração (drogas antiepilépticas). O OELO nas doses utilizadas não interferiu na atividade psicomotora, sugerindo que não é capaz de produzir alterações sobre o SNC nos animais o que reforça a segurança deste composto em ensaios não clínicos (PRUT; BELZUNG, 2003; HSIAO et al., 2012).

Desta forma, os resultados de uma forma geral apresentaram que a atividade locomotora espontânea dos animais não é comprometida pela ação do OELO, demonstrando que o óleo não possui efeito excitatório e nem inibitório, já que não altera esse parâmetro comparado ao

controle, o que sugere que o OELO pode ser desprovido dos efeitos colaterais sobre o sistema nervoso central (SNC).

O reflexo de auto-limpeza do animal (*grooming*) também foi analisado neste teste (**figura 8**), não havendo alteração significativa nos grupos tratados com OELO nas doses testadas 300 mg/Kg ($6,66 \pm 0,70$) e 2000 mg/Kg ($6,50 \pm 0,80$) quando comparadas com o grupo que recebeu somente o veículo ($7,90 \pm 0,90$) durante todo o tratamento quando comparados ao grupo controle, sendo possível sugerir que o OELO não interfere na adaptação emocional a uma situação de tensão.

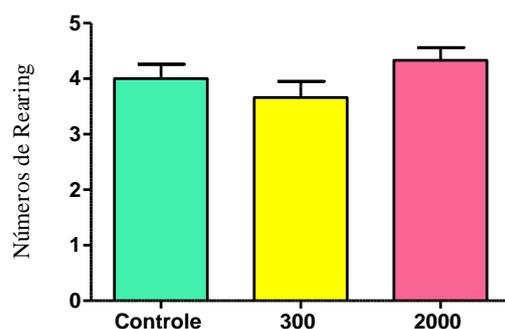
Figura 8 - Efeito do OELO sobre o *grooming* dos animais.



Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3). ^ap<0,005 versus controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O terceiro parâmetro analisado neste teste foi o número de empinamentos sob as patas traseiras (*rearing*) (**Figura 9**). Os resultados revelaram que o OELO nas duas doses testadas 300 mg/Kg ($3,66 \pm 0,29$) e 2000 mg/Kg ($4,33 \pm 0,23$) não alterou este parâmetro quando comparados ao grupo controle ($4,0 \pm 0,2$), sugerindo que o óleo não afeta a coordenação motora e pode ser desprovido dos efeitos colaterais sobre o sistema GABAérgico comumente observado em benzodiazepínicos (RUIZ et al., 2006; FIRMINO et al., 2011).

Figura 9 - Efeito do OELO sobre o *rearing* dos animais.



Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3). ^ap<0,005 versus controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Os resultados indicam que o mesmo não produz sedação, vista na maioria dos fármacos ansiolíticos. De acordo com os resultados observados, o OELO parece apresentar uma vantagem potencial diante de outros fármacos e/ou produtos naturais principalmente aqueles que atuam no SNC.

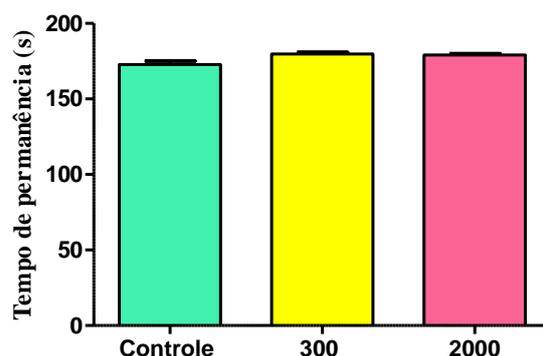
Efeito do OELO no teste de coordenação motora (Rota rod)

O teste da barra giratória consiste em medir o efeito de relaxamento muscular ou diminuição da coordenação motora do animal submetido a este teste (CARLINI; BURGOS, 1979; SHIOTSUKI et al., 2010), neste caso, quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra. Por sua vez, pode se ressaltar que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER; CARLINI, 1981; BARETTA et al., 2012).

Os camundongos adultos fêmeas foram tratados com OELO nas doses de 300 e 2000mg/kg por via oral e foram submetidos ao teste da barra giratória (rota rod), que se caracteriza por colocar camundongos sobre uma barra giratória a uma velocidade constante e verificar o tempo de permanência (TP) por meio da capacidade do animal de equilibrar-se sobre a mesma.

Em nenhuma das doses testadas durante todo período de observação (300 mg/kg: TP = 179,7 \pm 1,20 s; 2000 mg/kg: TP = 179,0 \pm 1,00 s) houve alteração no TP em segundos (s) sobre a barra giratória sugerindo que não induz mudanças na atividade locomotora dos animais quando comparado ao grupo veículo (TP = 172,7 \pm 2,4 s) (**Figura 10**).

Neste teste, a diferença no tempo de permanência e número de quedas entre grupos tratados com OELO e veículo foi tomado como índice de relaxamento muscular. Dessa forma, o OELO nas doses testadas (300 e 2000 mg/kg) não mostrou alterações psicomotoras, sugerindo possível segurança deste óleo o que amplia as informações sobre a toxicidade desta substância natural (NAGARAJA et al., 2012; LIU et al., 2012).

Figura 10 - Efeito do OELO sobre o tempo de permanência dos animais na barra giratória do Rota rod.

Controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3). ^ap<0,005 versus controle (ANOVA seguido pelo teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Também não foi verificada nenhuma alteração no número de quedas nos grupos tratados com OELO nas doses de 300 e 2000 mg/kg, v.o., quando comparado ao grupo controle, veículo (p<0,05), sugerindo que este óleo não produz efeito relaxante muscular e não altera a coordenação motora (**tabela 5**).

Tabela 5 - Efeito do OELO sobre o número de quedas dos animais.

Duração do tratamento	Grupos	Número de quedas
1 dia	Controle	1,0 \pm 1,52
	OELO 300	0,3 \pm 0,33
	OELO 2000	1,0 \pm 0,57
7 dias	Controle	1,6 \pm 1,20
	OELO 300	0,3 \pm 0,33
	OELO 2000	0,3 \pm 0,33
14 dias	Controle	2,0 \pm 3,05
	OELO 300	1,0 \pm 0,57
	OELO 2000	1,0 \pm 0,57

Veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); OELO (óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K. 300 e 2000 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3).

Este resultado sugere que o óleo não apresenta atividade miorelaxante. Diferentemente de outros óleos essenciais encontrados na literatura, que apresentam efeito relaxante muscular,

este em estudo, pode não influenciar a atividade locomotora de camundongos (DANTAS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2012). Estes dados sugerem que o OELO pode ser seguro, uma vez que é desprovido deste efeito colateral relacionado ao retardo psicomotor, comumente observado no tratamento com muitos fármacos. Além disso, é provável ser uma alternativa mais econômica e uma opção farmacoterapêutica mais tolerável.

CONCLUSÃO

O estudo realizado sobre a toxicidade em dose única (aguda) em camundongos comprovou que o óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. nas doses avaliadas não produz alterações nos parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos na toxicidade em dose única durante o período de 14 dias de observação, bem como não produz alteração morfológica nos principais órgãos, nem alterações no sistema nervoso central. No entanto, mais estudos sobre a toxicidade com doses repetidas deste óleo são necessários, para garantir seu uso de forma segura sem problemas relacionados à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N.R.; ISMAIL, Z.; ISMAIL, Z. Acute toxicity of *Orthosiphon stamineus* Benth standardized extract in sprague dawley rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 222-226, 2009.
- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 361-364, 2004.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.
- ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem farmacológica comportamental. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1a. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 131-137.

AMENYA, H.Z.; THOITHI G.N.; THAIYAH A.G.; MBARIA J.M.; GAHTUMBI P.K. In vitro and acute *in vivo* toxicity and of aqueous and chloroformic extracts of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in brine shrimp and Sprague Dawley rats. **The Kenya Veterinarian**, v. 35, p. 11-18, 2011.

AMOS, S.; ABBAH, J.; CHINDO, B.; EDMOND, I.; BINDA, L.; ADZU.; BUHARI, S.; ODUTOLA, A. A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Neuropharmacological effects of the aqueous extract of *Nauclea latifolia* root bark in rats and mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 53-57, 2005.

ANDRADE, V.A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153-1161, 2014.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n.1, p. 205-235, 1973.

ATTANAYAKE, A.P.; JAYATILAKA, K.A.P.W.; PATHIRANA, C.; MUDDUWA, L.K.B. Efficacy and toxicological evaluation of *Coccinia grandis* (Cucurbitaceae) extract in male *Wistar* rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 6, p. 460-466, 2013.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. **Texas Board of Nursing**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BAHIA, C.A.; GUIMARÃES, R.M.; ASMUS, C.I.R.F. Alterações nos marcadores hepáticos decorrentes da exposição ambiental a organoclorados no Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 22, n. 2, p. 133-141, 2014.

BARETTA, I.P.; FELIZARDO, R.A.; BIMBATO, V.F.; SANTOS, M.G.J.; KASSUYA, C. A.L.; GASPAROTTO JÚNIOR, A.; SILVA, C.R.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, J.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 46-54, 2012.

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 20, p. 1-7, 2014.

BETTEGA, P.V.C.; CZLUSNIAK, G.R.; PIVA, R.; NAMBA, E.L.; RIBAS, C.R.; GRÉGIO, A.M.T.; ROSA, E.A.R. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; JAGER, W.; PLANK, C.; DIETRICH, H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 6, p. 660-664, 1993.

CAMPELO, L.M.L. **Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**. 2011. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Piauí.

CAMPÊLO, L.M.L.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 623-627, 2011.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MELO, L.M.; NASCIMENTO, N.R.F.; TEXEIRA, P.G.M.; MENEZES, D.B.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L. Avaliação toxicológica do extrato acetato de etila de *Spigella anthelmia* Linn, em ratos e camundongos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 46-52, 2005.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v.1, p. 25-31, 1979.

CHIOCA, L.R.; ANTUNES, V.D.C.; FERRO, M.M.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. **Life Sciences**, v. 92, p. 971-975, 2013.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; SOUZA, G.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 303-310, 2011.

COSTA, E. V. M. **Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* Moldenke**. 2013. 142 f. Tese. (Doutorado em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2, p. 403-411, 2009.

DA SILVA, E.R.; DIEDRICH, D.; BOLZAN, R.C.; GIACOMELLI, S.R. Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice. **Brazilian Journal of Pharmacology Science**, v. 48, n. 2, p. 273-280, 2012.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DANTAS, M.C; DE OLIVEIRA, F.S.; BANDEIRA, S.M.; BATISTA, J.S.; SILVA, C.D.J.; ALVES, P.B.; ANTONIOLLI, A.R. MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 129– 133, 2004.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

EMANUELLI, M.P.; LOPES, S.T.A.; MACIEL, R.M.; GARMATZ, B.C.; TAVARES, M.O. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

FIRMINO, K. F.; ABREU, M.H.N.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S.M.S. Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1223-1232, 2011.

FRANCO, D.G.; SEGUNDO, J.P.; NARDO, C.D.D.; SUEIRO, F.A.R.; CASTRO, K.F.; DAGNONE, A.S. Leucemia canina: aspectos laboratoriais e clínicos-revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 15-18, 2008.

HARIRI A.T, MOALLEMB S.A, MAHMOUDI M, HOSSEINZADEHD H. The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. **Phytomedicine**, v.18, n. 6, p. 499-504, 2011.

HAYES, A. **Principles and Methods of Toxicology**. 5th ed. 2008.

HEREDIA, L.; TORRENTE, M.; COLOMINA, M. T.; DOMINGO, J. L. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, p. 108-114, 2014.

HSIAO, Y.-T.; YI, P.-L.; LI, C.-L.; CHANG, F.C. Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 373-384, 2012.

KHAN, M.I.; DENNY, K.M., MURALIDHARA, J.; RAMESH, H.P GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Acute, subacute and subchronic safety assessment of betalains rich *Rivina humilis* L. Berry juice in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3154-3157, 2011.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 240-249, 2006.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A.; KESDEK, M.; KAYA, Y.; KILIC, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 5-6, p.360-368, 2008.

LI, ZEHUI; QIAO, YUAN.; LI, JIANGUO.; AN, CHAO.; HU, KAIWEN.; TANG, MINKE. Acute and sub-chronic toxicity studies of the extract of *Thunberg Fritillary Bul*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, p. 370-377, 2014.

LIU, Z.; GAO, W.; MAN, S.; WANG, J.; LI, N.; YIN, S.; WA, S.; LIU, C. Pharmacological evaluation of sedative–hypnotic activity and gastro-intestinal toxicity of Rhizoma Paridis saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 67- 72, 2012.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.P.; SANTOS, A.P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

LU, L.; FAN, Y.; YAO, W.; XIE, W.; GUO, J.; YAN, Y.; YANG, F.; XU, L. Safety assessment of the fermented *Phylloporia ribis* (*Lonicera japonica* Thunb.) mycelia by oral acute toxicity study in mice and 90-day feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 18-24, 2014.

LUCIO, E.M.R.A; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; BRITO, A. R. M. S. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 10, p. 23-25, 2000.

MALAFAIA, G.; REZENDE, S.A. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*: uma breve discussão. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 4, n. 1, p. 38-44, 2009.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOLF, P. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological of therapeutical activity*, Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 23-53.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects od acute and chronic administration of cannabis satis and (-)9-*trans* tetrahy-drocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MOHAMED, E.A.H.; LIM, C.P.; EBRIKA, O.S.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A.; YAM, M.F. Toxicity evaluation of a standardized 50% etanol extract of *Orthosiphon stamineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 358-363, 2011.

NAGARAJA, T.S.; MAHMOOD, R.; KRISHNA, V.; THIPPESWAMY, B.S.; VEERAPUS, V.P. Evaluation of Anxiolytic effect of *Erythrina mysorensis* Gamb. in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 489, 2012.

OECD (**Organization of Economic Cooperation and Development's**). The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 423 Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, p. 1-14, 2001.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ, D.M.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal thnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PERDERSON, A.K.; THUN, J.; XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; STROM, M.; DEVOR, M.; LIDMAN, O.; FRIED, K. Automomy behavior correlates wint the DRG and spinal expression of sodium channels in inbred mouse strains. **Brain Research**, v. 1285, p. 1-13, 2009.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 28; n. 463(1-3), p. 3-33, 2003.

RODRIGUES, H.G.; BATISTA, M.T.A.; FONSECA, L.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2009.

ROLSETH, V.; DJURHUUS, R.; SVARDAL, A.M. Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells. **Toxicology**, v. 170, n. 2, p. 75-88, 2002.

ROSIDAH, Y.M.F.; SADIKUN, A.; AHMAD, M.; AKOWUAH, G.A.; ASMAWI, M.Z. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 244-249, 2009.

RUIZ, M.H.; JIMENEZ-FERRER, J.E.; LIMA, T.C.M.; AVILES-MONTES, D.; PEREZGARCIA, D.; GONZALEZ-CORTAZAR, M.; TORTORIELLO, J. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. **Phytomedicine**, v.13, p. 23-28, 2006.

SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.D.; CITO, A.M.G.L.; OLIVEIRA, A.E.H.B.; LIMA, S.G.; REIS, F.A.M. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 504-506, 2004.

SANTOS, P.S.; FREITAS, R.M. Atividades ansiolítica e anticonvulsivante de constituintes de óleos essenciais. **Revista Interdisciplinar**, v. 6, p. 105-111, 2013.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 145-152, 2015.

SHIOTSUKI, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K., TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rota rod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, p. 180-185, 2010.

SIELGEL, P.S.; SILVA, M.G.B.; ARAGÃO, T.P.; VASCONCELOS, C.F.B.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; COSTA, I.M.A.; COSTA-SILVA, J.H.; WANDERLEY, A.G.; A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **Journal of Psychology**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SILVA, E.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; SOUSA, I.M.V.; DIMECH, G.S.; FRANCA, M.C.C.A.; COELHO, M.C.O.C.; WANDERLEY, A.G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SOTO, J.C.H.; OLIVEIRA, R.G.; MENEGUETI, V.C.; SACCO, S.R. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, p. 1-7, 2008.

SOUSA, D.P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233- 2252, 2011.

SPANAU, K.; KOLLERITS, B.; RITZ, E.; HERSBERGER, M.; KRONENBERG, F.; ECKARDSTEIN, A.V. Serum creatinine, cystatin C, and β -trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2011.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; RUÍZ, C.A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J S Science**, v. 33, p. 93-103, 2010.

VALENTE, P.P.; CATTELAN, J. W.; SANTANA, A. E.; MALHEIROS, E.B.; DUARTE, C.A.; RASERA, L.; AITA, A.C. Concentrações de fibrinogênio plasmático, fosfatase alcalina sérica e do fibrinogênio e fosfatase alcalina no fluido peritoneal de quinos submetidos à enterorragias aposicional e invaginante no cólon descendente. **Nucleus Animalium**, v. 1 n. 2, p. 95-106, 2009.

VEIGA JÚNIOR, V.F.J. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

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

VIEIRA, R.P.; FRANÇA, R.F.; CARVALHO, C.R.F.; DOLHNIKOFF, M.; RIBEIRO, W.; MARTINS, R.A.B.L. Efeitos da suplementação oral com creatina sobre o metabolismo e a morfologia hepática em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 1, p. 38-41, 2008.

WALLACH, J. **Interpretação de exames laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009, 1465 p.

*Avaliação do potencial antioxidante in vitro do óleo essencial da
Lippia origanoides H.B.K.*

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do óleo essencial da *Lippia origanoides***H.B.K.****RODRIGUES, AMX^{1,3}; SANTOS, BNG²; CARVALHO, MGFM¹; FREITAS, RM^{1,3}; SOUSA, TO⁴; CITÓ, AMGL^{1,4}**

¹ Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³ Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

O estresse oxidativo constitui-se em uma ameaça constante para o organismo. Em virtude disto, uma série de defesas antioxidantes, além de sistemas de reparo em células evoluíram com o objetivo de proteção contra a destruição e danos ocasionados pelos radicais livres. As plantas produzem uma enorme variedade de antioxidantes que tendem a agir contra o dano celular por meio da remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK), família Verbenaceae, é um arbusto aromático conhecido como “Alecrim-do-campo”, sendo responsável por variadas atividades farmacológicas e biológicas, inclusive a proteção antioxidante. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do óleo essencial extraído das partes aéreas da *L. origanoides* coletada no estado do Piauí, Brasil. Para tanto, foram realizados ensaios *in vitro* pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, radical hidroxila e óxido nítrico. Além disto, foi verificada sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica (TBARS) por meio da determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, bem como o seu potencial redutor nas concentrações de 100, 300 e 900 µM. Todas as concentrações apresentaram atividade antioxidante sendo que o potencial redutor, as reduções da produção de TBARS e inibição do radical DPPH• mostraram-se superiores ao controle positivo, o ácido ascórbico, evidenciando uma alta presença de substâncias antioxidante que possuem capacidade de reduzir tais substâncias. Estes resultados sugerem que esta espécie é promissora para a produção de fitoterápico onde a atividade antioxidante seja de ação desejada.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, *p*-cimeno, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Oxidative stress is a constant threat to the organism. Because of this, a number of antioxidant defenses, besides repair systems in cells have evolved in order to protect against the destruction and damage caused by free radicals. The Plants produce an enormous variety of antioxidants leaning to act against cell damage by removing reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNSs). The *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland and Kunth (HBK), Verbenaceae family, is an aromatic shrub known as "Rosemary-the-field", accountable for various pharmacological and biological activities including antioxidant protection. Therefore it was evaluated in vitro antioxidant potential by 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, hydroxyl radical and nitric oxide. Moreover, it was verified your capacity to inhibit lipid peroxidation (TBARS) by determining substances reactive with thiobarbituric acid, as well your potential reducer on concentrations of 100, 300 and 900 μM . All concentrations submitted antioxidant activity with potential reductor, the reductions of production of TBARS and inhibition of radical DPPH • proved superior to the positive control, ascorbic acid, indicating a high presence of antioxidant substances having ability to reduce such substances. These results suggest that this species is promising for the production of herbal where antioxidant activity is a desired action.

Keywords: *Lippia origanoides*, essential oil, *p*-cimeno, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

O processo oxidativo é um procedimento químico e metabólico que induz à produção de energia essencial às atividades necessárias para as células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células ativas induz também a produção de radicais denominados oxidantes, compostos estes produzidos de forma normal por via metabolismo corporal e, caso não sejam controlados, tendem a provocar danos profundos. Nesta perspectiva, os chamados antioxidantes caracterizam-se por serem substâncias que provocam um retardamento na velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, tais como a inibição de radicais livres e a complexação de metais (CHO et al., 2011; SLYVKA et al., 2011).

Substâncias com as características citadas acima protegem as células contra os efeitos danosos ocasionados por espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs), mais conhecidos como radicais livres, exemplificados pelo oxigênio singlete, superóxido e radicais peroxila, hidroxila e espécies reativas de derivados de nitrogênio. O desbalanceamento entre a geração e a remoção destas substâncias no organismo pode ocorrer em virtude da diminuição dos antioxidantes endógenos devido à menor formação ou ao maior consumo, ou do aumento da geração de radicais livres, ocasionando um estado pró-oxidante conhecido como estresse oxidativo (HAIDA, 2011).

O estresse oxidativo se caracteriza por ser uma condição tanto celular como fisiológica, com elevada concentração de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) ocasionando danos moleculares às estruturas celulares. Este estado de estresse tem sido relacionado à instalação e progressão de variadas doenças degenerativas, por meio de mutações do DNA, oxidação proteica e peroxidação lipídica com alterações funcionais consequentes e prejuízo das funções vitais em muitos tecidos ou órgãos (VERMA et al., 2010).

No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo sofre variações de forma considerável de um ser vivo para o outro, em virtude da idade, estado fisiológico e dieta, associando-se ainda ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, tais como o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas, Alzheimer e Parkinson, além de estar relacionado com o processo de envelhecimento, inflamações crônicas, transtornos mentais, artrites, diminuição do sistema imune, aterosclerose, fibrose e cirrose (BOLIGON, 2010; KO et al., 2010; DEAN et al., 2009; SALUSTRI et al., 2010).

O estresse oxidativo constitui-se em uma ameaça constante para o organismo, em virtude disto, uma série de defesas antioxidantes, além de sistemas de reparo em células evoluíram com o objetivo de proteção contra a destruição e danos ocasionados pelos radicais

livres. Dessa forma, podem ser citadas algumas enzimas que promovem a desintoxicação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, dentre elas a superóxido dismutase (SOD), juntamente com catalase e glutatona peroxidase, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

As plantas produzem uma enorme variedade de antioxidantes que tendem a agir contra o dano celular por meio da remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Em virtude da grande variedade de flora medicinal, especialmente na biodiversidade brasileira, muitos estudos estão sendo produzidos enfocando a atividade antioxidante exercida pelos compostos naturais em sistemas biológicos (SILVA et al., 2012; AGRA et al., 2008).

A *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK), família Verbenaceae, é um arbusto aromático nativo da América Central, norte da América do Sul, especialmente na região amazônica e Antilhas. Na Colômbia é conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida como “Alecrim-do-campo”, amplamente dispersa na região, sendo responsáveis por várias atividades farmacológicas e biológicas, inclusive a proteção antioxidante (SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al, 2010).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar a capacidade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. por métodos que utilizam radicais não biológicos como 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), bem como pelo potencial redutor, além dos métodos que utilizam radicais biológicos como radicais hidroxila (OH•), óxido nítrico (NO•) e peroxidação lipídica através do método TBARS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

A coleta das folhas de *L. origanoides* H.B.K. foi realizada no mês de maio de 2013, no município de José de Freitas (latitude 04°45'23" sul e longitude 42°34'32" oeste), Piauí, Brasil e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário “Graziela Barroso” do departamento de biologia da Universidade Federal do Piauí sob o número TEPB 09205.

As partes aéreas de *Lippia origanoides* H.B.K. (500,0 g) foram submetidas à extração por hidrodestilação por um período de 4 h, em aparelho de tipo Clevenger modificado acoplado a um balão de 5L.

Avaliação antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

Avaliação da capacidade antioxidante do óleo (OELO) pelo sequestro do radical DPPH•

Para o método DPPH•, foi utilizada a metodologia descrita por SILVA; MENEZES; ELEUTHERIO (2005) conforme é apresentado na **figura 1**, com modificações. Resumidamente, uma mistura reacional contendo o OELO nas concentrações (100, 300 e 900 µM) adicionado à 2,7 mL da solução estoque de DPPH• (40 µg/mL) foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 minutos, com leitura realizada em espectrofotômetro a 517 nm.

A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores das absorbâncias foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH• pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}\bullet = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH• e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura reacional contendo o radical DPPH• e as concentrações do OELO.

A concentração inibitória efetiva (CE_{50}) do óleo necessária para inibir o radical DPPH• em 50% a 517 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental para o OELO também foi utilizado com o controle positivo (padrão) Ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações.

Figura 1 - Representação do método do radical DPPH•



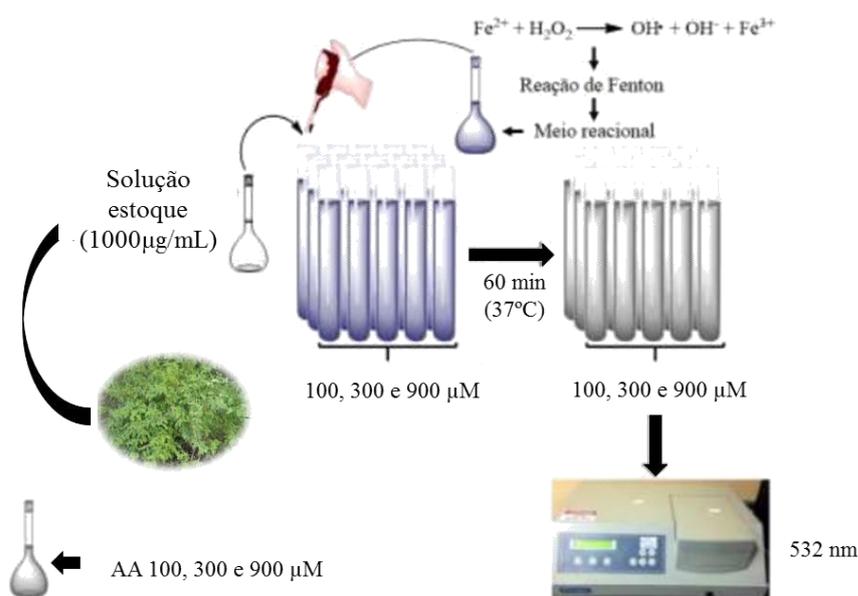
Fonte: Adaptação de SILVA; MENEZES; ELEUTHERIO (2005).

Avaliação da capacidade antioxidante do óleo (OELO) pelo sequestro do radical hidroxila (OH•)

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila gerado pela reação de Fenton, foi utilizada a metodologia descrita por Lopes e colaboradores (1999), com modificações, conforme pode ser observado na **figura 2**. De forma geral e resumida, algumas concentrações do OELO (100, 300 e 900 μM) foi adicionado a mistura da reação de Fenton contendo 6 mM de FeSO_4 , 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi realizada durante 15 minutos a temperatura ambiente e estancada pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de ácido tiobarbitúrico (ATB) (w/v, em NaOH 50 mM).

Depois, a mistura reacional foi aquecida durante 1 hora a 37 °C e então arrefecida a temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorbâncias mensuradas em um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem como degradação da 2-desoxirribose. A concentração inibitória efetiva (CE_{50}) do óleo necessário para inibir a degradação da 2-desoxirribose em 50% a 532 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental para o OELO também foi utilizado como controle positivo (padrão) Ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações.

Figura 2 - Representação do método radical hidroxila (OH•)



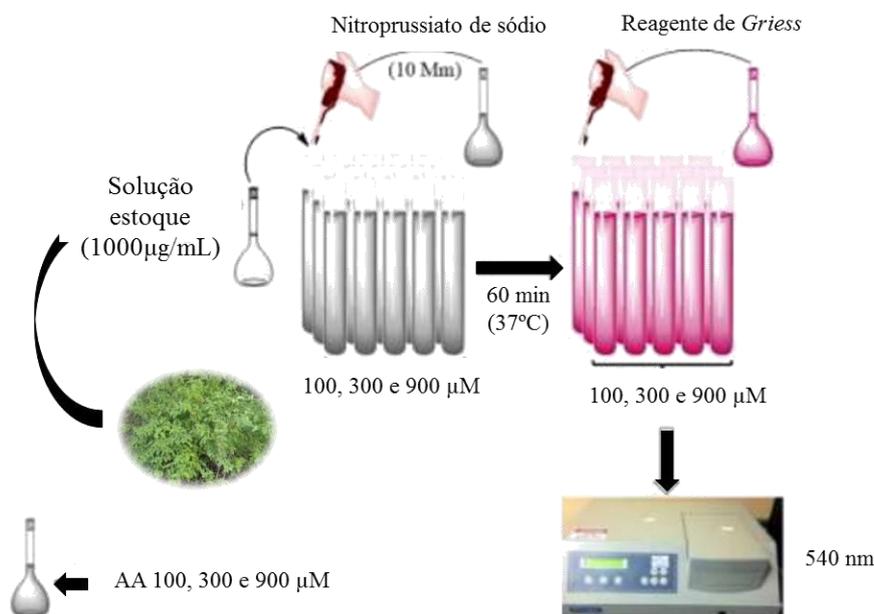
Fonte: Adaptação de Lopes e colaboradores (1999).

Avaliação da capacidade antioxidante do óleo (OELO) pela inibição do Oxido nítrico ($\text{NO}_2\bullet$)

Neste procedimento avaliativo, o óxido nítrico originou-se a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess de acordo como o método de Basu e Hazra (2006), apresentado na **figura 3**.

A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em tampão fosfato nas concentrações do OELO (2,36; 4,72; 7,08 e 14,16 mM) foi incubada a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro e os resultados foram expressos em porcentagem como inibição da formação de íons nitrito. A concentração inibitória efetiva (CE50) do óleo necessário para inibir o oxido nítrico em 50% a 540 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental para o OELO também foi utilizado com o controle positivo (padrão) Ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações.

Figura 3 - Representação do método de inibição do Oxido nítrico ($\text{NO}_2\bullet$)



Fonte: Adaptação de BASU; HAZRA (2006).

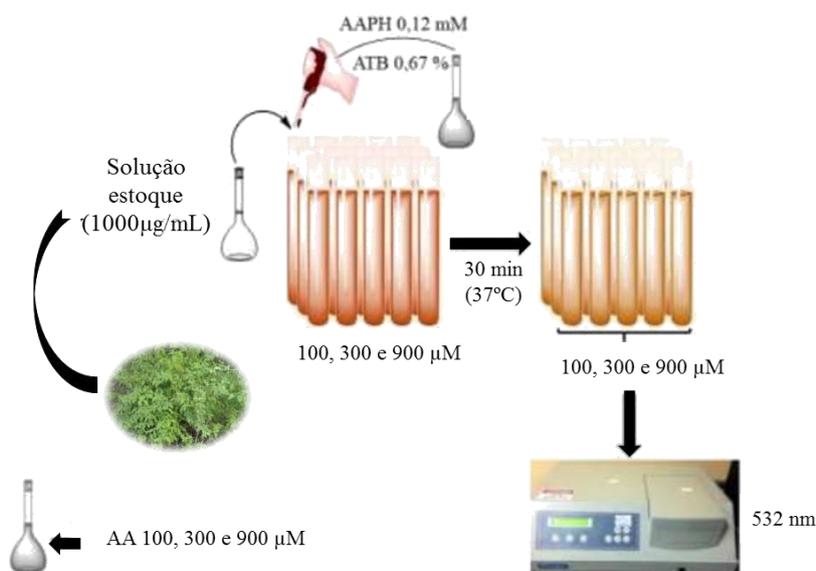
Avaliação da capacidade antioxidante do óleo (OELO) pela inibição da peroxidação lipídica (níveis de TBARS)

Para a determinação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, foi utilizado o método TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico) segundo Guimarães e colaboradores (2010), apresentado na **figura 4**. O homogenato da gema de ovo (1% w/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) foi utilizado como um substrato rico em lipídios. Uma alíquota de 0,5 mL do substrato foi sonicado e homogeneizado nas diferentes concentrações do OELO (100, 300 e 900 μ M) e a peroxidação lipídica induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida 0,12 M).

O experimento foi realizado em triplicata e a reação foi realizada durante 30 minutos a 37 °C. Após resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecido a 97 °C por 15 minutos.

Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm e os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em porcentagem como níveis de TBARS formado pelo AAPH. A concentração efetiva (CE_{50}) do óleo necessário para inibir a peroxidação lipídica em 50% a 532 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental para o OELO também foi utilizado com o controle positivo (padrão) Ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações.

Figura 4 - Representação do método da peroxidação lipídica (níveis de TBARS).



Fonte: Adaptação de Guimarães e colaboradores (2010).

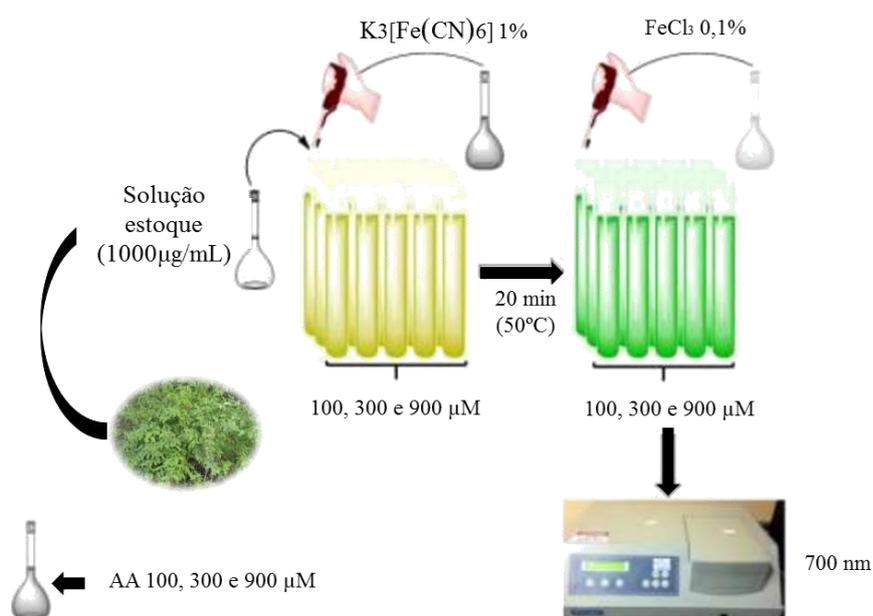
Avaliação do poder redutor do óleo (OELO)

Para a determinação do poder redutor do OELO pela redução direta do ferricianeto de potássio (F_{3+}) para ferrocianeto de potássio (F_{2+}), foi utilizada a metodologia descrita por Singhal e colaboradores (2014), de acordo com a **figura 5**, com modificações. A princípio, foi preparado uma mistura reacional contendo as concentrações de 100, 300 e 900 μM do OELO, 1 mL de ferricianeto de potássio 1% e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6.6).

O controle negativo contém todos os reagentes, exceto as concentrações do OELO. A mistura reacional foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, seguido pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10% para ser centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante da mistura reacional foi misturados com 1 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 700 nm contra branco que continham apenas tampão de fosfato e o aumento da absorbância demonstra o poder redutor do OELO. A concentração do óleo que proporciona um aumento de 0,5 de absorbância (CE_{50}) foi calculada de acordo com concentração de 100, 300 e 900 μM . O mesmo procedimento experimental para o OELO também foi utilizado com o controle positivo (padrão) Ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações.

Figura 5 - Representação da avaliação do potencial redutor.



Fonte: Adaptação de Singhal e colaboradores (2014).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida de *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc test*. Os dados foram analisados com o *GraphPad Prism* versão 5,01 *software*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos a $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (OELO)

O potencial antioxidante do OELO justifica-se no fato de que o mesmo apresenta substâncias que podem estar relacionadas com o poder antioxidante. De acordo com Pratt e Hudson (1992) esta atividade presente em fontes naturais decorre de compostos ativos presentes nas plantas, que podem ser encontrados em madeira, casca, caule, folhas, frutos, raízes, flores e sementes.

Investigações sobre a composição química da *L. origanoides* H.B.K. mostraram que esta é rica em compostos fenólicos ou polifenólicos, por exemplo, tocoferóis, flavonoides, dentre outras substâncias naturais que despertam grande interesse devido às atividades farmacológicas que apresentam. As atividades antioxidantes dos fenóis decorrem da presença de grupamentos hidroxilas e de suas propriedades de oxirredução, permitindo agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, além de eliminar oxigênio singlete (SOUSA et al., 2007; GUERRA, 2001).

Os flavonóides também são responsáveis por inibir a oxidação do ácido linoleico, oxidação de LDL, peroxidação de fosfolípidos da membrana, peroxidação lipídica microsomal e mitocondrial, peroxidação de eritrócitos e fotoxidação e peroxidação de cloroplastos (ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2003; SANTANAM et al., 2004). Nas pesquisas bibliográficas realizadas por Heim et al., (2002) são citadas diversas ações de flavonoides como antioxidantes, relacionando a química, metabolismo e a relação estrutura atividade.

O desenvolvimento de novos fitoterápicos que exibem poucos efeitos tóxicos e que apresentam atividade farmacológica como a capacidade antioxidante tem sido um importante objeto de estudo, uma vez que é terapêutica farmacológica atual para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington, epilepsia e alguns tipos

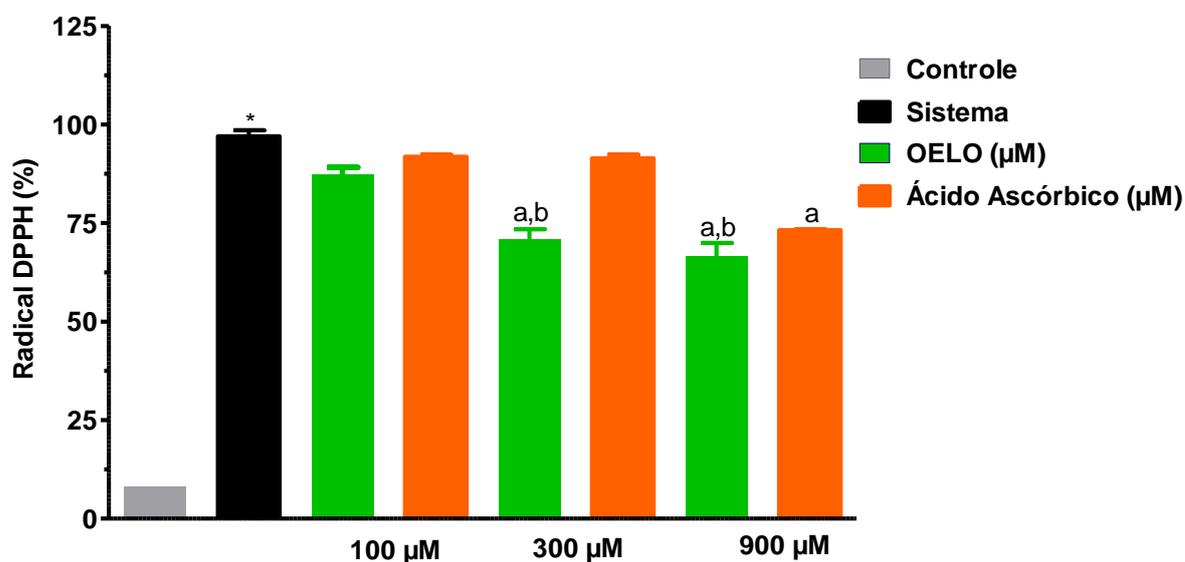
de neoplasias pode ser realizada devido às propriedades antioxidantes de muitos compostos naturais e/ou sintéticos (REED, 2011). Além do que, compostos com ação antioxidante podem retardar o envelhecimento (COSTA, et al., 2012). Diante disso, a busca por novos agentes antioxidantes é extremamente importante e atualmente é objeto de interesse em novas pesquisas.

Capacidade antioxidante do óleo (OELO) pelo sequestro do radical DPPH•

Os resultados da atividade antioxidante correspondente ao sequestro do radical DPPH pelo OELO em diferentes concentrações estão representados no **gráfico 1**. Os valores da capacidade antioxidante do OELO frente ao radical DPPH• nas concentrações de 100, 300 e 900 μM foram respectivamente de $12,65 \pm 1,70$; $29,15 \pm 2,62$ e $33,48 \pm 3,40\%$, na qual reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração da solução do radical DPPH• (sistema). Nas mesmas condições experimentais o Ácido Ascórbico (AA) apresentou capacidade antioxidante de $8,18 \pm 0,49$, $8,59 \pm 0,89$ e $26,81 \pm 0,26\%$, respectivamente.

De acordo com os resultados contra o radical DPPH•, a CE_{50} do OELO de 125,4 μM , se apresentando menor que a CE_{50} do AA com 315,3 μM .

Gráfico 1 - Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações na inibição do radical DPPH•.

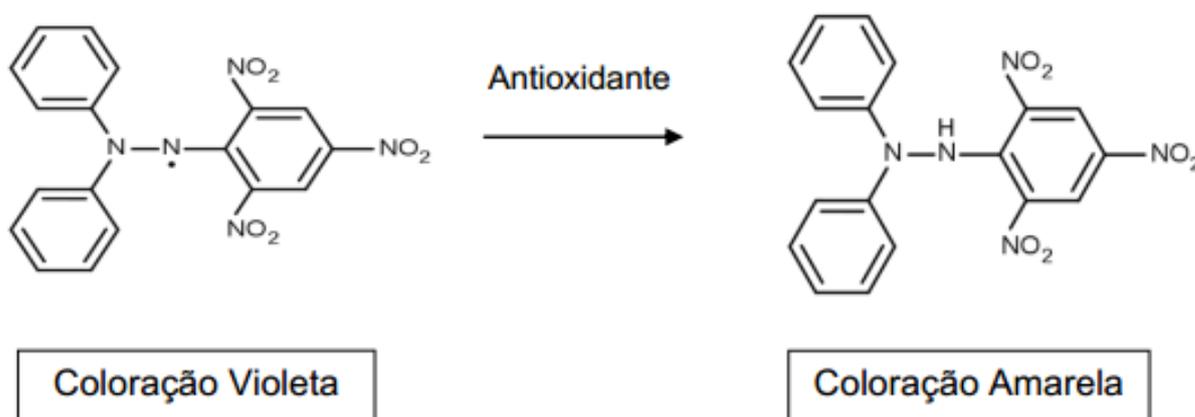


Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição in vitro, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O Ácido ascórbico (100 - 900) foi usado como padrão antioxidante. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,001$ em relação ao sistema (solução de radical DPPH•); ^bquando comparados ao padrão AA.

De acordo com Raymundo et al. (2004), Chandrasekar et al. (2006) e Kim e Thomas (2006) esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm.

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional, como pode ser observado na **figura 6**.

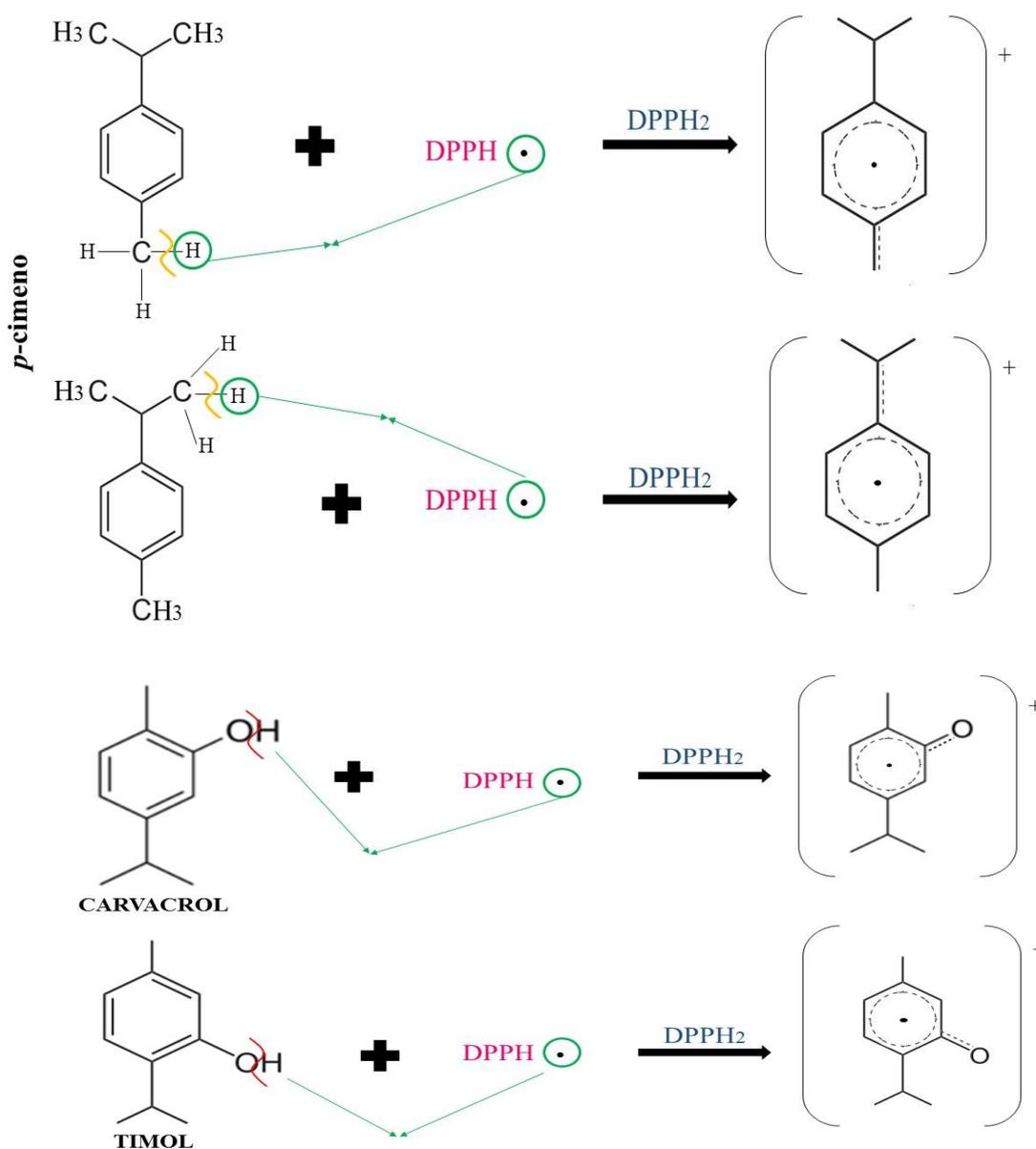
Figura 6 - Reação entre o radical DPPH• e um composto antioxidante



Com base neste princípio, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o OELO nas concentrações de 300 e 900 μM se apresentou como um potente antioxidante. Quando os resultados são comparados com o padrão ácido ascórbico se observa que o óleo em todas as concentrações se demonstrou mais eficiente no sequestro do radical DPPH em comparação ao padrão nas mesmas concentrações. Estes resultados também podem ser comparados com os resultados obtidos por Sarrazin et al. (2015) que avaliou o potencial antioxidante da *L. origanoides* quanto ao sequestro do radical DPPH nas doses de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ obtendo resultados significativos com redução de 15 a 82%, respectivamente. Sendo que a CE_{50} foi de $23 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$, inferindo que o óleo interage com o radical DPPH por transferência de elétrons, neutralizando os radicais livres.

A capacidade antioxidante demonstrado pelo OELO contra o radical DPPH• pode ocorrer em virtude da estrutura exibida por seus majoritários (timol, caracrol e *p*-cimeno,) que apresentam duas posições benzílicas permitindo a doação de um átomo de hidrogênio radicalar com facilidade formando uma molécula estável de DPPH₂ e um radical benzílico estabilizado pelos elétrons π do anel aromático. O timol e carvacrol, são melhores antioxidantes que *p*-cimeno, pois além dos hidrogênios nas posições benzílicas semelhante ao *p*-cimeno, também possuem uma radical hidroxila cujo hidrogênio é facilmente removível, permitindo a doação de um hidrogênio radicalar, como proposto pela **Figura 7**.

Figura 7 - Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) com o radical DPPH•.



Fonte: autoria própria, 2015

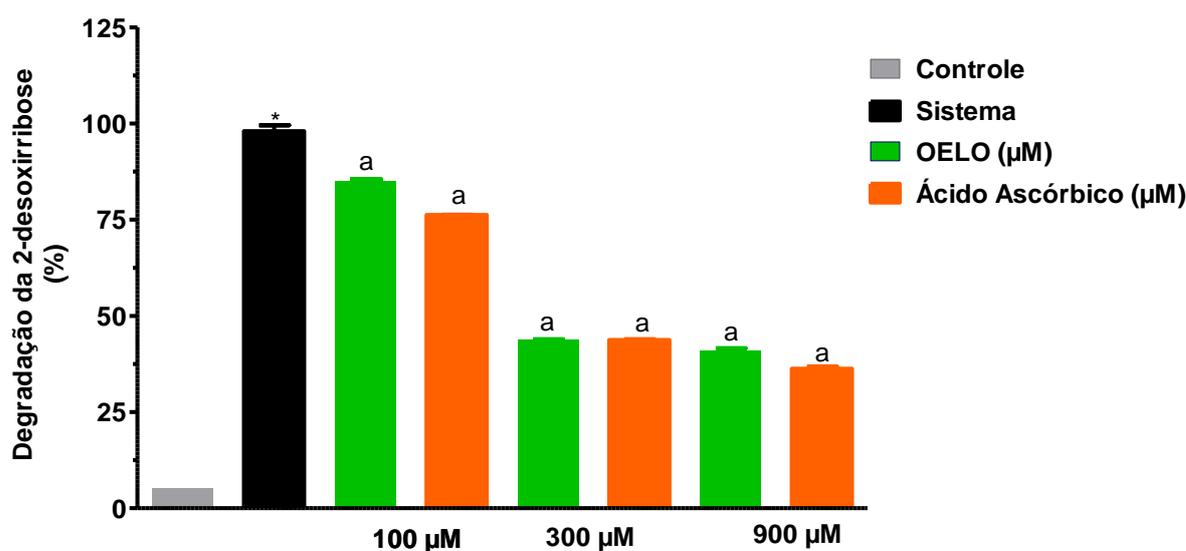
Capacidade antioxidante do óleo (OELO) pelo sequestro do radical hidroxila (OH•)

No presente estudo, os radicais hidroxila foram gerados a partir da reação de Fenton (LOPES et al., 1999) e como mostrado no **gráfico 2**, o OELO conseguiu atuar na inibição da degradação da 2-deoxirribose pela eliminação de radicais hidroxila de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao sistema.

Nas concentrações de 100, 300 e 900 μM ., o composto apresentou capacidade de $15,11 \pm 0,51$; $56,26 \pm 0,16$ e $59,03 \pm 0,59\%$, respectivamente. Nas mesmas condições experimentais o ÁA demonstrou capacidade antioxidante também inibindo a degradação de 2-deoxirribose em $23,75 \pm 0,06$; $56,26 \pm 0,16$ e $63,71 \pm 0,49\%$, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos na inibição da degradação da 2-deoxirribose, o valor da CE_{50} foi de 133,3 μM e 125,1 μM para OELO e AA, respectivamente.

Gráfico 2 - Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações na remoção de radicais hidroxilas.



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição in vitro, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O Ácido ascórbico (100 - 900) foi usado como padrão antioxidante. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (Radical Hidroxila).

Os radicais hidroxilas originam-se sob condições fisiológicas e patológicas e promovem a homeostase a nível celular em tecidos normais e saudáveis, além de estarem intimamente ligados a vários modelos de patologia, supostamente implicadas pelo estresse oxidativo. O radical hidroxila

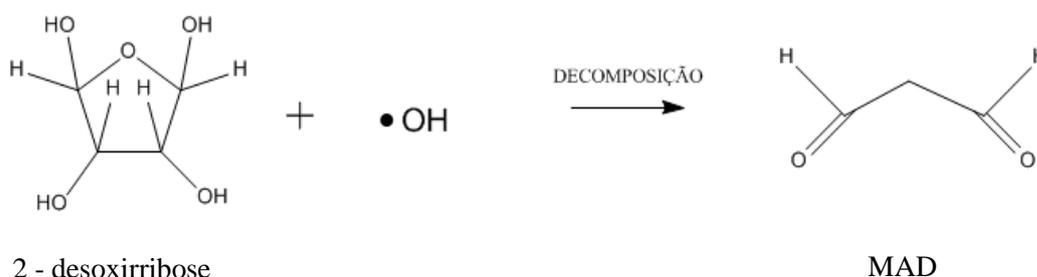
é gerado pela reação de Fenton, onde na presença do radical hidroxila, a 2-desoxirribose é degradada à malonaldeído, posteriormente quantificado, cujo processo reacional está descrito abaixo na **figura 8** (LOPES et al., 1999; SERAFINI et al., 2011; OGUNRO et al., 2013).

Figura 8 - Processo reacional de quantificação do malonaldeído (MDA) (LOPES et al., 1999)

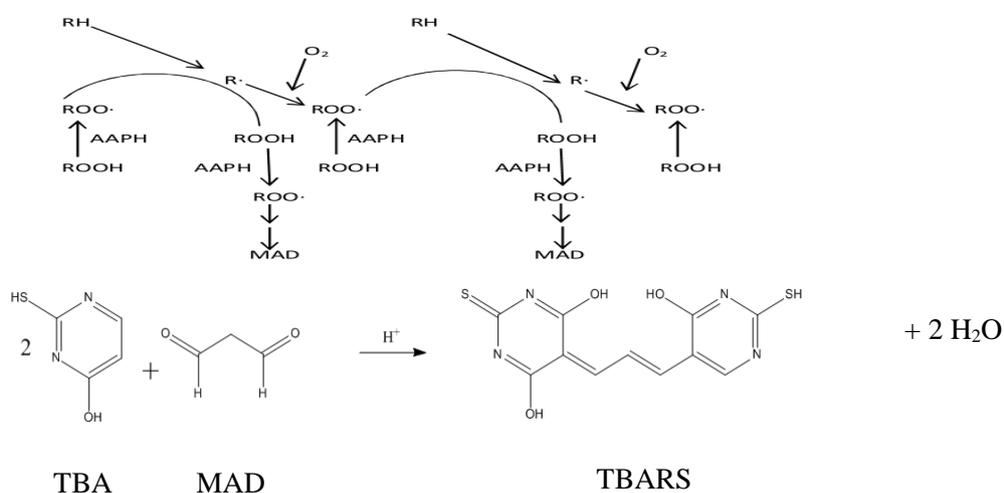
I - Reação de Fenton:



II - Reação de degradação da 2-desoxirribose produzindo malonaldeído (MAD):



III - Por último, o MAD reage com o ácido tiobarbitúrico, formando também TBARS.

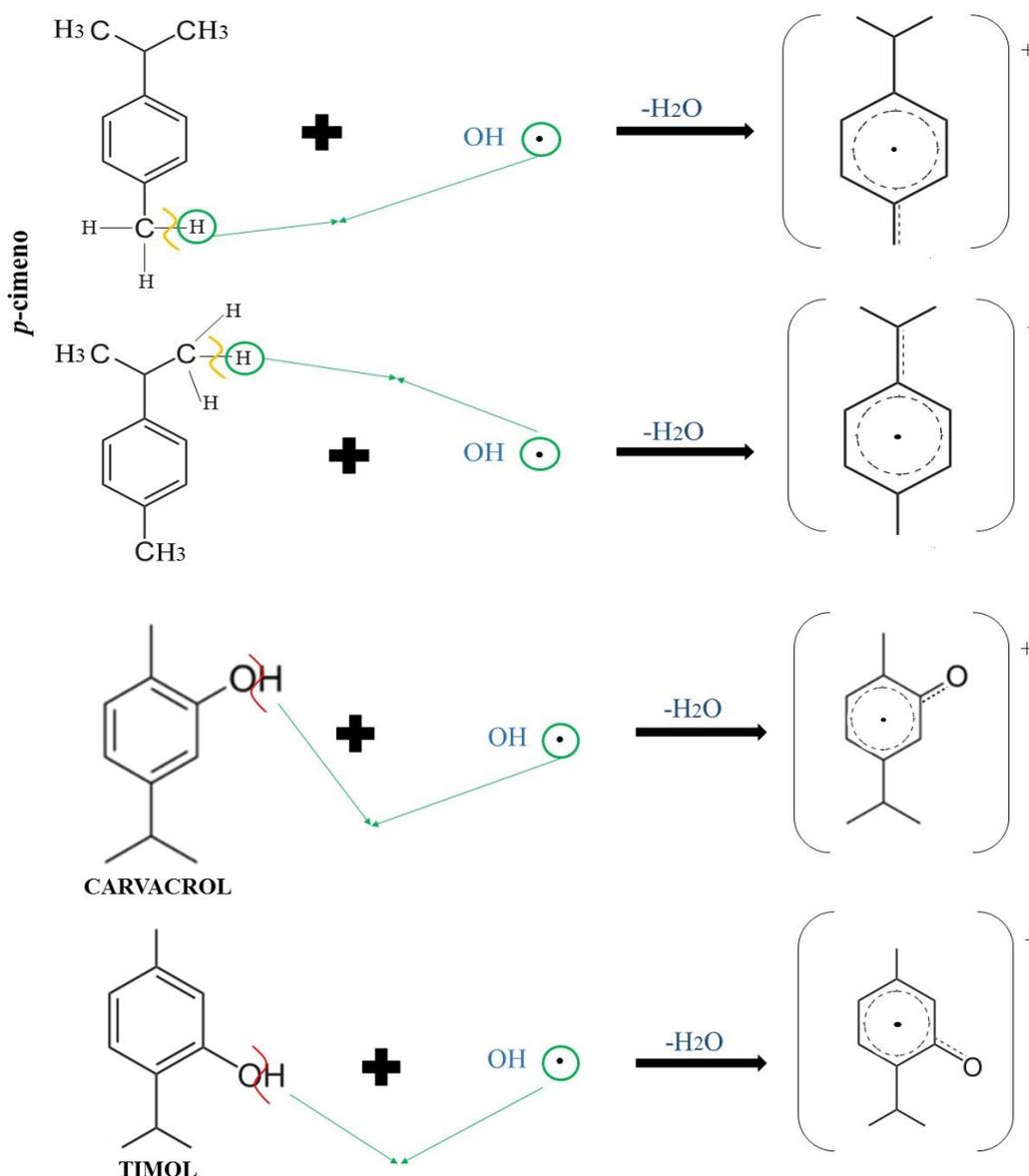


O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com o resultado obtido, o óleo pode ser considerado um inibidor de radicais hidroxilas principalmente nas concentrações de 300 e 900 μM . Como observado nos resultados apresentados pelo gráfico 2, a capacidade antioxidante foi proporcional ao aumento das concentrações e quando os

resultados são comparados com o padrão ácido ascórbico se observa valores semelhantes na inibição dos radicais hidroxilas.

Considerando que a capacidade antioxidante do óleo contra os radicais envolve a transferências de átomos de hidrogênio, foi proposto possíveis mecanismos da reação antioxidante para o OELO, na qual está representado na **Figura 9**.

Figura 9 - Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) com o radical hidroxila.



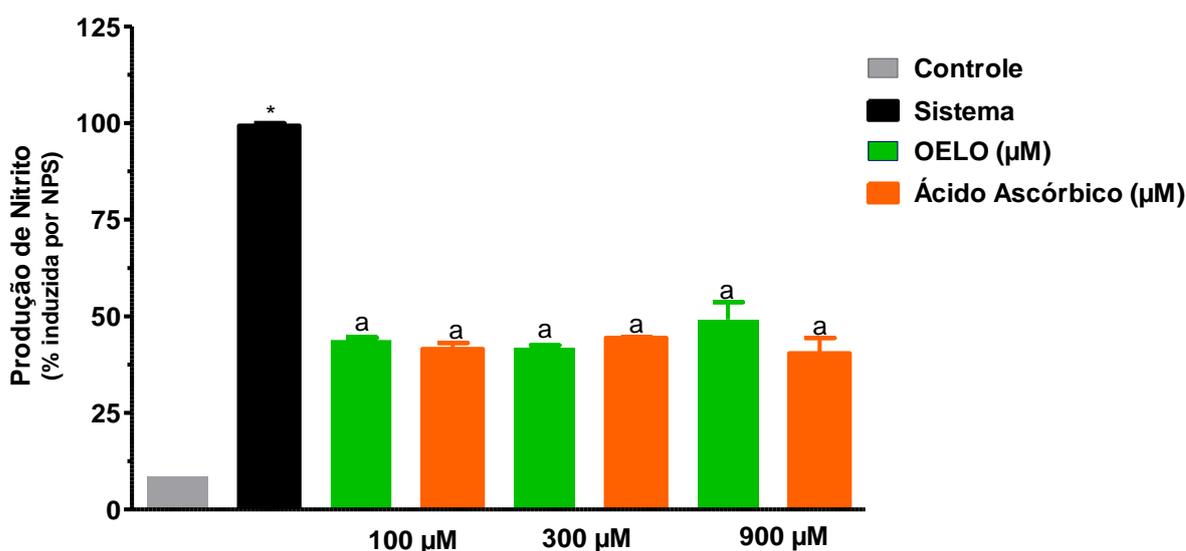
Fonte: autoria própria, 2015

Capacidade antioxidante do óleo (OELO) pela inibição de formação do radical nitrito (NO_2^\bullet)

O resultado correspondente à inibição da formação de radicais nitrito a partir do óxido nítrico pelo OELO em diferentes concentrações está representado no **gráfico 3**. Os valores da capacidade antioxidante nas concentrações de 100, 300 e 900 μM foram respectivamente de $56,14 \pm 0,58$; $58,05 \pm 0,56$ e $50,80 \pm 4,47\%$, na qual o composto reagiu com óxido nítrico reduzindo de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de íons gerados pela decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS).

O AA nas mesmas concentrações (100, 300 e 900 μM) reduziu a quantidade de íons nitrito gerados de forma significativa ($p < 0,05$), apresentando $58,40 \pm 1,48$, $55,58 \pm 0,23$ e $59,51 \pm 3,92\%$ da capacidade antioxidante. De acordo com os resultados da inibição do óxido nítrico para gerar o radical nitrito, a CE_{50} do OELO foi de 1030 μM , e do AA de 1643 μM .

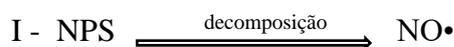
Gráfico 3 - Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações contra a formação de íons nitritos gerados.



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição in vitro, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O Ácido ascórbico (100 - 900) foi usado como padrão antioxidante. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao NPS.

O método de remoção do metabólito nitrito para avaliação da atividade antioxidante também foi utilizado, baseado na produção de $\text{NO}\cdot$ a partir da decomposição de nitroprussiato de sódio em solução aquosa, como mostra a reação na **figura 10**.

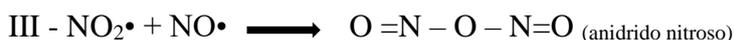
Figura 10 - Mecanismo de reação para determinação do nitrito, segundo método de Griess (Adaptado de RAMOS; CAVALHEIRO; CAVALHEIRO, 2006).



Por sua vez, este radical reage com o oxigênio gerando o radical nitrito:

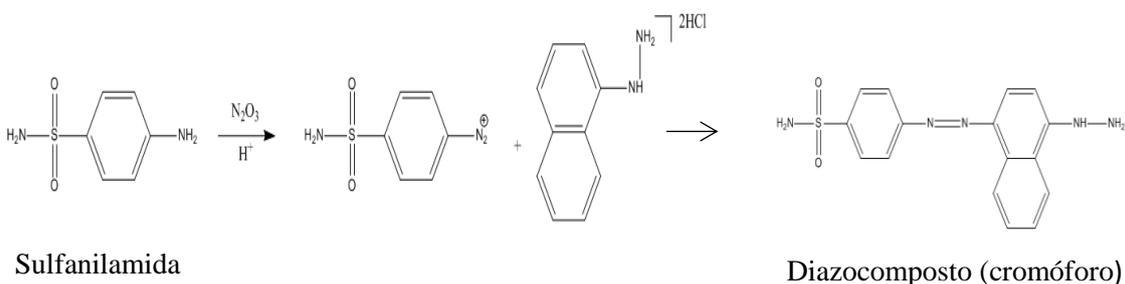


O radical nitrito reage com o radical óxido de nítrico e forma-se o anidrido nitroso, um reagente nitrosante (SYKES, 1991):



O anidrido nitroso, ao reagir com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina) a 1% em água, forma um composto diazo de cor violeta, um cromóforo de absorção máxima em 546 nm. Se no meio reacional houver substâncias antioxidantes, estas vão competir com o oxigênio, e a produção do radical nitrito $\text{NO}_2\cdot$ será reduzida. As reações a seguir mostram a produção do cromóforo:

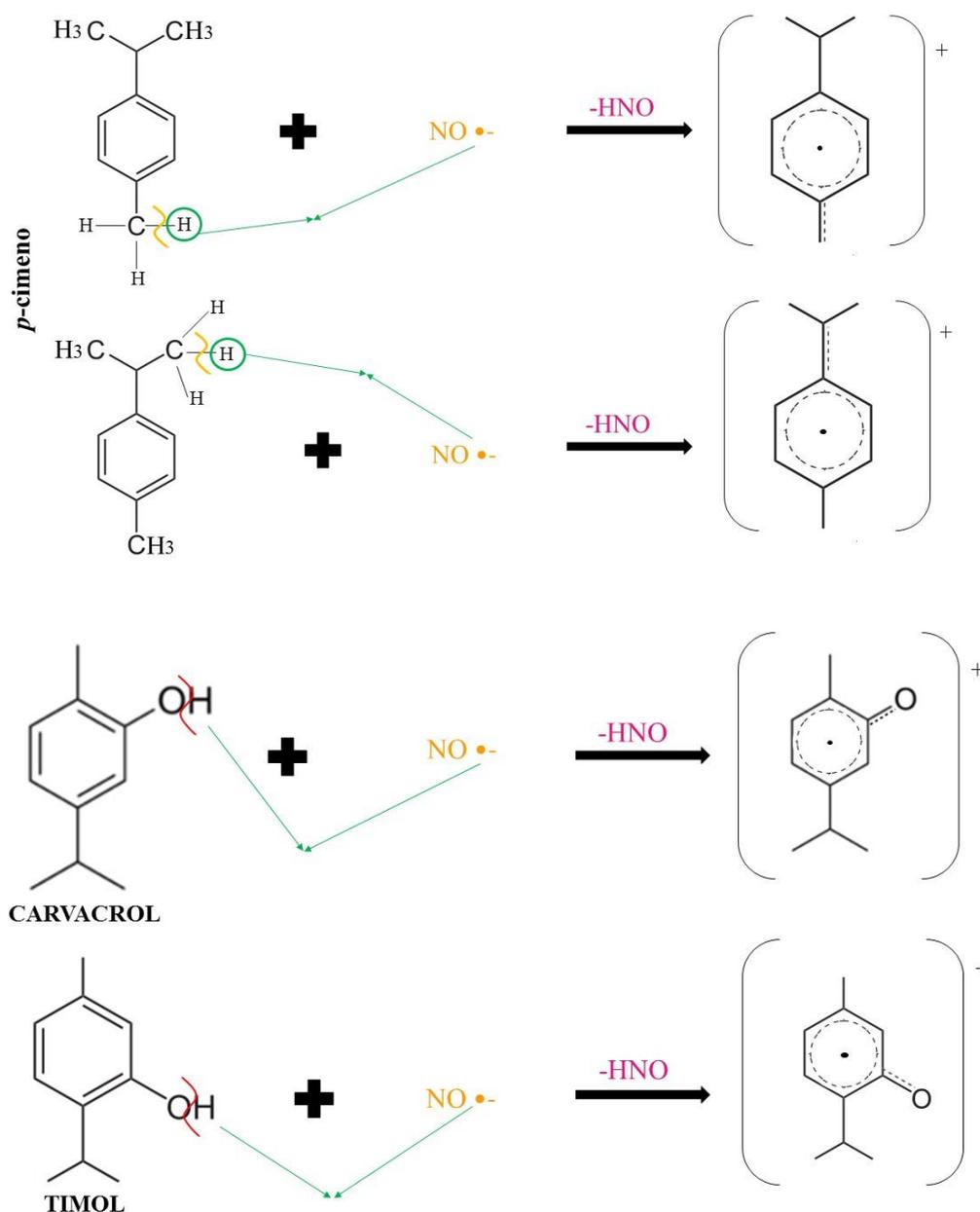
IV -



O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com o resultado obtido, o óleo foi significativo com $p < 0,05$ em todas concentrações, pois reagiu com óxido nítrico e conseguiu inibir a produção de íons nitrito.

O possível mecanismos da reação antioxidante para o óleo está representado na **Figura 11**.

Figura 11 - Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) contra a formação de íons nitritos.



Fonte: autoria própria, 2015.

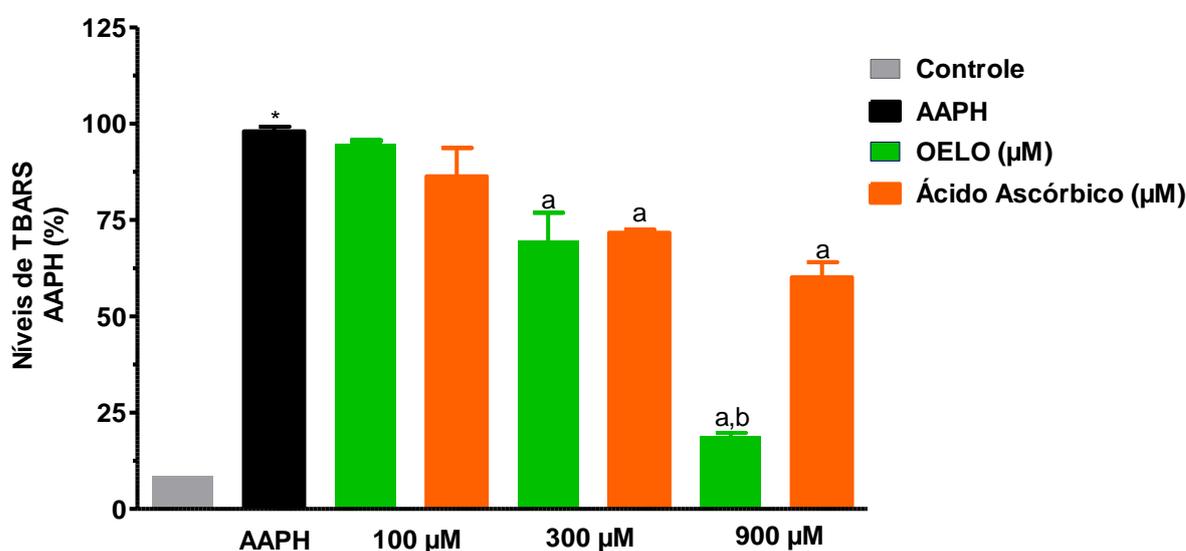
Capacidade antioxidante do óleo (OELO) pela inibição da peroxidação lipídica (Níveis de TBARS)

O resultado do OELO correspondente a inibição da peroxidação lipídica pela diminuição dos níveis de TBARS em diferentes concentrações está representado no **gráfico 4**. Os valores da capacidade antioxidante nas concentrações de 100, 300 e 900 μM foram de 5,21

$\pm 0,76$; $30,46 \pm 7,37$ e $81,19 \pm 0,94\%$, na qual, o composto reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de TBARS gerados a partir da peroxidação lipídica induzida pelo AAPH.

Nas mesmas condições experimentais o AA apresentou capacidade antioxidante de $13,67 \pm 7,34$; $28,29 \pm 0,72$ e $39,87 \pm 3,94\%$, respectivamente, reduzindo os níveis de TBARS de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao AAPH. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, o valor da CE_{50} foi de $340,2 \mu\text{M}$ e $155,8 \mu\text{M}$ para OELO e AA, respectivamente.

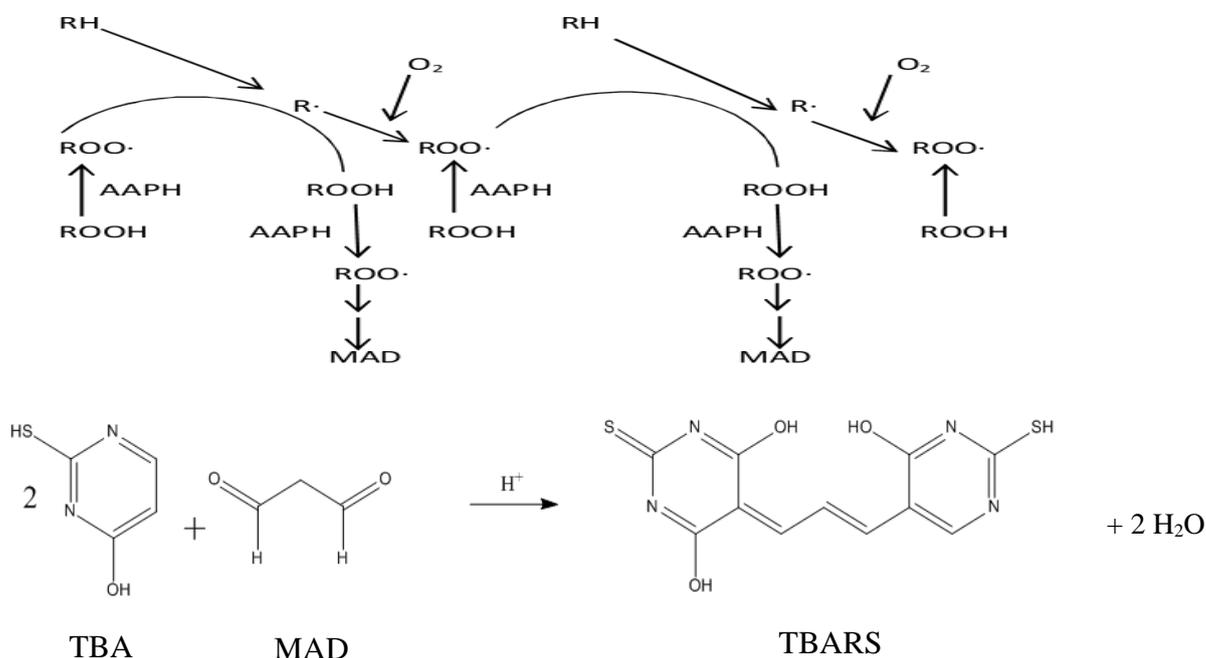
Gráfico 4 - Capacidade antioxidante do OELO em diferentes concentrações pela inibição da peroxidação lipídica (inibição dos níveis de TBARS).



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O Ácido ascórbico (100 - 900) foi usado como padrão antioxidante. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao AAPH; ^bquando comparados ao grupo AA.

A peroxidação lipídica caracteriza-se por apresentar danos biológicos ocasionados por radicais livres, originados sob o estresse oxidativo. O AAPH, composto azo hidrossolúvel, é utilizado como gerador de radicais livres, como por exemplo, a peroxila. Desta forma, a formação de TBARS ocorre da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com produtos da decomposição dos hidroperóxidos, de ácidos graxos insaturados, o malonaldeído, quando se utiliza um gerador de radicais livres como o AAPH conforme é apresentado na **figura 12** (SILVA et al., 2012; ANTOLOVICH et al., 2002).

Figura 12 - Formação do TBARS a partir do malonaldeído (Adaptado de ARAÚJO, 1999; ANTOLOVICH et al., 2002).

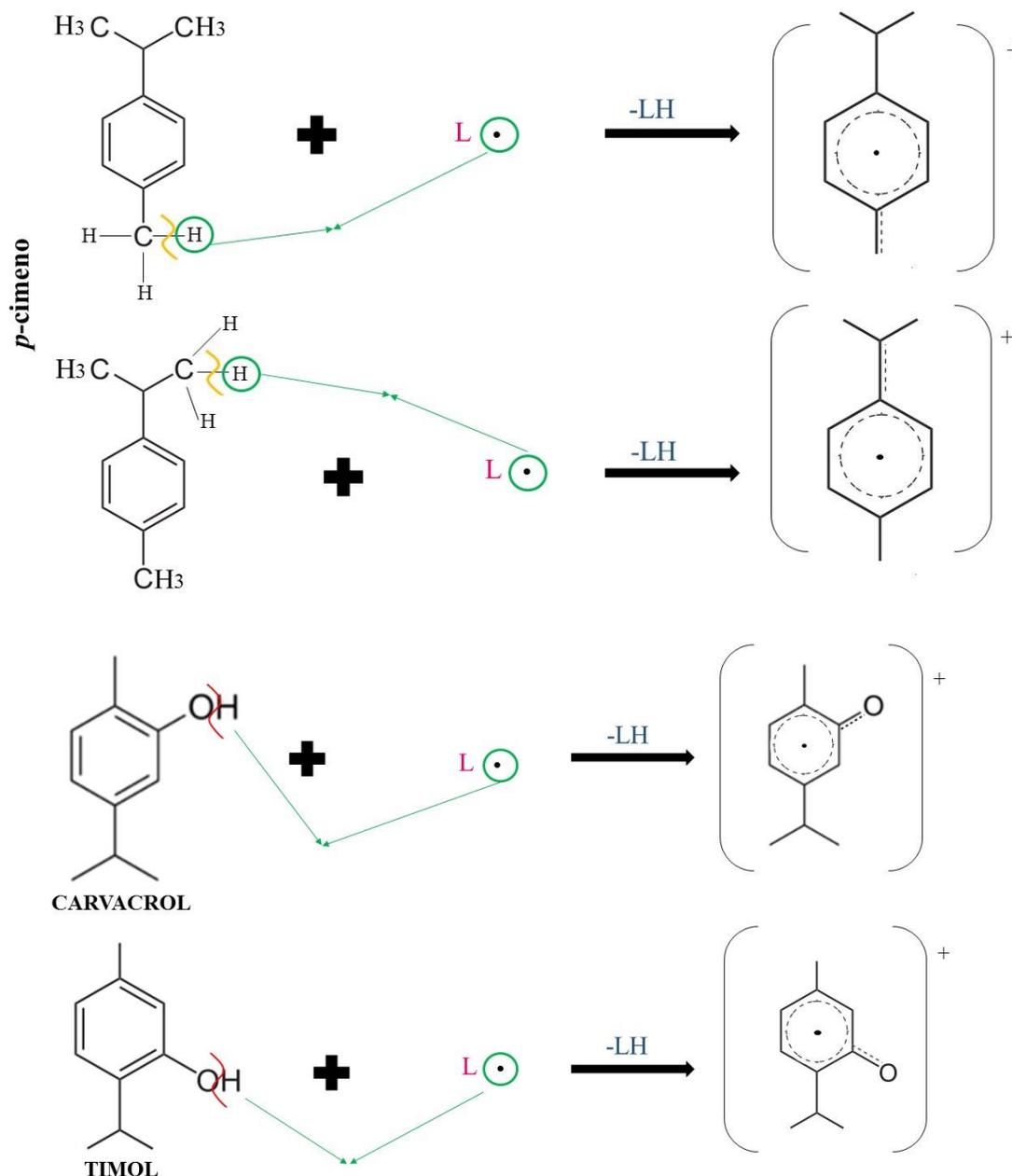


O método TBARS tem sido amplamente utilizado para avaliar a extensão da peroxidação lipídica *in vitro*, onde a oxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre a partir de uma fonte rica em lipídeos (CAPRIOLI; SULLIVAN; MONAHAN, 2011).

De acordo com os resultados obtidos, o óleo inibiu a peroxidação lipídica pela diminuição dos níveis de TBARS, de forma significativa na concentração de 300 e 900 μM . A inibição da peroxidação lipídica foi proporcional ao aumento da concentração quando os resultados são comparados com o padrão ácido ascórbico.

A peroxidação lipídica envolve a formação e propagação de radicais lipídicos ($L\cdot$) e considerando o potencial antioxidante do óleo na inibição da formação de radicais lipídicos, o possível mecanismo da reação antioxidante foi proposto e está demonstrado na **Figura 13**.

Figura 13 - Possível mecanismo da reação antioxidante do óleo (OELO) contra a formação de radical lipídico, formado durante a peroxidação lipídica.



Fonte: autoria própria, 2015.

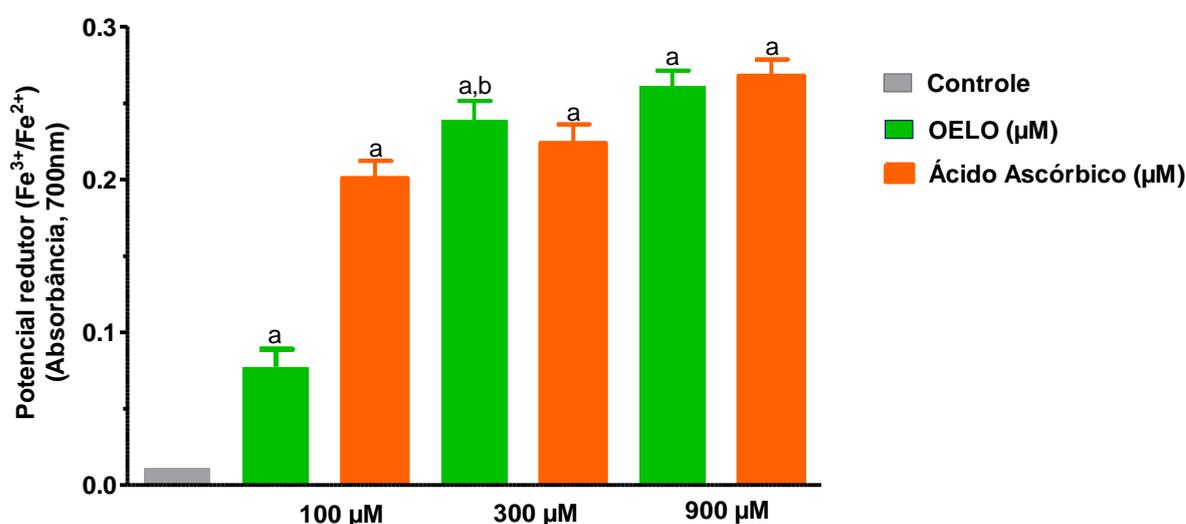
Potencial Redutor do óleo (OELO)

O resultado correspondente a capacidade antioxidante do OELO pelo seu potencial redutor em diferentes concentrações está representada no **gráfico 5**. O aumento da absorbância em 700 nm nas concentrações de 100, 300 e 900 μM apresentou potencial redutor de $0,102 \pm$

0,03; $0,238 \pm 0,01$ e $0,261 \pm 0,01$, respectivamente, de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Todas as concentrações do AA (100, 300 e 900 μM) também apresentaram uma elevação significativa ($p < 0,05$) do potencial redutor em relação a absorbância do controle. De acordo com esses resultados, a CE_{50} do OELO necessária para reduzir ferricianeto de potássio (Fe^{3+}) à ferrocianeto de potássio (Fe^{2+}) em 50% da sua absorbância inicial foi de 118,7 μM , entretanto o AA apresentou CE_{50} de 30,54 μM .

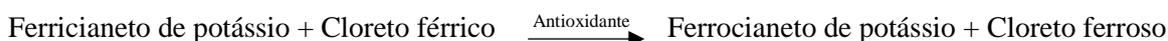
Gráfico 5 - Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) do OELO.



Os valores representam a média \pm E.P.M. das absorbâncias em 700 nm, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. O Ácido ascórbico (100 - 900) foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,001$ em relação ao controle (sem o OELO) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^bquando comparados ao grupo AA.

As substâncias, que têm um potencial de redução, reagem com ferricianeto de potássio (Fe_{3+}) para formar ferrocianeto de potássio (Fe_{2+}), o qual reage em seguida com cloreto férrico para formar complexo ferroso férrico que tem um máximo de absorção a 700 nm de acordo com a **figura 14** (Oyaizu, 1986).

Figura 14 - Mecanismo de reação para determinação do potencial redutor



Quanto maior sua absorvância, maior sua capacidade antioxidante (SANTOS et al., 2007). Sendo assim, a capacidade antioxidante do óleo está baseada na atividade quelante férrica com um mecanismo ainda não bem determinado.

CONCLUSÃO

As concentrações de 300 e 900 µM apresentaram atividade antioxidante sendo que o potencial redutor, as reduções da produção de TBARS e inibição do radical DPPH• mostraram-se superiores ao controle positivo, o ácido ascórbico, evidenciando uma alta presença de substâncias antioxidante. Estes resultados contribuem para ampliar o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K., uma vez que ainda não foram descritos de forma detalhada e ampliada anteriormente na literatura. Também sugerem que esta espécie é promissora para a produção de fitoterápico com ação antioxidante.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. D. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v. 83, p. 569-574, 2003.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1999.
- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, In Vitro and Ex Vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 896-900, 2006.
- BOLIGON, A.A. **Atividade antioxidante de flavonóides e terpenóides obtidos das folhas e da casca do tronco de *Scutia Buxifolia* Rissek**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CAPRIOLI, I.; O'SULLIVAN, M.; MONAHAN, F.J. Interference of sodium caseinate in the TBARS assay. **Food Chemistry**, v.124, p. 1284–1287, 2011.

CHANDRASEKAR, D, MADHUSUDHANA, K, RAMAKRISHNA, S, DIWAN, PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p. 460-464, 2006.

CHO, M.; LEE, H.; KANG, I.; WON, M.; YOU, S. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p.999-1006, 2011.

COSTA, D.A; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p. 567- 575, 2012.

DEAN, O.M.; VAN DEN BUUSE, M.; BUSH, A.I.; COPOLOV, D.L.; NG, F.; DODD, S.; BERK, M. A role for glutathione in the pathophysiology of bipolar disorder and schizophrenia? Animal models and relevance to clinical practice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, p. 2965–2976, 2009.

GUERRA, E.J.I. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. **Annales de Médecine Interne**, v. 18, p. 326, 2001.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.S.; GELAIN, D.P. QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassayguided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

HAIDA, K.S.; BARON, A; SILVA, F.J.; ARCELES, M.L; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A.P. COSTA, J.H.B. Free radicals' sequestering activities and the determination of total phenolic contents of sage and eucalyptus. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61-66, 2011.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure -activity relationships. Reviews: current topics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

KIM, K.W.; THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 308-313, 2006.

KO, S.H.; CAO, W.; LIU, Z. Hypertension management and microvascular insulin resistance in diabetes. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 243-251, 2012.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 2, p. 142-152, 1999.

OGUNRO, P. S.; EEGUNRANTI, B. A.; ATIBA, A. S.; OKE, O. E.; AKANDE, J. O. Status of antioxidant defense and lipid peroxidation in schizophrenics with positive, negative and cognitive symptoms. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 20-24, 2013.

OYAIZU, M. Oyaizu Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine.. **Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PEREIRA, A.L.F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P.B.L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PRATT, D. E.; HUDSON, B. J. F. Natural antioxidants not exploited commercially. In: **Food antioxidants**: Springer, 1990. p.171-191.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114, 2006.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 40, p. 495-503, 2004.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

SALUSTRI, C.; SQUITTI, R.; ZAPPASODI, F.; VENTRIGLIA, M.; BEVACQUA, M.G.; FONTANA, M.; TECCHIO, F. Oxidative stress and brain glutamate-mediated excitability in depressed patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 127, n. 1-3, p. 321-325, 2010.

SANTANAM, N.; PENUMETCHA, M.; SPEISKY, H.; PARTHASARATHY, S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR mice. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 203-210, 2004.

SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.D.; CITO, A.M.G.L.; OLIVEIRA, A.E.H.B.; LIMA, S.G.; REIS, F.A.M. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 504-506, 2004.

SANTOS, M. M.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; GOUVÊA, C.M.C.P. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (Coffea arabica). **Química Nova**, v. 20, p. 604-610, 2007.

SERAFINI, M. R.; SANTOS, R. C.; GUIMARÃES, A. G.; DOS SANTOS, J. P. A.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A. D.; ALVES, I. A.; GELAIN, D. P.; DE LIMA NOGUEIRA, P. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R. Morinda citrifolia Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 145-152, 2015b

SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVA, O. A.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Potencial antioxidante in vitro do (-)- α -terpineol. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 08, n.03, p. 14-152, 2012.

SLYVKA, Y.; WANG, Z.; YEE, J.; INMAN, S.R.; NOWAK, F.V. Antioxidant diet, gender and age affect renal expression of nitric oxide synthases in obese diabetic rats. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 1, p. 50-60, 2011.

SOUSA, C.M.; SILVA, H.R.E.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

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

VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M.; RAO, C.V.; MATHELA, C.S. In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 704-709, 2010.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A extração por hidrodestilação e a identificação dos constituintes por Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de massas foram técnicas adequadas e eficientes;
- É promissor o uso óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K para o desenvolvimento de fitoterápico com atividade anticolinesterásica;
- O óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K não apresentou sinais de toxicidade e não possui classificação de DL₅₀ de acordo com o GHS;
- A presença de compostos fenólicos, como constituintes majoritários, justifica o potencial antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.;
- Mais estudos são necessários, para estabelecer a correlação entre atividade antioxidante e anticolinesterásica;

9 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliação da atividade anticolinesterásica do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. em testes *in vivo*;
- ✓ Estudo de toxicidade subcrônica e crônica em camundongos tratados com do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K.;
- ✓ Desenvolvimento de um fitomedicamento a partir do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. com vistas as atividades farmacológicas apresentadas;

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- ✓ Apresentação de trabalhos científicos

RODRIGUES, A. M. X.; FREITAS, R. M.; CITÓ, A. M. G. L. **Estudos farmacológicos e toxicológicos do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.** In: III Workshop de projetos e dissertações, 2014, Teresina – PI.

RODRIGUES, A. M. X.; SANTOS, B. N. G.; CARVALHO, M. G. F. M.; CITÓ, A. M. G. L. **Prospecção tecnológica sobre *Lippia origanoides* H.B.K.** In: III Workshop de projetos e dissertações, 2014, Teresina – PI.

RODRIGUES, A. M. X.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, M. G. F.; FEITOSA, C. M.; SANTOS, B. N. G.; CITÓ, A. M. G. L. **Óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e atividade anticolinesterase.** In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas, 2015, Teresina – PI.

RODRIGUES, A. M. X.; SANTOS, B. N. G.; QUEIROZ, A. L.; VASCONCELOS, E. A. F.; CARVALHO, M. G. F. M.; CITÓ, A. M. G. L. **Estudo do potencial redutor do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae).** In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas, 2015, Teresina – PI.

RODRIGUES, A. M. X.; SANTOS, B. N. G.; SILVA, A. X.L.; MONTEIRO, N.R.G.; CARVALHO, M. G. F. M.; SILVA, O.A.; CITÓ, A. M. G. L. **Potencial antioxidante in vitro do óleo essencial de *Lippia origanoides*.** In: I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e potencialidades terapêuticas, 2015, Teresina – PI.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação da Comissão de Ética e Experimentação no uso de animais em Pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 26 de Setembro de 2014.

Ilma.

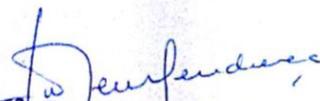
Profa. Dra. ANTÔNIA MARIA DAS GRAÇAS LOPES CITÓ.
Departamento: Química- CCS/ UFPI.

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (26 de Setembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **064/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Obtenção e caracterização, estudos farmacológicos e avaliação aguda do óleo essencial de *Lippia origanoides H.B.K***", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Outubro/2014 à Setembro/2016, e serão usados 240 Camundongos isogênicos swiss (120 machos e 120 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.^ª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Anexo B – Confirmação de submissão a Phytomedicine

Submission Confirmation

↑ ↓ ✕



Ingrid Maier <(m_phytomedicine@t-online.de) Adicionar aos contatos 26/11/2015 |>
Para: aldenora.amxr@gmail.com, aldenora_amxr@hotmail.com ✕

Dear Aldenora,

We have received your article "Chemical composition, toxicology studies and evaluate the possible effect on the central nervous system of the essential oil Lippia origanoides" for consideration for publication in Phytomedicine as Original Article

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/phytomed/>
2. Enter these login details:
Your username is: aldenora.amxr@gmail.com
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PHYMED/automail_query.asp.
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Ingrid Maier
Managing Editor
Phytomedicine