

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA
(*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) EM PEIXE (*Oreochromis niloticus*) E
MAMÍFERO (*Mus musculus*)

EDGAR HELL KAMPKE

VILA VELHA - ES
MAIO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA
(*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) EM PEIXE (*Oreochromis niloticus*) E
MAMÍFERO (*Mus musculus*)**

Dissertação apresentada a Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

EDGAR HELL KAMPKE

VILA VELHA - ES
MAIO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

K15e Kampke, Edgar Hell.
 Efeito genotóxico do óleo essencial de erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) em peixe (*Oreochromis niloticus*) e mamífero (*Mus musculus*) / Edgar Hell Kampke. – 2017.
 69 f.: il.

 Orientador: Levy de Carvalho Gomes
 Coorientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

 Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.
 Inclui bibliografias.

 1. Farmacologia Terapêutica. 2. Peixe - Criação.
I. Gomes, Levy de Carvalho. II. Campagnaro, Bianca Prandi.
III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

EDGAR HELL KAMPKE

**EFEITO GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA
(*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) EM PEIXE (*Oreochromis niloticus*) E
MAMÍFERO (*Mus musculus*)**

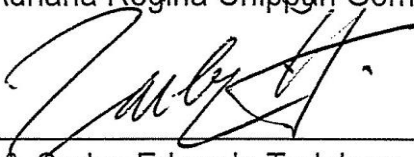
Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 26 de Maio de 2017,

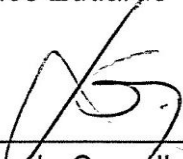
Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Adriana Regina Chippari Gomes – UVV



Prof.º Dr.º Carlos Eduardo Tadokoro – UVV



Prof.º Dr.º Levy de Carvalho Gomes – UVV

Orientador

**A meus pais Helmar Kampke e Ilza Hell Kampke
que me ensinaram que sabedoria não se mede
pelo número de títulos e sim pela forma como se
administra o conhecimento recebido; a eles
dedico esse título.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela conclusão desta etapa e por ter me guiado durante este período, me dando paciência, perseverança e permitindo que alcançasse este conhecimento.

Ao meu orientador, Professor Dr^o Levy de Carvalho Gomes que mesmo sendo biólogo aceitou o desafio de orientar um farmacêutico. Agradeço ainda pela ajuda, pelo incentivo de trabalhar junto para que o resultado desse projeto fosse alcançado com qualidade e por ensinar não somente sobre o campo acadêmico mas também postura profissional. Estendo meu agradecimento a Prof^a. Dr^a Adriana Regina Chippari Gomes pelo carinho e disponibilidade em ajudar sempre que necessário;

A minha Co-orientadora, Prof^a. Dr.^a Bianca Prandi Campagnaro por ter abraçado o projeto desde o início, auxiliando no aprendizado das metodologias, pelo acolhimento em seu laboratório e por acreditar até o último momento nos resultados deste trabalho;

Aos órgãos de fomento, (FAPES, CAPES, CNPq) pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização deste trabalho;

A UVV e o Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de adquirir esse conhecimento e a indicação para aquisição da bolsa de estudos;

A toda equipe do laboratório de fisiologia translacional da Universidade Federal do Espírito Santo em especial os professores, Elisardo Corral Vasquez e Silvana dos Santos Meyrelles pelo acolhimento naquele laboratório;

A Tommasi Analítica pelo auxílio com uso do GC-MS;

A minha família em especial meus pais pelo incentivo, por estarem comigo mesmo distantes, pelas inúmeras orações e por me ajudarem financeiramente durante este período o qual não pude atuar como farmacêutico. Estendo este agradecimento a meus irmãos Vera e Edmar que torceram e passaram pelos momentos de aflição junto comigo;

Aos professores, Marcio Fronza, Denise Coutinho Endringer, Rodrigo Scherer, Tadeu Uggere de Andrade e Thiago de Melo Costa Pereira, pelas

incansáveis contribuições a um projeto executado por aluno externo a vossos laboratórios;

Aos alunos do laboratório de Ictiologia aplicada – LABPEIXE em especial Julia, Tati, Gabriel, Larissa, Dandara e Taci; pelo auxílio com o manuseio dos peixes;

A melhor turma da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que já existiu (Aline, Nayana, Larissa, Luciane, Gisele, Paola, Layla, Felipe, Vinicius, Licia, Franciane e Maria Eduarda). Agradeço aos demais alunos, Thais, Alegna, Elysiane, Luciana, Placyelle, Gisele e Veronica pelos bons momentos vividos;

Aos alunos de iniciação científica pelos enormes auxílios na realização dos trabalhos em especial as alunas Beatriz e Larissa que muito auxiliaram nos últimos meses;

A amiga Franciane Martins Marques (Fran) pela parceria desde a graduação, pelos momentos de descontração no laboratório, pelas inúmeras trocas de experiência acerca de óleos essenciais e atividade anti-inflamatória e todo auxílio com a parte estatística;

A Maria Eduarda de Souza Barroso (Duda) ou Maria Enjoada ou ainda Maria Enrolada, pela ajuda na parte braçal do trabalho, pelo carinho e companheirismo. Por se empolgar comigo e também por desesperar comigo. Sou grato por cada momento que me impulsionou a buscar meus resultados não me deixando desistir quando parecia não haver mais alternativas. Por pensar junto a Fran parte desse projeto;

Aos amigos da graduação na UVV e do ensino médio no SESI, além de todos os amigos da Igreja Evangélica de Confissão Luterana no Brasil pelo companheirismo e torcida durante esse período;

A todos os meus sinceros agradecimentos!

Muitas são as aflições do justo, mas o Senhor o livra de todas.

(Salmos 34.19)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
1.1 Plantas medicinais e uso popular.....	6
1.2 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	6
1.3 Óleos essenciais e <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	7
1.4 Propriedades farmacológicas de <i>L. alba</i>	8
1.5 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e a piscicultura.....	9
1.6 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e toxicidade	10
ABSTRACT	12
2. INTRODUÇÃO	13
3. MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção das amostras	15
3.2 Extração do óleo essencial	15
3.3 Determinação da composição do óleo essencial.....	15
3.4 Animais experimentais	16
3.5 Preparo das soluções contendo óleo essencial.....	16
3.6 Conversão de dose segundo área de superfície corporal	17
3.7 Desenho experimental	17
3.8 Separação de células mononucleares	20
3.9 Ensaio de micronúcleo.....	21
3.10 Ensaio do cometa	21
3.11 Determinação de Proteínas Totais.....	23
3.12 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP).	24
3.13 Análise estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Composição química por GC-MS.....	25
4.2 Indução de anestesia.....	26
4.3 Ensaio do Micronúcleo.....	26
4.4 Ensaio do Cometa alcalino	28
4.5 AOPP.....	30

5. DISCUSSÃO	33
5.1 Composição do óleo de <i>Lippia alba</i>	33
5.2 Indução a anestesia por inalação	33
5.3 Genotoxicidade	34
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERENCIAS	42
8 ANEXO	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micronúcleos em eritrócitos de peixes (A) e camundongos (B) observados na objetiva de imersão corados com kit corante panótico

Figura 2. Classificação dos cometas de acordo com o tamanho da cauda em camundongos (A) e peixes (B).

Figura 3. Curva de regressão linear entre os estágios de anestesia versus tempo. *Oreochromis niloticus* administrados com óleo essencial de *L. alba* na concentração de 300 µg/mL. Os dados são representados por média e desvio padrão de 8 repetições para cada estágio de anestesia.

Figura 4. Micronúcleos (‰) em eritrócitos de Peixes e Camundongos expostos a diferentes concentrações (100, 200 e 300µg/mL) de óleo essencial de *Lippia alba* por gavagem. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100,200 e 300µg/mL como sendo 120,240 e 360 µg/mL para camundongos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Figura 5. Micronúcleos (‰) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a concentração de 300 µg/mL de óleo essencial de *Lippia alba* em diferentes formas de tratamento (inalação e gavagem). Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Figura 6. Índice de danos de camundongos e peixes tratados com diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba*. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100,200 e 300µg/mL como sendo 120,240 e 360 µg/mL para camundongos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras

maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Figura 7. Índice de danos de peixes tratados por gavagem e inalação com concentração única ($300\mu\text{g/mL}$) de óleo essencial de *L. alba*. Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Figura 8. Quantificação de produtos avançados de oxidação proteica em peixes e camundongos tratados com diferentes concentrações de *L. alba*. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100,200 e $300\mu\text{g/mL}$ como sendo 120,240 e $360\mu\text{g/mL}$ para camundongos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Figura 9. Quantificação de produtos avançados de oxidação proteica em peixes tratados por inalação e por gavagem com concentração única ($300\mu\text{g/mL}$) de óleo essencial de *L. alba*. Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padronização dos grupos experimentais dos animais utilizados no trabalho.

Tabela 2. Estágios de indução e anestesia em tilápias *Oreochromis niloticus* anestesiadas com 300µg/mL de óleo essencial de *L. alba* por inalação.

Tabela 3. Composição do óleo essencial de *Lippia alba* realizada por GC-MS.

Tabela 4. Frequência de danos (%) nas células de camundongos e peixes expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*. Os resultados estão expressos em média percentual e desvio padrão.

Tabela 5. Anestésicos de origem natural e sintética avaliados quanto a genotoxicidade em diferentes espécies animais.

RESUMO

Kampke, Edgar Hell, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Maio de 2017. **Efeito genotóxico do óleo essencial de erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) em peixe (*Oreochromis niloticus*) e mamífero (*Mus musculus*).** Orientador: Levy de Carvalho Gomes, Bianca Prandi Campagnaro (co-orientadora)

Recentemente há uma busca constante por novos agentes terapêuticos que possam auxiliar no tratamento de animais, principalmente na piscicultura, melhorando sua produtividade. Nessa ótica os produtos naturais configuram excelente alternativa de baixo custo. Dentre as espécies estudadas a erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) é muito difundida popularmente por suas propriedades terapêuticas, sobretudo as propriedades sedativas. Tais propriedades levaram a descoberta da ação anestésica do óleo essencial de *Lippia alba* em peixes. Esse estudo gerou a necessidade do conhecimento de suas ações genotóxicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito genotóxico do óleo essencial de *Lippia alba* em peixes e mamíferos. O óleo foi extraído por hidrodestilação e analisado por GC-MS onde foram identificados majoritariamente os compostos linalol, eucaliptol, γ -muroleno e cariofileno. A atividade genotóxica foi avaliada pelos métodos do micronúcleo e cometa e a quantificação de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Os ensaios de micronúcleo e cometa mostraram que a toxicidade foi maior em peixes que em mamíferos, porém em ambos os casos foram semelhantes ao controle negativo o que denota baixa toxicidade. Quando comparados os tratamentos, nota-se maior toxicidade no tratamento por inalação que por gavagem, no entanto, igualmente não tóxicos. A quantificação de proteínas oxidadas no AOPP como marcador de estresse oxidativo revelou diferença significativa ao controle, porém muito inferior ao controle positivo, o que leva a crer que o possível dano oxidativo esteja ocorrendo apenas sobre proteínas e não ao DNA. Dessa forma, tem-se que o óleo essencial de *Lippia alba* possui baixo efeito genotóxico sobre peixes e mamíferos, permitindo seu uso como anestésico na piscicultura sem que haja ações tóxicas transferidas aos consumidores.

Palavras chaves: *Lippia alba*, Genotoxicidade, Micronúcleo, Cometa, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Kampke, Edgar Hell, M.Sc, University of Vila Velha – ES, May de 2017. **Genotoxic effect of “Erva cidreira” essential oil (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*).** Advisor: Levy de Carvalho Gomes, Bianca Prandi Campagnaro (Co-Advisor).

Recently there is a constant search for new therapeutic agents that can assist in the treatment of animals, especially in fish farming, improving their productivity. In this view the natural products are an excellent alternative of low cost. Among the species studied, “erva cidreira” (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) is popularly popular for its therapeutic properties, especially its sedative properties. Such properties led to the discovery of the anesthetic action of *Lippia alba* essential oil in fish. This study generated the need for knowledge of its genotoxic actions. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effect of *Lippia alba* essential oil in fish and mammals. The oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS where the compounds linalol, eucalyptol, γ -murolene and caryophyllene were identified. The genotoxic activity was evaluated by the micronucleus and comet assay and the quantification of advanced oxidation protein products (AOPP). The micronucleus and comet assays showed that the toxicity was higher in fish than in mammals, but in both cases were similar to the negative control which denotes low toxicity. When comparing the treatments, a greater toxicity is observed in the treatment by inhalation than by gavage, but also non-toxic. The quantification of oxidized proteins in AOPP as a marker of oxidative stress revealed a significant difference to the control but much lower than the positive control, which suggests that possible oxidative damage is occurring only on proteins and not on DNA. Thus, the essential oil of *Lippia alba* has a low genotoxic effect on fish and mammals, allowed to its use as an anesthetic in fish farming without any toxic actions transferred to consumers.

Keywords: *Lippia alba*, Genotoxicity, Micronucleus, Comet assay, Oxidative stress.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Plantas medicinais e uso popular

O uso de plantas e ervas na medicina remonta à antiguidade. Muitos dos usos terapêuticos foram repassados de geração em geração através do conhecimento popular. Devido a isso, pesquisas são constantemente estimuladas a fim de serem comprovadas ou descartadas tais propriedades terapêuticas de plantas e ervas (MENGUE et al., 2001). Além disso, os produtos de origem natural, configuram uma importante alternativa terapêutica de baixo custo e consequentemente, acesso facilitado pelos pacientes (SANTOS et al., 2011).

A utilização de produtos naturais na medicina humana é notório. Porém, há um constante crescimento na busca por tratamento também de animais, sejam eles domésticos ou em caráter produtivo. Nesse sentido, produtos naturais para uso veterinário são de igual forma importantes opções terapêuticas para tratamento e melhoramento de produção destes animais (SOARES; DIAS, 2013; PILUZZA et al., 2015).

1.2 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Lippia alba(Mill.) N. E. Brown é uma planta que se apresenta na forma de arbusto pertencente à família *Verbanaceae*, de grande conhecimento por suas propriedades terapêuticas. É utilizada principalmente sob a forma de infusões e decocções com folhas devido à ação sedativa a ela associada (GILBERT et al., 2005; TIMÓTEO et al., 2015). Porém, outras ações como antiespasmódica e carminativa tem ganhado destaque, além de estudos que demonstraram a eficácia do óleo essencial de *L. alba* como agente anti-inflamatório e antifúngico entre outras (HENNEBELLE et al., 2008; AZAMBUJA et al., 2011)

Esta planta pode ser encontrada por toda América latina, África e também no sul dos EUA (PASCUAL et al., 2001b; BRAGA et al., 2005; HENNEBELLE et al., 2006; HENNEBELLE et al., 2008; TELES et al., 2012). Há relatos ainda da ocorrência de *L. alba* na Austrália e Índia (FISCHER et al., 2004). Muitas são as denominações populares para esta erva. No Brasil é popularmente conhecida como “erva cidreira”,

mas outras nomenclaturas como falsa melissa, sálvia da gripe e alecrim do campo são reportadas (JEZLER et al., 2013). Há ainda variação na nomenclatura conforme origem geográfica, por exemplo, na Guatemala são descritos os nomes populares de 'Juanilama' ou 'Salvia Sija'(FISCHER et al., 2004).

Apesar de *L. alba* ser popularmente conhecida como erva cidreira e a farmacopeia brasileira assim a denominar, o termo cidreira é empregado às espécies que tem como característica aroma de limão, atividade digestiva, espasmolítica e carminativa, dentre as quais *L. alba*, *Melissa officinalis* e *Cymbopogon citratus* (MATOS, 1996; JULIÃO et al., 2003). No entanto, a farmacopeia americana e a farmacopeia europeia apenas creditam o termo erva cidreira a espécie *Melissa officinalis* (MATOS, 1996; GAZOLA et al., 2004). Tal fato pode explicar o emprego do nome falsa melissa para a espécie *L. alba*.

Devido a grande difusão dessa planta por diferentes regiões, observa-se uma grande variação geográfica na composição química (DELLACASSA et al., 1990; LORENZO et al., 2001; TELES et al., 2012). São demonstradas variações significativas na composição química até mesmo dentro de um mesmo país (FORERO-PEÑUELA et al., 2013; VICCINI et al., 2014). Além da localização, a parte da planta utilizada, o método de extração, condições climáticas e solo influenciam significativamente na composição (ZOGHBI et al., 1998; TELES et al., 2012). O óleo essencial e os compostos fenólicos, como os flavonoides, são conhecidos como princípios ativos dos extratos de *L. alba*, mas a espécie contém ainda, geniposide (iridóides), saponinas triterpênicas, resina e mucilagens (PASCUAL et al., 2001b).

1.3 Óleos essenciais e *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Os óleos essenciais são misturas de diversos componentes de baixo peso molecular, extraídos por hidrodestilação, destilação a vapor ou extração por solventes (NAKATSU et al., 2000; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Estão armazenados no interior de dutos, glândulas e tricomas glandulares das plantas (BASER e DEMIRCI, 2007). Podem conter inúmeros compostos químicos distintos dentre os quais os terpenóides e fenilpropanóides são os mais comuns (CARSON et al., 2006; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). A atividade biológica do óleo essencial pode se dar por um destes compostos presentes de forma isolada (BAKKALI et al., 2008), mas não é incomum que a

atividade do óleo essencial ocorra por sinergismo entre dois ou mais compostos e estes, quando isolados, não apresentem atividade alguma (ISMAN et al., 2008). Os óleos essenciais apresentam uma ampla gama de uso principalmente como aromatizantes na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (BURT, 2004; HUSSAIN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013). Na saúde, constituem importantes alternativas terapêuticas com atividade, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antimutagênica, antiprotozoários, antineoplásica, antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória (BAKKALI et al., 2008).

O óleo essencial de *L. alba* é extraído comumente por hidrodestilação devido a maior eficácia na obtenção dos componentes químicos (PINO et al., 1997; STASHENKO et al., 2004), mas outros métodos podem ser empregados como a extração por fluido supercrítico (BRAGA et al., 2005; GARCÍA-ABARRIO et al., 2014).

As substâncias mais abundantes no óleo de *L. alba* são: citral, limoneno, carvona, cânfora, 1,8-cineol, mirceno e linalol, dentre outros (HENNEBELLE et al., 2008). O linalol parece ser o componente mais visado para estudos devido as suas características e uso. Este componente apresenta isomeria óptica em sua estrutura permitindo que tanto o isômero dextrógiro quanto o levógiro apresentem odores diferentes e, portanto, são bem utilizados por perfumistas (SIANI et al., 2002). O linalol ainda é de grande utilidade na indústria cosmética, no entanto, suas fontes tem se tornado escassas, principalmente porque sua principal fonte, o tronco da árvore pau rosa, da espécie *Aniba rosaedora*, corre risco de extinção, levando à busca de novas fontes de linalol como o óleo essencial de *L. alba* (DIAS et al., 1998; SIANI et al., 2002).

1.4 Propriedades farmacológicas de *L. alba*

O uso popular de *L. alba* é extenso sendo empregada tradicionalmente na cultura brasileira como sedativo, carminativo, espasmolítico, emenagogo, sudorífico, antidisentérico, antirreumático, anti-hipertensivo e expectorante (CORRÊA, 1992; ZOGHBI et al., 1998; DI STASI; HURUMA-LIMA 2002; DI STASI et al., 2002; LORENZI; MATOS 2002; ZÉTOLA et al., 2002; SOUSA et al., 2009).

Tendo em vista a ampla gama de usos de *L. alba* na medicina popular, muitos estudos têm sido realizados no intuito de avaliar a real eficácia da planta, bem

como a descoberta de novas propostas de uso terapêutico da mesma. Com isso tem sido descrita a atividade analgésica, anti-inflamatória, anti enxaquecosa, antiulcerosa, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoário, anticonvulsivante, ansiolítica e miorelaxante, além de usos como pesticida de baixa toxicidade e conservante contra peroxidação lipídica em filés de peixes (VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001a; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005; CALZADA et al., 2006; COUTINHO NETO et al., 2009; SHUKLA et al., 2009; MESA-ARANGO et al., 2010; SHUKLA et al., 2011, CONDE et al., 2011; VERAS et al., 2011; VEECK et al., 2012; HALDAR et al., 2012; CARMONA et al., 2013; COSTA et al., 2014).

1.5 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e a piscicultura

As propriedades farmacológicas de *L. alba* como a ação ansiolítica, sedativa e relaxante motora em ratos passou a chamar atenção na piscicultura que desenvolveu, a partir destas ações, um anestésico para peixes (CUNHA et al., 2010). Substâncias como barbitúricos, benzocaína, éteres, álcool, entre outras têm sido utilizadas com finalidade anestésica em peixes, porém cada um destes compostos apresenta efeitos sistêmicos desagradáveis e baixo nível de segurança (PALÍC et al., 2006; CUNHA et al., 2010). Na busca por anestésicos menos tóxicos e seguros, os produtos naturais se mostram como alternativas viáveis a esta problemática (CUNHA, 2011).

O uso de anestésicos na piscicultura justifica-se pela exposição dos peixes a estímulos por vezes estressantes como o próprio manuseio dos animais, o confinamento, o uso das redes, pesagem, coleta de sangue, vacinação, procedimentos cirúrgicos e transporte (KIESSLING et al., 2009). Além disso, situações de natureza química como redução na concentração de O₂ dissolvido, poluentes e altas concentrações de nitrito e amônia podem elevar o estado de estresse de peixes (MARIANO et. al., 2009a). Tais situações, quando excessivas, levam à perturbação da homeostase podendo acarretar em doenças, mortalidade e, conseqüentemente, queda na produção (OBA et al., 2009; CUNHA et al., 2011).

O uso do óleo essencial de *L. alba* como anestésico visa evitar ou minimizar os efeitos causados pelo estresse. Para isso alguns mecanismos são propostos para essa finalidade. A maioria dos anestésicos exerce seus efeitos regulando o complexo do receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA é o principal

neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. A liberação de GABA na fenda sináptica ativa os receptores ionotrópicos GABA_A e GABA_C, bem como o receptor metabotrópico GABA_B. Os receptores GABA_A estão envolvidos na maior parte da sinalização GABAérgica em mamíferos. Os locais de ligação de alta afinidade para benzodiazepínicos (BDZ) são conhecidos como "receptores BDZ centrais", e esses compostos exercem sua ação farmacológica por modulação alostérica nessas regiões. A ativação desses sítios aumenta o influxo de íons cloreto induzido por GABA, resultando em hiperpolarização e depressão central. A expressão do sistema GABAérgico parece ser conservado entre os vertebrados, desde peixes até mamíferos sendo detectado em certas partes do cérebro do peixe-zebra (TANELIAN et al., 1993; SIEGHART, 2006; ALEXANDER et al., 2008; DELGADO, SCHMACHTENBERG, 2008; KIM et al., 2008; HELDWEIN et al., 2012). Dessa forma, demonstrou-se a interação de *L. alba* com o sistema GABAérgico especificamente com o receptor GABA_A (HELDWEIN et al., 2012). Outro estudo, porém, isolando o isômero S-(+) – Linalol comprovou a indução da anestesia em tempos e concentrações diferentes do óleo essencial como um todo, sugerindo que a ação anestésica se dá por interação sinérgica entre os constituintes do óleo essencial (HELDWEIN et al., 2014).

1.6 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e toxicidade

As ações benéficas de *L. alba* são extensas, contudo, estudos que demonstrem a toxicidade induzida pela planta ainda são limitados. Em um estudo realizado por Aguiar (2006) foi determinada a toxicidade aguda em ratos nos extratos etanólicos (DL₅₀ = 460 mg/kg) de folhas e extratos clorofórmicos de raízes (DL₅₀ = 1146 mg/kg).

Recentemente a população e os órgãos reguladores de saúde têm se preocupado com as ações de óleos essenciais sobre macromoléculas biológicas, principalmente o DNA, uma vez que danos à esta biomolécula podem causar a instabilidade genômica, induzindo a morte celular ou câncer. Neste sentido, órgãos como a *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) passaram a exigir ensaios de genotoxicidade como requisito para a liberação de agentes como drogas (ARALDI et al., 2015).

Efeito genotóxico do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown em peixes (*Oreochromis niloticus*) e mamífero (*Mus musculus*).

Edgar Hell Kampke¹, Maria Eduarda de Souza Barroso, Franciane Martins Marques, Rodrigo Scherer¹, Bianca Prandi Campagnaro¹, Levy de Carvalho Gomes¹

¹University Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista 29102-770, Espírito Santo, Brazil;

* Pharmacy Postgraduate Program, Vila Velha University, Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, 29102-920 – Boa Vista, Vila Velha, ES, Brazil – Tel.: +55 27 3241-2198. Corresponding author: Levy de Carvalho Gomes – levy.gomes@uvv.br

ABSTRACT

“Erva cidreira” (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) is popular for its therapeutic properties, especially its sedative properties. Such properties led to the discovery of the anesthetic action of *Lippia alba* essential oil in fish culture, but its toxic effects are unknown. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effect of *Lippia alba* essential oil in fish and mammals. The oil was extracted by hydrodistillation with Clevenger apparatus and analyzed by GC-MS where the compounds linalool, eucalyptol, γ -murolene and caryophyllene were identified as the most abundant compounds. Genotoxic action was observed by micronucleus and comet assay denoting greater fish damage than mammals and when compared to the treatments greater damage was observed in the treatment by inhalation but also had not toxic. The oxidative stress measured quantification of advanced protein oxidation products (AOPP) revealed low oxidative but significantly different harm from the control. These findings support the use of *Lippia alba* essential oil as an anesthetic for fish without prejudice to consumers.

2. INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é uma planta que se apresenta na forma de arbusto pertencente à família *Verbanaceae*, de grande conhecimento por suas propriedades terapêuticas. É utilizada principalmente sob a forma de infusões e decocções com folhas devido à ação sedativa a ela associada (GILBERT et al., 2005; TIMÓTEO et al., 2015).

As propriedades farmacológicas de *L. alba* como a ação ansiolítica, sedativa e relaxante motora em ratos passou a chamar atenção na piscicultura que desenvolveu, a partir destas ações, um anestésico para peixes (CUNHA et al., 2010). Peixes cultivados são expostos frequentemente a estímulos ou procedimentos veterinários estressantes necessitando para estes casos o uso de anestésicos (KIESSLING et al., 2009). Anestésicos convencionais como benzocaína e tricaína metanosulfonato (MS-222) podem apresentar toxicidade que podem ser transferidas ao consumidor destes peixes. Dessa forma, visando o consumo humano dos peixes, busca-se por anestésicos de origem natural que apresentem a mesma eficácia, elevada segurança e baixo custo (GOLOMAZOU et al., 2016).

A espécie *Oreochromis niloticus* é nativa do continente africano, porém, amplamente difundida por todo território brasileiro. Na região sudeste do país é a espécie mais utilizada na pesca artesanal. São de fácil reprodução e adaptação em aquários e tanques sendo, portanto, uma espécie bastante apreciada na alimentação humana devido a leveza e ao sabor. A criação desta espécie em escala comercial requer uma série de cuidados visando a qualidade do peixe produzido. Uma das medidas adotadas tem sido o uso de anestésicos que visam minimizar situações de estresse durante o manuseio e captura (HAYASHI et al., 1999; MARENGONI, 2006; PIZAIA et al., 2008; VICENTE et al., 2014).

Para isso, alternativas naturais como o uso do óleo essencial de *L. alba* como anestésico tem sido adotadas devido ao baixo custo deste (CUNHA et al., 2011). Contudo, são desconhecidos os efeitos tóxicos deste anestésico para os peixes, bem como para os mamíferos que se alimentam do peixe ou fazem uso do mesmo para saúde. Visando melhor conhecimento sobre o comportamento de novos possíveis agentes terapêuticos, estudos em torno do dano ao DNA são de grande importância,

pois a exposição a agentes genotóxicos, por exemplo, podem ter como consequência outras doenças, dentre as quais o câncer. Para este fim, são empregados com maior regularidade os ensaios de cometa alcalino e micronúcleo por sua sensibilidade e robustez (HEUSER et al., 2008; ARALDI et al., 2015). Por isso, ensaios de genotoxicidade e de estresse oxidativo em peixes e mamíferos podem dar maior perfil de segurança deste anestésico tanto para o animal tratado, quanto para o consumidor deste. Desta forma, o objetivo deste estudo é demonstrar o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial de *Lippia alba* em peixes bem como um perfil genotóxico para os humanos, os consumidores destes peixes.

3. MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

As amostras de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foram obtidas a partir de um cultivo particular na cidade de Vila Velha – ES (-20,35470° S / -40,35206° W). Tais amostras foram devidamente identificadas pela botânica Msc. Solange Zanotti Schneider e uma exsicata dos ramos foi armazenada no herbário da Universidade Vila Velha sob o número UVV 2134.

3.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *L. alba* foi obtido empregando-se o método de hidrodestilação com arraste a vapor, utilizando o aparelho de Clevenger conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram empregados aproximadamente 1 kg de folhas frescas e 1000 mL de água e o tempo de extração foi de duas horas a contados a partir do início da ebulição. A fração com o óleo foi recolhida e armazenada em frascos âmbar sob resfriamento, a 4°C e ao abrigo da luz até o momento de uso.

3.3 Determinação da composição do óleo essencial

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada em um cromatógrafo gasoso (TraceUltra - Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas (DSQII - Thermo). As substâncias voláteis foram separadas em uma coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom Califórnia, USA). A programação de temperatura foi de 60 °C, aumentando até 240 °C por uma rampa linear de 3 °C/min, permanecendo por 7 min na temperatura final. O gás de arraste utilizado foi o hélio a uma vazão constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida em 230 °C, e a temperatura da interface (CG-EM) foi mantida em 240 °C. As amostras foram diluídas em hexano (2 mg/mL) e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor no modo *splitless*. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura, realizada de 35 a 400

m/z e a tensão do detector foi de 1,6 kV. A identificação dos compostos foi realizada primeiramente pela comparação da similaridade dos espectros de massa obtidos com os da literatura (NIST 2005; ADAMS, 2009), posteriormente pela comparação do Índice Kovats com a literatura (IK) (ADAMS, 2009). Analisou-se a série homóloga de alcanos (C7 - C30) nas mesmas condições cromatográficas e, a partir dos tempos de retenção destes, foram calculados os Índices de Kovats (IK) dos compostos voláteis.

3.4 Animais experimentais

Tilápias - *Oreochromis niloticus* ($53,28 \pm 8,07\text{g}$ e $14,72 \pm 0,68\text{cm}$) provenientes de um criador particular foram transportadas para o laboratório de Ecotoxicologia Aquática no complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV onde foram mantidas em caixas de 500 L com sistema de filtração e fotoperíodo controlado (12:12h). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração comercial contendo 28% de proteína. Durante este período, a qualidade da água foi monitorada quanto a parâmetros como O_2 dissolvido, temperatura, condutividade, dureza e pH.

As características físico-químicas da água utilizada nos ensaios foram as seguintes: pH $6,6 \pm 0,23$ unidades; temperatura $29,6 \pm 0,66^\circ\text{C}$; condutividade $151,2 \pm 6,28 \mu\text{S/cm}$, concentração de oxigênio $6,45 \pm 0,30 \text{ mg/L}$. A dureza foi de $52,94 \pm 1,8 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ e amônia total de $0,92 \pm 0,09 \text{ mg/L}$.

Camundongos *Mus musculus* ($32,48 \pm 3,43\text{g}$) pertencentes a linhagem Balb/c provenientes do Laboratório de Acompanhamento experimental da Universidade Vila Velha foram utilizados. Os animais foram mantidos em condições padrões do biotério, com ração e água livre e ciclos de luminosidade a cada 12 horas e temperatura em torno de 22°C conforme estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV - Parecer Nº. 359-2015).

3.5 Preparo das soluções contendo óleo essencial

O veículo utilizado para solubilizar o óleo essencial tornando-o palatável foi preparado como proposto por Pinto et al. (2015). De modo resumido 10 mg do óleo essencial de *L. alba* foram pesados e adicionados a uma solução contendo 100 μL de

polisorbato 20 (Vetec – Sigma – Aldrich, Duque de Caxias – Rio de Janeiro - Brasil), 20 mg sacarose (Dinâmica, Diadema – São Paulo – Brasil), 1000 µL de glicerina (Dinâmica, Diadema – São Paulo – Brasil) e água ultrapura (18 W, Elga Purifier) (q.s.p 10mL). A partir desta solução, diluições foram realizadas obtendo as concentrações utilizadas no tratamento dos animais.

3.6 Conversão de dose segundo área de superfície corporal

A conversão da dose pela área de superfície corporal foi realizada de acordo com as recomendações da Food and Drug Administration (FDA). As doses administradas aos animais seguiram parâmetros como peso e área de superfície corporal (FDA, 2005). As doses foram convertidas seguindo a fórmula:

$$CED \left(\frac{mg}{kg} \right) = Peixe \text{ dose } \left(\frac{mg}{kg} \right) \times \frac{Peixe \text{ km}}{Camundongo \text{ km}}$$

Onde: CED = dose equivalente para camundongos e K_m é o fator de conversão de dose sendo calculado pela divisão entre peso (kg) e área de superfície corporal (BSA) (m^2). Este fator permite converter a dose de mg/Kg para mg/m^2 (REAGAN-SHAW, et al.,2007).

O BSA é calculado segundo a fórmula:

$$BSA = \frac{\sqrt{Altura \text{ (cm)} \times Peso \text{ (kg)}}}{60}$$

Aplicando os valores médios de peso e comprimentos dos animais obteve-se K_m de 3,61 para os peixes enquanto que nos camundongos é igual a 3. Sendo assim, tomando como exemplo o controle positivo (Ciclofosfamida 25 mg/Kg) aplicado aos peixes temos que a dose equivalente aos camundongos foi de aproximadamente 30 mg/Kg. Esta conversão foi de igual forma aplicada a todos os tratamentos por gavagem, logo, foram excluídos os tratamentos por inalação.

3.7 Desenho experimental

Após o período de aclimação, os peixes foram colocados individualmente em aquários com capacidade para 5 L onde passaram por nova aclimação por um período de 72 h, tendo os mesmos parâmetros físico-químicos monitorados. Neste período, os animais receberam alimentação duas vezes por dia.

Os camundongos foram transferidos para gaiolas individuais para ambientação por 10 dias onde tiveram ciclos de luminosidade de 12 h, temperatura em torno de 22°C, alimentação e água livres conforme estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV).

Após a aclimação, os animais (camundongos e peixes) jovens foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos com 8 animais cada, sendo classificados em grupos: controle positivo, controle negativo e grupos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba* (100-300 µg/mL) (Tabela 1) (HWANG e KIM, 2012). O controle positivo foi a ciclofosfamida (25 mg/Kg) (PRÁ et al., 2008) enquanto que o controle negativo foi exercido somente pelo veículo preparado. Os grupos tratados foram administrados com suas respectivas concentrações de óleo essencial em uma única aplicação por gavagem. Resumidamente, de acordo com o peso dos animais foi calculado o volume de óleo essencial a ser administrado. Por exemplo, um animal de 30 gramas no tratamento com 300 µg/mL foi administrado com 30 µL da solução a 300 µg/mL. Esse volume foi adicionado 170 µL de água destilada totalizando sempre um volume final de 200 µL para cada animal. Feito isso, com auxílio de uma seringa e uma cânula para gavagem os animais foram administrado com esse volume e sendo devolvidos imediatamente a gaiolo ou aquário após a administração onde permaneceram por mais 48 horas. Após o período de 48 h dessa administração, peixes foram anestesiados com Benzocaína 1% seguida de punção caudal e camundongos anestesiados com Tiopental 20mg/mL seguido de uma punção cardíaca, sendo assim, coletada a amostra sanguínea para as análises propostas.

Para efeito de comparação entre as formas de tratamento (gavagem e inalação), dois grupos foram anestesiados por inalação (n = 8 para cada grupo) com 300 µg/mL de óleo de *L. alba* e um grupo controle apenas com o veículo (etanol:agua 1:10). Para isso, os peixes foram colocados individualmente em aquários de 6L por 48 horas para aclimação. Após esse período, o anestésico (ou veículo) foi adicionado em sua concentração final no aquário disperso na água. Os peixes foram deixados na solução de anestésico até atingirem o último estágio de anestesia. Nestes grupos, foram analisados parâmetros de indução e recuperação de anestesia seguindo os estágios de anestesia utilizados por Cunha et al (2010) e Schoettger e Julin (1967) (Tabela 2).

Tabela 1. Padronização dos grupos experimentais dos animais utilizados no trabalho.

Grupos	Peixes	Camundongos	Total de animais
Controle (+)	8	8	16
Controle (-)	8	8	16
OE 100 µg/kg	8	8	16
OE 200 µg/kg	8	8	16
OE 300 µg/kg	8	8	16
OE 300 mg/L Inalação	8	-	8
Controle (-) inalação	8	-	8
Total	56	40	96

*OE = óleo essencial de *Lippia alba*

Tabela 2. Estágios de indução e anestesia em tilápias *Oreochromis niloticus* anestesiadas com 300µg/mL de óleo essencial de *L. alba* por inalação.

Estagio de anestesia	Característica comportamental
Estágio 1	Sedação - diminuição da reatividade a estímulos visuais e vibracionais. Atividade opercular e locomotora reduzida ligeiramente. De cor mais escura.
Estágio 2	Perda parcial de equilíbrio - perda de equilíbrio na corrente de água. Resposta tátil apenas para a pressão sobre nadadeira caudal ou do pedúnculo. Aumento da taxa de opercular. Capacidade de natação interrompida
Estágio 3	Perda total de equilíbrio -locomoção cessa. Movimento nadadeira pode continuar. Taxa opercular diminuída. Animal virado
Estágio 4	Perda da atividade reflexa - falta de resposta a estímulos externos particularmente pressão na nadadeira caudal ou do pedúnculo. Mínima taxa opercular próxima a cessação
Recuperação	Tempo de retorno da capacidade natatória de forma completa

Adaptado de Schoettger e Julin (1967) e Simões e Gomes (2009)

3.8 Separação de células mononucleares

A separação das células mononucleares de peixes e mamíferos foram realizados por gradiente de densidade. Para isso, uma alíquota sanguínea coletada após 48 horas de tratamento foi diluída em meio de cultura (DMEM) na proporção de 1:4 (v/v). Essa diluição então foi vertida sobre uma solução de igual volume de Histopaque®-1077 de densidade 1,077 g/mL. Após a centrifugação com rotação 450 g a 18° C por 45 minutos, as diferentes fases foram cuidadosamente coletadas e separadas em tubos. A fase contendo monócitos e linfócitos foi lavada e ressuspensa por duas vezes em solução de PBS e novamente centrifugadas a 450 g a 18°C por 10 minutos. As células mononucleares obtidas foram então mantidas em meio de

congelamento a -80°C até o momento de uso conforme adaptação do método descrito por Affonso (2006) e García-medina et al. (2011).

3.9 Ensaio de micronúcleo

Para o teste de micronúcleo foi realizado um esfregaço sanguíneo em lâmina, posteriormente fixadas com metanol P.A. por 5 minutos e em seguida foram coradas com Panotico Rapido® (New Prov) (Fenech et al. 1999; BRAIT et al., 2015; SOUZA et al., 2017). Após o preparo da lâmina a mesma foi analisada em microscópio óptico na objetiva de imersão, onde contou-se 1000 células sanguíneas (eritrócitos) de cada indivíduo (Figura 1), a fim de se quantificar os micronúcleos ou reticulócitos, no caso de mamíferos, presentes na amostra.

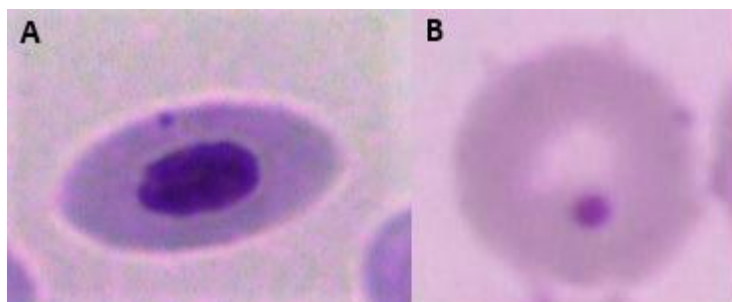


Figura 1. Micronúcleos em eritrócitos de peixes (A) e camundongos (B) observados na objetiva de imersão corados com kit corante panótico.

3.10 Ensaio do cometa

O ensaio de cometa alcalino para verificação de danos em DNA foi realizado conforme descrito primeiramente por SINGH et al. (1988), com modificações sugeridas por TONINI et al. (2013). Laminas microscópicas regulares foram revestidas com uma solução de agarose 1,5% de ponto de fusão normal (em água destilada, 60°C) e secas por um período mínimo de 24 horas e armazenadas a 4°C até o momento de uso. Após isso, cerca de 2×10^4 (5 – 15 μ L) de células mononucleares previamente separadas foram misturadas a 100 μ L de uma solução de agarose 1,0% de baixo ponto de fusão (em PBS, a 37°C) e espalhadas sobre as laminas previamente revestidas e cobertas com uma lamínula. Em seguida, as lâminas foram submetidas a gelificação a 4° C durante 20 minutos quando então as lamínulas foram removidas. Tais laminas foram então submersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5M;

EDTA 100mM; Tris 10mM; Laurilsarcosinato de sódio 10% em pH ajustado para 10 – 10,5 com adição de 1% de Triton x – 10 e 10% DMSO) a 4°C por 1 hora. Na sequência, as lamina foram lavadas por 5 minutos em água destilada e então colocadas em câmara de eletroforese coberta com uma solução tampão alcalino (NaOH a 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada durante 20 minutos em voltagem de (1,0 V.Cm⁻¹) 32 V e amperagem de 300 mA. Estes passos foram realizados na ausência de luz a fim de evitar danos adicionais ao DNA. Após esse processo, as lamina foram lavadas por 3 vezes, com duração de 5 minutos cada lavagem, com um tampão de Tris 0,4 M em pH 7,5 para neutralizar o excesso alcalino. Por fim, 30 µL de uma solução de brometo de etídio 20 µg/mL foram revestidos sobre as lamina e cobertas com uma lamínula para posterior análise em microscópio de fluorescência.

Durante a observação das lâminas foram contabilizadas 100 células por animal em duplicata e os danos no DNA classificados arbitrariamente de acordo com o tamanho da cauda do cometa. Foram adotadas cinco classes na qual: 0 – ausência de dano com causa inexistente até 4 – dano máximo com cauda de cometa longo. O Índice de Dano (ID) nos grupos irá variar de 0 (100 x 0 – 100 células com ausência de dano) a 400 (100 x 4 – 100 células com dano máximo). A pontuação foi avaliada pelo somatório da multiplicação da classe do cometa pelo número de células com estes danos (Figura 2). A frequência de dano (%) foi calculada usando porcentagem de dano em cada classe.

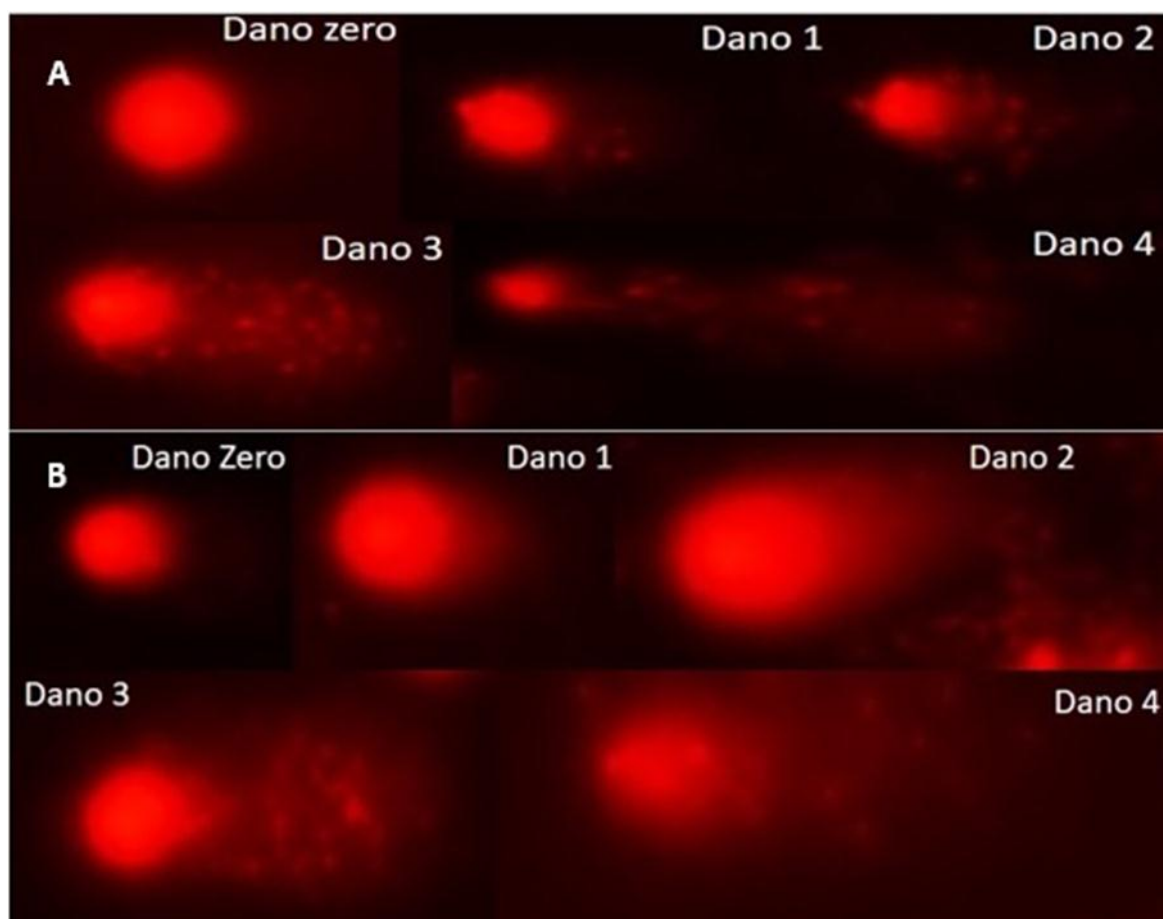


Figura 2. Classificação dos cometas de acordo com o tamanho da cauda em camundongos (A) e peixes (B).

3.11 Determinação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Bradford como reagente cromogênico (BRADFORD,1976). Após isso, as amostras de plasma sanguíneo dos animais foram diluídas em PBS 1:100 e 5µL dessa diluição adicionados a 200 µL do reagente de Bradford em uma microplaca de 96 poços e a densidade óptica foi realizada no comprimento de onda de 595nm em espectrofotômetro (Mults-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). A quantificação de proteínas totais foi obtida por regressão linear utilizando-se uma solução padrão com albumina nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL. Os resultados foram expressos em µg/mL de equivalentes de albumina (BRADFORD,1976).

3.12 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP).

A determinação do AOPP foi realizada pelo método colorimétrico utilizando a cloramina T. Para a determinação do AOPP, as amostras de plasma foram diluídas em PBS 1:5 e 40 µL dessa diluição foram adicionados com 160 µL de PBS, 10 µL de uma solução 1,16 M de iodeto de potássio e 20 µL de ácido acético glacial em uma microplaca de 96 poços. Após agitação por 6 minutos a absorbância foi lida no comprimento de onda de 340 nm. A quantificação do AOPP foi obtida por regressão linear utilizando-se a solução padrão de cloramina T nas concentrações de 5 – 100 µM. Os resultados foram expressos em µM de equivalente de cloramina T (OZENIRLER et al., 2014). O resultado final foi a razão entre a concentração de proteínas oxidadas pela concentração de proteínas totais.

3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot 12.1[®] (San Jose, California - USA). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). As comparações estatísticas foram realizadas utilizando uma análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey. Foram considerados valores significativos quando se obteve $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Composição química por GC-MS

A identificação de *L. alba* por GC-MS apresentou como compostos majoritários o linalol (47%), eucaliptol (8,92%), Muroleno (gamma) (7,49%) e cariofileno (6,14%) conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição do óleo essencial de *Lippia alba* realizada por GC-MS.

Composto	%	TR (min)	IK ¹	IK ²
Linalol	47,29	10,5	1099	1098
Eucaliptol	8,92	8,05	1033	1033
Muroleno (gamma)	7,49	26,14	1478	1479
Cariofileno (E)	6,14	23,65	1416	1418
Elemeno (beta)	3,23	22,44	1384	1386
Elemeno (gamma)	3,03	24,06	1427	1429
Sabineno	2,67	6,3	976	975
Germacreno B	2,35	29,09	1553	1555
Ocimenol (beta)	1,61	8,6	1049	1050
NI	1,49	14,9	1208	-
Cadineno (gamma)	1,12	27,6	1514	1513
NI	1,12	32,96	1654	-
Terpineol (alfa)	1,06	14,2	1191	1189
Mentadienol (p)	1,02	13,2	1169	1166
NI	0,90	26,66	1490	-
NI	0,77	11,68	1131	-
Nerolidol (E)	0,63	29,38	1560	1563
NI	0,61	20,31	1337	-
NI	0,55	32,53	1643	-
Isobutanoato de hexenil	0,36	12,44	1151	1151
Copaeno (alfa)	0,36	21,82	1373	1376
Isobutanoato de hexenil (3Z)	0,33	12,08	1142	1146
Geraniol	0,32	17,41	1269	1267
Nerol	0,30	16,13	1239	1238
Sabineno hidratado (cis)	0,28	9,41	1072	1070
Terpinen-4-ol	0,28	13,6	1178	1177
Pinocarvona	0,27	12,91	1162	1164
Óxido de Linalol (trans)	0,23	9,98	1086	1086
Citronelol	0,11	15,71	1229	1225
Cubenol (1,10-di-epi)	0,11	31,51	1614	1618
Pineno	0,09	5,3	938	939
Total	95,04			

IK¹: Índice de Kovats literatura (Adams, 2009); IK²: Índice de Kovats calculado; NI: Não identificado; %: Porcentagem relativa dos compostos.

4.2 Indução de anestesia

Os tempos de anestesia seguiram uma regressão linear (Figura 7) e o tempo médio de recuperação de anestesia foi de $383,88 \pm 160,12$ segundos. O tempo máximo de observação foi de 30 minutos.

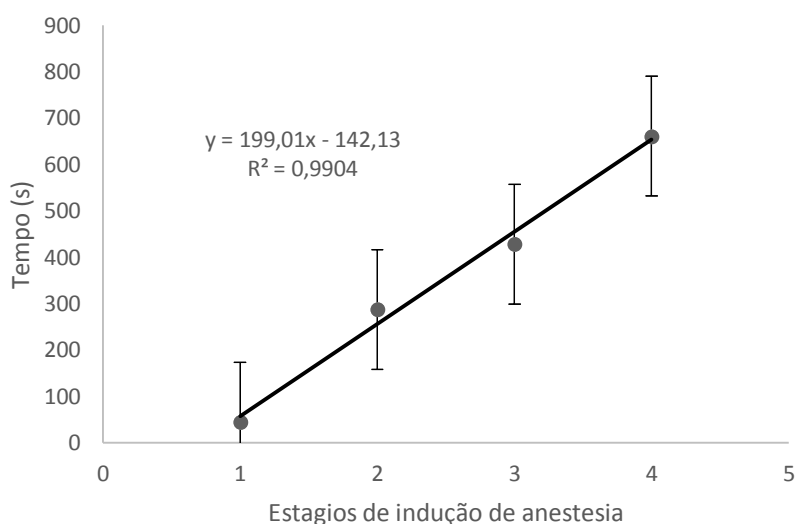


Figura 3. Curva de regressão linear entre os estágios de anestesia *versus* tempo. *Oreochromis niloticus* administrados com óleo essencial de *L. alba* na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são representados por média e desvio padrão de 8 repetições para cada estágio de anestesia.

4.3 Ensaio do Micronúcleo

O ensaio do micronúcleo demonstrou não haver diferenças entre as espécies tratadas por gavagem (Figura 4). Analisando as concentrações testadas observa-se uma semelhança entre todas as concentrações de *L. alba* testadas com o controle negativo. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foram encontrados $1,82 \pm 0,13\%$ para peixes e $1,66 \pm 0,06\%$ para camundongos, enquanto que na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ foram encontrados $1,79 \pm 0,09\%$ para peixes e $1,59 \pm 0,06\%$ para camundongos. Já na maior concentração, 300 $\mu\text{g/mL}$ foram encontrados $1,83 \pm 0,12\%$ para peixes e $1,58 \pm 0,05\%$ para camundongos. O controle negativo exercido pelo veículo demonstrou percentual de $1,73 \pm 0,13\%$ para peixes e $1,47 \pm 0,09\%$ para camundongos. Diferença evidente é observada entre estes grupos com o controle positivo exercido pela ciclofosfamida ($2,50 \pm 0,05\%$ para peixes e $2,48 \pm 0,04\%$ para camundongos) (Figura 4). O grupo de peixes tratados por inalação com 300 $\mu\text{g/mL}$

apresentou percentual de $1,54 \pm 0,13\%$ enquanto que o controle com etanol:água (1:10) apresentou $1,15 \pm 0,13\%$. Quando comparado ao tratamento por gavagem nas mesmas concentrações observa-se que houve diferenças significativas no tratamento com 300 $\mu\text{g/mL}$ por inalação em comparação ao controle ($p < 0,003$) (Figura 5).

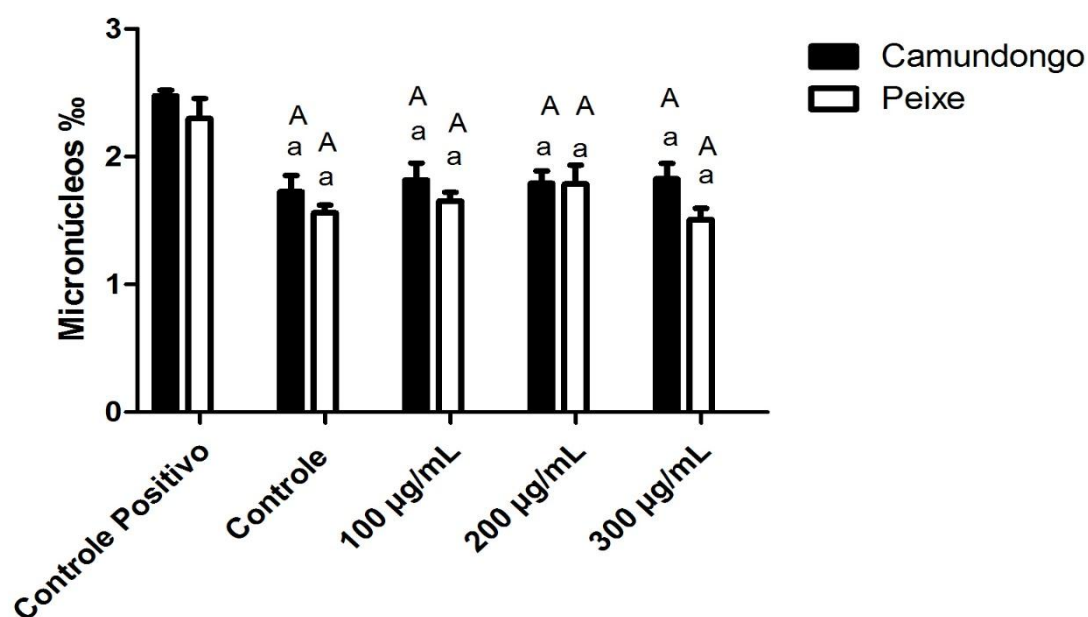


Figura 4. Micronúcleos (%) em eritrócitos de Peixes e Camundongos expostos a diferentes concentrações (100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$) de óleo essencial de *Lippia alba* por gavagem. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ como sendo 120, 240 e 360 $\mu\text{g/mL}$ para camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

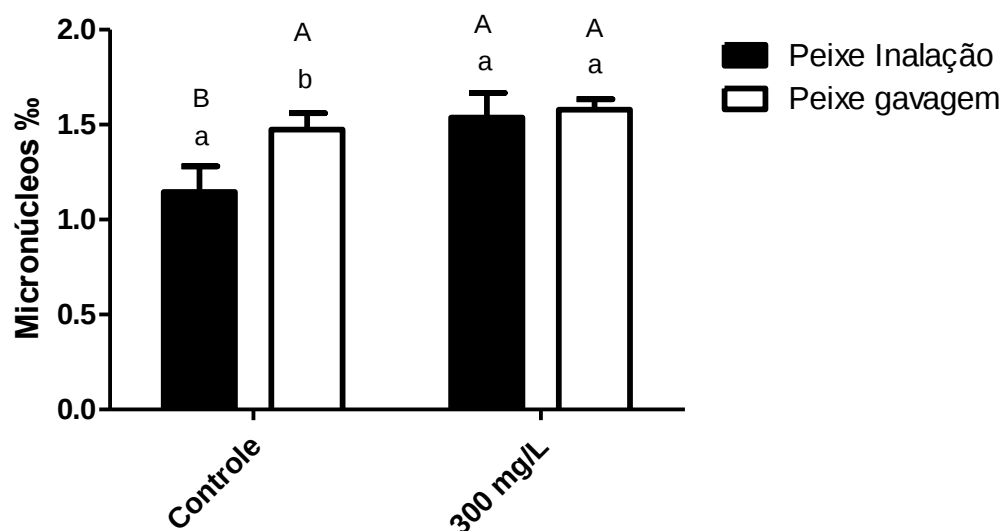


Figura 5. Micronúcleos (‰) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a concentração de 300 µg/mL de óleo essencial de *Lippia alba* em diferentes formas de tratamento (inalação e gavagem). Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

4.4 Ensaio do Cometa alcalino

A exposição a diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba* demonstrou não haver diferenças significativas entre as concentrações testadas, porém diferenças significativas são observadas entre estas e os controles para ambas as espécies estudadas (Figura 6). O índice de danos (ID) foi significativamente maior em peixes que em camundongos ($p < 0,001$). Comparando os tratamentos de peixes por gavagem e inalação observa-se que não houve diferença significativa entre as formas de exposição (Figura 7).

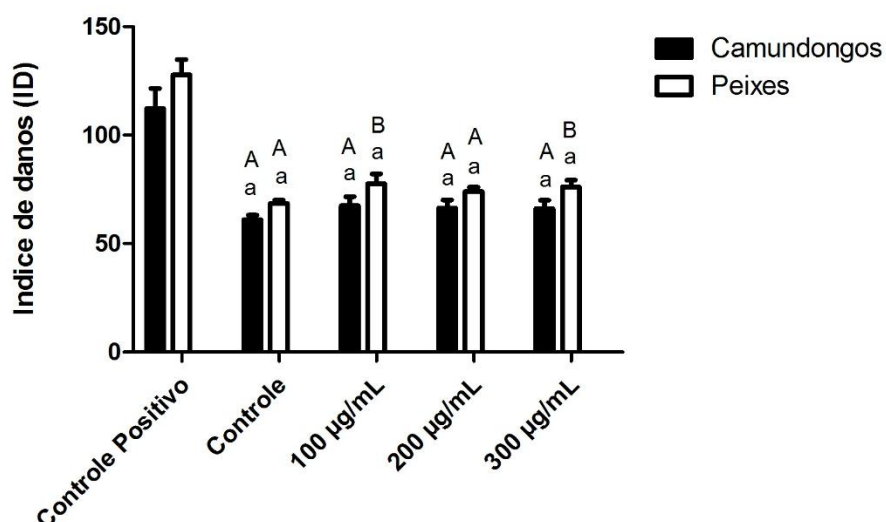


Figura 6. Índice de danos de camundongos e peixes tratados com diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba*. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100,200 e 300µg/mL como sendo 120,240 e 360 µg/mL para camundongos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

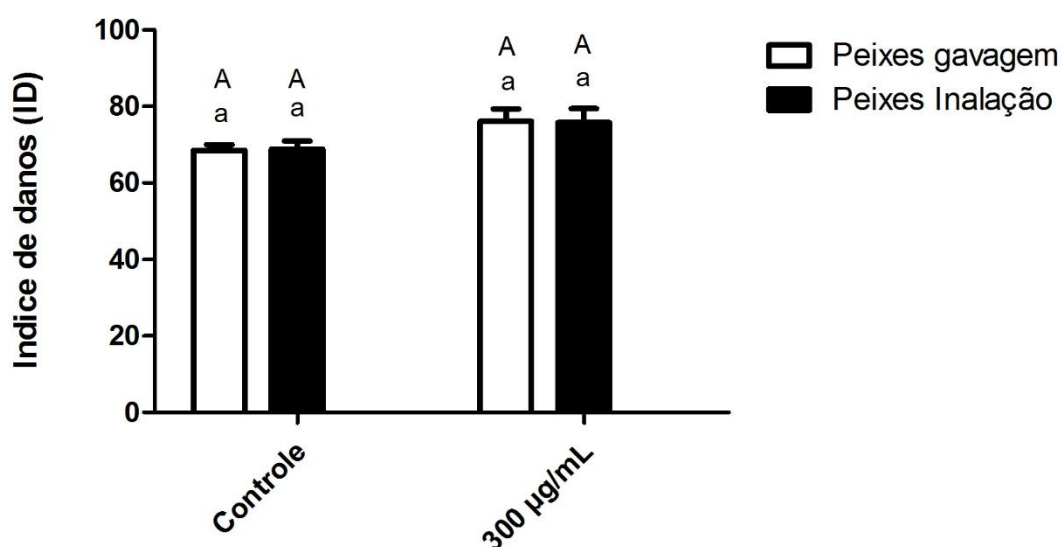


Figura 7. Índice de danos de peixes tratados por gavagem e inalação com concentração única (300µg/mL) de óleo essencial de *L. alba*. Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

Com relação a frequência de danos observa-se uma semelhança entre os grupos tratados com *L. alba* e o grupo controle para ambas as espécies com predominância de danos de classe 0 e 1. O mesmo se aplica ao tratamento por

inalação que apresentou frequência de danos semelhante ao tratamento por gavagem em todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de danos (%) nas células de camundongos e peixes expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*. Os resultados estão expressos em média percentual e desvio padrão.

Tratamento	Classe de cometa				
	0	1	2	3	4
Camundongos					
Ciclofosfamida	26,1±6,68	57,3±4,13	7,4±2,72	6,6±0,91	2,6±0,74
Controle	42,1±6,0	54,9±5,8	2,9±0,6	0,1±0,4	0,0
OE 100 µg/mL	53,6±6,5	31,9±5,8	8,3±2,4	5,9±2,5	0,4±0,1
OE 200 µg/mL	47,0±9,1	43,3±9,5	6,3±3,0	3,4±1,3	0,1±0,4
OE 300 µg/mL	47,57±9,51	41,43±8,3	8,71±2,28	1,85±0,69	0,43±0,53
Peixes gavagem					
Ciclofosfamida	38,3±7,2	22,9±3,83	14,8±2,49	11,3±4,23	12,9±1,95
Controle	40,8±3,0	53,0±4,4	4,1±2,0	1,3±0,5	0,9±0,6
OE 100 µg/mL	43,4±4,6	45,8±2,9	5,6±1,8	4,9±2,1	0,4±0,1
OE 200 µg/mL	42,4±6,5	47,6±4,9	7,9±1,2	2,9±0,8	0,5±0,2
OE 300 µg/mL	53,88±5,81	26,5±5,53	10,38±2,56	8,13±1,96	1,13±1,12
Peixes Inalação					
Controle	38,8±3,5	55,3±3,4	4,8±2,0	0,9±0,6	0,4±0,1
OE 300 µg/mL	44,4±6,85	41,3±5,60	9,1±1,72	4,8±1,75	0,5±0,3

OE: óleo essencial de *L. alba*

4.5 AOPP

A análise dos produtos avançados de oxidação proteica mostrou que nos tratamentos por gavagem em todos os grupos houve uma maior quantificação de proteínas oxidadas em peixes em relação aos camundongos ($p<0,001$). Quando comparado as concentrações no tratamento dos camundongos, percebe-se que os grupos tratados com 100 e 200 µg/mL apresentam simultaneamente semelhança com o grupo 300 µg/mL e o controle, porém estes dois últimos são significativamente diferentes entre si, enquanto que, os peixes são significativamente diferentes do controle em todas as concentrações. Em relação as espécies houve diferença significativa entre as espécies em todas as concentrações estudadas. Na

concentração de 100 µg/mL obteve-se $12,07 \pm 1,1$ µmol/L para peixes e $6,71 \pm 0,87$ µmol/L para camundongos enquanto que na concentração de 200 µg/mL $13,61 \pm 0,8$ µmol/L foram encontrados para peixes e $7,67 \pm 1,26$ µmol/L para camundongos. Já na concentração de 300 µg/mL observou-se uma quantificação de $14,05 \pm 1,33$ µmol/L para peixes e $8,64 \pm 1,19$ µmol/L para camundongos. O controle positivo exercido pela ciclofosfamida apresentou $27,75 \pm 2,75$ µmol/L para peixes e $15,58 \pm 2,07$ µmol/L para camundongos enquanto que o controle negativo (veículo) apresentou $7,66 \pm 1,53$ µmol/L para peixes e $4,2 \pm 0,76$ µmol/L para camundongos (Figura 8). Os grupos tratados por inalação apresentaram $9,08 \pm 1,22$ µmol/L para peixes tratados com 300 µg/mL e $7,17 \pm 1,24$ µmol/L para peixes tratados com o veículo por inalação (etanol:água 1:10). Observa-se quando comparados os tratamentos, não houve diferença entre os controles dos tratamentos enquanto houve uma significativa diferença entre os tratamentos com 300 µg/mL. Diferença significativa é notada entre o grupo tratado com 300 µg/mL por gavagem quando comparado ao grupo tratado por inalação (Figura 9).

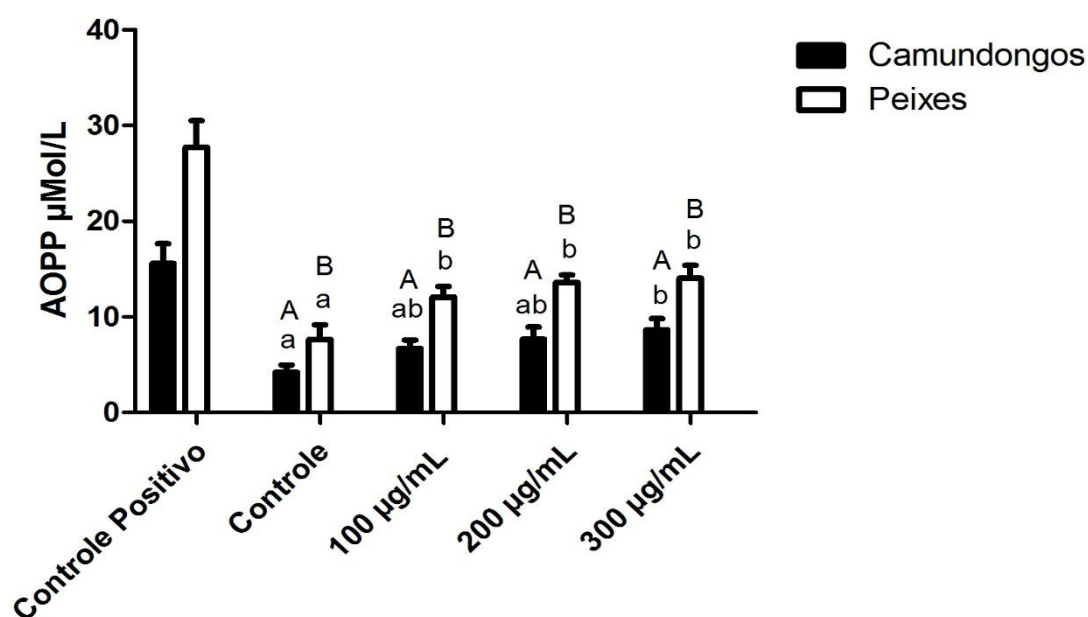


Figura 8. Quantificação de produtos avançados de oxidação proteica em peixes e camundongos tratados com diferentes concentrações de *L. alba*. Pela conversão de doses consideram-se as concentrações de 100,200 e 300 µg/mL como sendo 120,240 e 360 µg/mL para camundongos. Os dados são apresentados como média e desvio padrão Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre as espécies por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

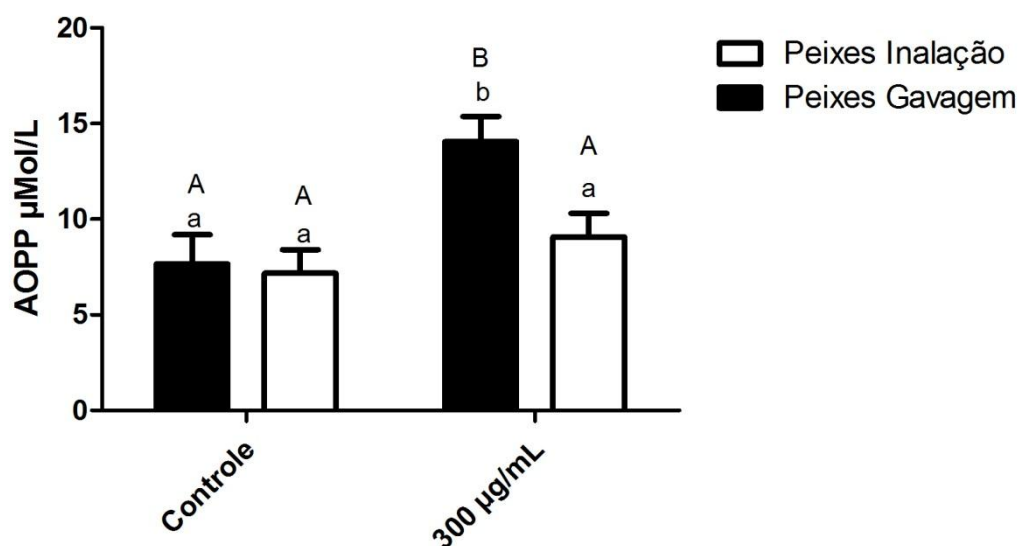


Figura 9. Quantificação de produtos avançados de oxidação proteica em peixes tratados por inalação e por gavagem com concentração única (300μg/mL) de óleo essencial de *L. alba*. Os controles foram: gavagem (sacarose 0,02%, polisorbato 20 0,1%, glicerina 1% e água destilada qsp 10mL) e por inalação (etanol: água 1:10). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de 8 repetições. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações estudadas e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de tukey ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Composição do óleo de *Lippia alba*

Muitas espécies de plantas são conhecidas por suas variações na composição química de seus óleos essenciais, e conseqüentemente, em sua atividade biológica e o óleo de *L. alba* não é diferente. Diversos estudos têm demonstrado amplas variações geográficas na composição de seus óleos e assim como inúmeras propriedades biológicas como efeitos comportamentais, atividade antifúngica e antimicrobiana (VALE et al., 1999; VERAS et al., 2011; MESA-ARANGO et al., 2014;).

Neste estudo podemos observar que o óleo extraído em nosso laboratório apresentou altos teores de linalol, eucaliptol, Muroleno-γ e cariofileno, sendo o linalol o mais abundante entre estes. Dado semelhante foi encontrado por Cunha et al (2010) e Heldwein et al (2012) que encontraram teor de linalol em torno de 37 % e 59% respectivamente. Outro estudo, porém, realizado por Tofiño-rivera et al. (2016) com *L. alba* proveniente da Colômbia demonstrou ser o geranial o composto mais abundante. Tal fato reforça que possíveis atividades biológicas de *L. alba* se dão por sinergismo de ações entre os quimiotipos e não de forma isolada. (ISMAN et al., 2008).

5.2 Indução a anestesia por inalação

Cunha et al. (2010) demonstraram que o óleo essencial de *L. alba* apresenta ações anestésicas em peixes da espécie *Rhamdia quelen* a partir da concentração de 100 µg/mL, sugerindo que ação anestésica ideal seria na concentração de 300 µg/mL. Neste estudo os pesquisadores encontraram tempos de sedação e anestesia em torno de 103 e 232 segundos respectivamente, valores inferiores aos encontrados pelo presente estudo. Porém, a recuperação da anestesia foi semelhante onde o estudo encontrou tempo de recuperação de 385 segundos.

Outro estudo realizado por Hohlenwerger et al. (2016) ao estudar a eficácia de *Lippia alba* como anestésico em tilápias propôs como concentração ideal para inalação a de 500 µL/L, afirmando não ser possível dar margem de segurança para a utilização do óleo nessa concentração sugerindo mais estudos acerca da toxicidade. Nesta concentração os tempos de sedação e anestesia foram em torno de 25 e 100

segundos e a recuperação aproximadamente 250 segundos, valores inferiores ao encontrado no presente trabalho. No presente estudo utilizando a concentração máxima de 300 µg/mL foi observado que o tempo de indução e recuperação de anestesia foi maior, porém igualmente eficaz.

5.3 Genotoxicidade

Agentes xenobioticos tem surgido a todo momento e na maioria das vezes possuem efeitos biológicos mesmo que não desenvolvidos para este fim. É consenso que a exposição a estes agentes requer conhecimento acerca da possibilidade de interação com o DNA, mesmo em caso de drogas desenvolvidas para uso humano ou veterinário. Como exemplo disso, algumas drogas tem demonstrado capacidade de causar dano ao DNA reforçando a necessidade de conhecimento do comportamento desses agentes frente ao DNA (SNYDER; GREEN, 2001; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; ARALDI et al., 2015).

Na busca por anestésicos de origem natural, não se pode negligenciar suas ações sobre macromoléculas, haja vista que órgãos competentes exigem esse conhecimento para sua liberação para uso. Como exemplo, Golomazou et al. (2016) demonstraram a ação anestésica de diversos óleos essenciais em peixes concluindo que alguns desses são capazes de aumentar o dano ao DNA. Em contrapartida sabe-se que apesar da eficácia e da liberação de uso por órgãos competentes, demonstrou-se que a benzocaina, um anestésico químico sintético, não produz danos genotóxicos em tilápias o que assegura seu uso na piscicultura (GONTIJO et al., 2003).

O ensaio do micronúcleo é um importante ensaio para mensurar genotoxicidade de compostos xenobióticos (OSS et al., 2016). Tais compostos quando metabolizados levam a geração de EROs que são normalmente eliminados por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Porém, quando o aporte dessas espécies supera a capacidade antioxidante temos instaurado o estresse oxidativo. Como as EROs são altamente reativas, estas rapidamente interagem com macromoléculas como proteínas e DNA gerando danos e perda da função (MARIANO et al., 2009b). Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática, originando-se de fragmentos ou cromossomos inteiros deixados durante a anáfase, que refletem problemas estruturais e / ou alterações cromossômicas durante a mitose. Essas mutações cromossômicas desempenham importante papel na formação de câncer por

exemplo (ÇAKAL ARSLAN et al., 2015; OSS et al., 2016). No presente trabalho observa-se que não ocorreram diferenças significativas na quantidade de micronúcleos entre os grupos testados e nem entre as espécies. Porém, quando comparados os grupos de peixes tratados por inalação e gavagem houve significativa diferença entre as formas de tratamento, mas ambas não foram mutagênicas. Estes resultados corroboram o achado de López et al. (2011) que estudaram o potencial genotóxico do óleo essencial de *L. alba* ricos em citral, limoneno e carvona concluindo que esses quimiotipos apresentam baixo perfil genotóxico para bactérias.

A mutagenicidade em tilápias também foi demonstrada por Francabandeira et al. (2007) em um estudo sobre a toxicidade de glifosato sobre essa espécie demonstrando valores de controle de $0,67 \pm 1,2$, semelhante ao presente estudo se considerado o desvio padrão. Schunk et al. (2015) avaliaram a contaminação por metais em chás comerciais em camundongos swiss encontrando valores de $1,5 \pm 1,3$ para o controle negativo de forma semelhante ao nosso estudo.

Os danos ao DNA também podem ser avaliados pelo método do cometa alcalino. O ensaio de cometa é amplamente utilizado em testes de genotoxicidade e pesquisa básica em mecanismos de dano e reparo do DNA. Este ensaio possibilita com um tratamento alcalino e eletroforese a pH alcalino, detectar rupturas de cadeia de DNA (simples ou dupla), sítios alcalis-lábeis (sítios apurínicos / apirimidínicos), através da alquilação de grupos eletronegativos do DNA, e cross-links (ALI e KUMAR, 2008; AZQUETA et al., 2011). As quebras simples ou duplas, sítios álcalis-lábeis e crosslinks provenientes da ação de compostos genotóxicos, alteram a estrutura do DNA das células que normalmente se encontra enovelado por proteínas histonas e bem compactado. Essa alteração causa relaxamento em partes da molécula que tendem a migrar em direção ao eletrodo negativo (ânodo). A capacidade migratória do DNA se dá em função tanto do tamanho da molécula como da quantidade de quebras que mesmo ligadas a segmentos maiores, migram em menor distância do corpo do cometa. O tamanho da cauda possui relação com a quantidade de danos, mas a migração do DNA é determinada pelas condições de eletroforese e não pelo tamanho dos fragmentos. A intensidade da fluorescência na cauda em relação àquela do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras no DNA. Desse modo, avalia-se o dano genético tanto por meio do comprimento da cauda do cometa, como através da quantidade de DNA presente nessa cauda. Em ambos os casos o resultado

é expresso em função da concentração de exposição ao xenobiótico (SINGH et al. 1988; FAIRBAIRN et al., 1995; COLLINS et al., 1997; AZQUETA et al., 2011).

O método do cometa alcalino fornece vantagens consideráveis em relação aos métodos citogenéticos convencionais, tais como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e teste de micronúcleo usado para detectar danos no DNA, porque para o ensaio do cometa, as células não precisam ser mitoticamente ativas (ALI e KUMAR, 2008). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram não haver diferenças entre os tratamentos e o controle indicando que o óleo de *L. alba* utilizado como anestésico para a piscicultura não acarreta em danos ao DNA dos animais anestesiados bem como dos consumidores.

Bücker e Conceição, (2012) também avaliaram a genotoxicidade de tilápias expostos na água de lagos do estado Santa Catarina – Brasil e encontrando no tempo zero de exposição índice de danos (aproximadamente 100) superior ao apresentado em nosso estudo. Andrade et al (2004) avaliando a toxicidade de poluentes em bagres (*Netuma sp.*) encontrou índice de danos para o controle de $308,0 \pm 14,0$ extensivamente superior ao observado pelo presente trabalho.

As EROs, também, podem atacar diretamente as proteínas celulares levando a perda de suas funções biológicas e até mesmo a morte celular, além de provocar alterações conformacionais, reduzir a atividade enzimática, resultando na degradação das proteínas por proteases (CHAËBANE et al., 2017). Os AOPPs são produtos de proteínas oxidadas contendo ditirosina formados durante o estresse oxidativo e são considerados como sendo marcadores confiáveis para estimar o grau de danos à proteína mediada por oxidante (ATTIA et al., 2016). Juntamente com as metodologias do cometa e micronúcleo, o AOPP fornece uma visão mais ampla do dano causado, por exemplo, por EROs formadas durante o metabolismo de xenobióticos como o óleo essencial de *L. alba*. No entanto algumas condições que não envolvem diretamente o estresse oxidativo podem naturalmente levar a oxidação proteica (SHACTER, 2000). No ensaio do AOPP percebe-se, ao analisar os controles, que o dano a proteínas ocorreu, de forma mais acentuada em peixes que em camundongos, porém em ambas as espécies foram notadas diferenças significativas nas maiores concentrações. Observados os resultados demonstrados nos ensaios de micronúcleo e cometa, esperava-se comportamento similar no AOPP. No entanto o resultado diferente denota que o dano oxidativo a proteínas pode estar relacionado a

outra condição que não o estresse oxidativo como o envelhecimento por exemplo (SHACTER, 2000).

As diferenças observadas entre os tratamentos por inalação e gavagem sugerem uma influência da farmacocinética do anestésico. Sabe-se que por via inalatória a absorção se dá em proporção menor quando comparado ao consumo por gavagem. Meinertz et al (1999) demonstraram tal fato em peixes anestesiados com benzocaina, onde após 3 minutos apenas 87% do resíduo de anestésico foi detectado em brânquias de truta arco iris. Dessa forma ao estudarmos as mesmas concentrações para peixes e camundongos elaboramos um cenário hipotético no qual toda concentração de anestésico utilizado no tratamento de peixes fosse transferida ao consumidor final (mamífero) através da alimentação, o que não ocorre em vias de fato, haja vista as diferenças metabólicas existentes entre as espécies. Vale salientar que os peixes normalmente são anestesiados por inalação e o uso do tratamento por gavagem em peixes demonstra uma hipótese de absorção total do anestésico pelo animal.

Os dados apresentados em nosso estudo mostram que nas concentrações propostas por Cunha et al. (2010) como sendo eficazes para gerar efeitos anestésicos em peixes, e principalmente na concentração dita como ótima (300 µg/mL) não apresenta dano ao DNA tanto em peixes quanto em camundongos aumentando dessa forma o arsenal de anestésicos de origem natural, eficaz, não tóxicos e de baixo custo (Tabela 5).

Tabela 5. Anestésicos de origem natural e sintética avaliados quanto a genotoxicidade em diferentes espécies animais.

Anestésico	Espécie	Genotoxicidade		Fonte
		Micronúcleo	Cometa	
<i>Lippia alba</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Não	Não	Presente estudo
<i>Benzocaína</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	Não	Gontijo et al., 2016
<i>MS-222</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	Não	Barreto et al., 2007
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Sim	Golomazou et al., 2016
<i>Eugenia aromática</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Sim	Golomazou et al., 2016
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Sim	Golomazou et al., 2016
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Não	Golomazou et al., 2016
<i>Juniperus communis</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Não	Golomazou et al., 2016
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Sparus aurata</i>	-	Não	Golomazou et al., 2016
<i>Propofol</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Não	Não	Valença-silva et al., 2014
<i>Lippia alba</i>	<i>Mus musculus</i>	Não	Não	Presente estudo
<i>Cymbopogon Martini</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i>	-	Não	Sinha et al., 2014
<i>Cymbopogon winterianus</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i>	-	Não	Sinha et al., 2014
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i>	-	Não	Sinha et al., 2014
<i>Vetiveria zizanioides</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i>	-	Não	Sinha et al., 2014

Órgãos como a *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam ensaios de genotoxicidade como requisito para a liberação de agentes como drogas. A ANVISA, por exemplo, sugere duas opções de bateria de testes (ANVISA, 2013). Na sua sugestão 2 a ANVISA recomenda um teste para mutação gênica em bactéria, como descrito por López et al. (2011), e uma avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células de roedores e um segundo ensaio *in vivo* tal qual o ensaio cometa (OECD, 2016). Diante disso, nossos resultados vão de encontro ao recomendado pelas principais agências reguladoras mundiais, tornando, portanto, o óleo essencial de *L. alba* um excelente candidato a anestésico para uso rotineiro em piscicultura.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados apresentados que demonstraram o baixo efeito genotóxico tanto em peixes quanto em mamíferos, principalmente na concentração de 300 µg/mL, considerada ideal para atingir a anestesia em peixes, pode-se assegurar o uso deste óleo na piscicultura como um anestésico natural e de baixo custo contribuindo para a melhoria da produção evitando sofrimentos desnecessários e sem prejuízos para seu consumidor final, o homem.

7 REFERENCIAS

ADAMS R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 1st ed. Carol Stream, Ill.: Allured Pub. Corp.; 2009.

AFFONSO, Sandra Freiburger. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade intata do peixe *centropomus parallelus* (POEY, 1860) causados por um hidrocarboneto polcíclico aromático (naftaleno):** Avaliação por citometria de fluxo. 2006. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Patologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006. Cap. 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Brasília-DF: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

AGUIAR, Jaciana dos Santos. **Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.** 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - Pe, 2006.

ALEXANDER S.P., MATHIE A., PETERS J.A. Guide to Receptors and Channels (GRAC). 3rd edn. **Br J Pharmacol**; 153 (Suppl 2): S1-S209. 2008

ALI, D. E KUMAR, S. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. **Science of The Total Environment**. v. 405, n. 1-3, p.345-350, 2008.

ANDRADE, V.; DE FREITAS, T.; DA SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 1, p. 57-67, 2004.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R., SINCERO, T.C.M., DA SILVA, A.C., SAVI, L.A., GAIDO, C.M., BETTEGA, J.M.R., MANCINI, M., DE ALMEIDA, M.T.R., BARBOSA, R.A., FARIAS, M.R., BARARDI, C.R.M., SIMÕES, C.M.O.. Antiviral evaluation of

plants from Brazilian atlantic tropical forest. **Fitoterapia** v. 76, n. 3-4, p. 374 – 378, 2005.

ARALDI, R. P., DE MELO, T. C., MENDES, T. B., DE SÁ JÚNIOR, P. L., NOZIMA, B. H. N., ITO, E. T., DE CARVALHO, R. F., DE SOUZA, E. B. E DE CASSIA STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ATTIA, H., AL-RASHEED, N., MOHAMAD, R., AL-RASHEED, N. E AL-AMIN, M. The antifibrotic and fibrolytic properties of date fruit extract via modulation of genotoxicity, tissue-inhibitor of metalloproteinases and nuclear factor- kappa B pathway in a rat model of hepatotoxicity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, n.1, 2016.

AZAMBUJA, C.R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A.P.K.; FINAMOR, I.A.; GARCIA, L.O.; HELDWEIN, L.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, [s.l.], v. 319, n. 1-2, p.156-161, 2011.

AZQUETA, A., MEIER, S., PRIESTLEY, C., GUTZKOW, K. B., BRUNBORG, G., SALLETTE, J., SOUSSALINE, F. E COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**. V.26, n. 3, p. 393-399, 2011.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. V. 46, [s/n], p. 446–475, 2008.

BARRETO, R. E., GONTIJO, A. M. M. C., ALVES-DE-LIMA, R. O., RAYMUNDI, V. C., PINHAL, D., REYES, V. A. V., VOLPATO, G. L. E SALVADORI, D. M. F. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 163-168, 2007.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. In: Berger, R.G. (Ed.), **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Springer, Berlin, Germany, pp. 43–86, 2007.

BRADFORD, M.M. A dye binding assay for protein. **Analytical Biochemistry.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, M.E.M.; EHLERT, P.A.D.; MING, L.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.149-156, 2005.

BRAIT, D. R.H., MATTOS VAZ, M. S., DA SILVA ARRIGO, J., BORGES DE CARVALHO, L. N., SOUZA DE ARAÚJO, F. H., VANI, J. M., DA SILVA MOTA, J., CARDOSO, C. A. L., OLIVEIRA, R. J., NEGRÃO, F. J., KASSUYA, C. A. L. E ARENA, A. C. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.73, n.3, p.699-705, 2015.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v.681,n.2-3, p.209-229, 2009.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 546p., 1v/il 2010.

BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, B. Genotoxicity evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from two sites of Itajaí-Açu River (SC, Brazil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 51-56, 2012.

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

ÇAKAL ARSLAN, Ö., BOYACIOĞLU, M., PARLAK, H., KATALAY, S. E KARAASLAN, M. A. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**. v.94, n.1-2, p.48-54, 2015.

CALZADA, F.; YÉPEZ-MULIA, L.; AGUILAR, A. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the

treatment of gastrointestinal disorders. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.367-370, 2006.

CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D.S.; CHIARATTI, T.M.; HONORATO, F.B.; BIANCHI, R.V.; PEREIRA, A.M.S. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.947-950, 2013.

CARSON, C.F., HAMMER, K.A., RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**. v.19, p. 50–62, 2006.

CHAËBANE, M., KOUBAA, M., SOUDANI, N., ELWEJ, A., GRATI, M., JAMOUCSI, K., BOUDAWARA, T., ELLOUZE CHAABOUNI, S. E ZEGHAL, N. *Nitraria retusa* fruit prevents penconazole-induced kidney injury in adult rats through modulation of oxidative stress and histopathological changes. **Pharmaceutical Biology**. v.55, n.1, p. 1061-1073, 2017.

COLLINS, A. R., DOBSON, V. L., DUŠINSKÁ, M., KENNEDY, G. E ŠTĚTINA, R. he comet assay: what can it really tell us?. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.375, n.2, p.183-193, 1997.

CONDE, R.; CORRÊA, V.S.C.; CARMONA, F.; CONTINI, S.H.T.; PEREIRA, A.M.S. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 18, n. 14, p.1197-1201, 2011.

CORRÊA, C.B.V. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt and Wilson – known as erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.73, p. 57–64, 1992.

COSTA, D.C.M.; VERMELHO, A.B.; ALMEIDA, C.A.; DIAS, E.P.S.; CEDROLA, S.M.L.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.12-17, 2014.

COUTINHO NETO, A.; NETTO, J.C.; PEREIRA, P.S.; PEREIRA, A.M.S.; TALEB-CONTINI, S.H.; FRANÇA, S.C.; MARQUES, M.O.M.; BELEBONI, R.O. The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l.], v. 61, n. 7, p.933-939, 2009.

CUNHA, M.A.; BARROS, F.M.C.; GARCIA, L.O.; VEECK, A.P.L.; HEINZMANN, B.M.; LORO, V.L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 306, n. 1-4, p.403-406, 2010.

CUNHA, Mauro Alves da. **Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown como anestésico para peixes**. 2011. 78 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - Rs, 2011.

DELGADO L., SCHMACHTENBERG O. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABA_Aα1 and GABA_B1 in the zebrafish cerebellum. **Cerebellum**, v.7, p.444-450, 2008.

DELLACASSA, E.; SOLER, E.; MENENDEZ, P.; MOYNA, P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (*verbenaceae*) from Uruguay. *Flavour Fragrance Journal*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.107-108, 1990.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA C.A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. **UNESP**, São Paulo, 2002, 604 pp.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants populary used in the Brazilian tropical Atlantic forest. **Fitoterapia**, v.73, p. 69–91, 2002.

DIAS, B.F.S.; GASTAL, M.L.A.; MONTEIRO, W., COORD. Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica Brasil. Brasília: Min. Meio Amb.Rec.Hidr. **Amazônia Legal**, 1998, 283p.

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L. E O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. v.339, n.1, p.37-59, 1995.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, U.S. **Food and Drug Administration**, Rockville, Maryland, USA; 30pp. 2002.

FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W. P., ZEIGER, E. E BONASSI, S. The Human Micronucleus Project — An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.428, n.1-2, p.271-283, 1999.

FISCHER, U.; LOPEZ, R.; PÖLL, E.; VETTER, S.; NOVAK, J.; FRANZ, C.M. Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. **Flavour Fragrance Journal**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.333-335, 2004.

FORERO-PENUELA, L.Y.; BIASI, L.A.; BIZZOB, H.R.; SOUZA, M.S.; DESCHAMPS, C. Potential of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britt. & P. Wilson, as available source of linalool in southern Brazil. **Journal Of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.464-467, 2013.

FRANCABANDEIRA, A. I., RAMOS, C. I., OLIVEIRA, T. M., HASHIMOTO, E. H., VANZELLA, T. P., CÓLUS, I. M. D. S., OLIVEIRA, M. D. C. B. E HIROOKA, E. Y. Genotoxicity of glyphosate-Microcystis aeruginosa cell extract association in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Biosaúde**, v. 9, n. 1-2, p. 1-15, 2007.

GARCÍA-ABARRIO, S.M.; MARTINA, L.; BURILLO, J.; DELLA PORTA, G.; MAINAR, A.M. Supercritical fluid extraction of volatile oil from *Lippia alba* (Mill.) cultivated in Aragón (Spain). **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 94, p.206-211, 2014.

GARCÍA-MEDINA, S.; RAZO-ESTRADA, A.C.; GALAR-MARTINEZ, M.; CORTÉZ-BARBERENA, E.; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJADAR, E. Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p.113-118, 2011.

GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; ALEXANDRE, M. M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.477-480, 2004.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. Monografias de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas, **Ed. ABIFITO**, 2005, 250 pp.

GOLOMAZOU, E., MALANDRAKIS, E. E., KAVOURAS, M., KARATZINOS, T., MILIOU, H., EXADACTYLOS, A., PANAGIOTAKI, P. Anaesthetic and genotoxic effect of medicinal plant extracts in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture**, v.464, p.673-682, 2016.

GONTIJO, Á. M.M.C., BARRETO, R. E., SPEIT, G., REYES, V. A.V., VOLPATO, G. L., SALVADORI, D. M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.534, n.1-2, p.165-172, 2003.

HALDAR, S.; KAR, B.; DOLAI, N.; KUMAR, R.B.S.; BEHERA, B.; HALDAR, P.K. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, [s.l.], v. 2, p.667-670, 2012.

HAYASHI, C., BOSCOLO, W.R., SOARES, C.M., BOSCOLO, V.R., GALDIOLI, E.M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum**, v. 21, n.3, p.733-737, 1999.

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; GAI, E.Z.; ROMAN, C.; PARODI, T.V.; BURGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. S -(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*).**Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.621-629, 14 mar. 2014.

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F.M.C.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C.A.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.436-443, 2012.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F.. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.211-222, 2008.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F.. The Essential Oil of *Lippia alba*: Analysis of Samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works. **Chemistry & Biodiversity**, Guadeloupe, v. 3, n. 1, p.1116-1125, 2006.

HEUSER, V.D.; ANDRADE, V.M.; PERES, A.; BRAGA, L.M.G.M.; CHIES, J.A.B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.1223-1229, 2008.

HOHLENWERGER, J. C., EDUARDO COPATTI, C., CEDRAZ SENA, A., DAVID COUTO, R., BALDISSEROTTO, B., HEINZMANN, B. M., CARON, B. O. E SCHMIDT, D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine And Freshwater Behaviour And Physiology**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.119-126, 2016.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; HUSSAIN SHERAZI, S.T.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.986-995, 2008.

HWANG, E.S.; KIM, G.H. Safety evaluation of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil by assessing micronucleus abnormalities, mutagenicity, and chromosomal aberration. **Food Research International**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.267-271, 2012.

ISMAN, M.B., WILSON, J.A., BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia* in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p.82–87, 2008.

JEZLER, C.N.; OLIVEIRA, A.R.M.F.; BATISTA, R.S.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, D.C.; COSTA, L.C.B. *Lippia alba* morphotypes *cidreira* and *melissa* exhibit significant

differences in leaf characteristics and essential oil profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.217-223, 2013.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v.13, p.36-38, 2003.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I.H; SAMUELSEN, O.B.. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, [s.l.], v. 286, n. 3-4, p.301-308, 2009.

KIM Y.J., NAM R.H., YOO Y.M., LEE C.J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neuroscience Letters**, v.355, p. 29-32, 2004.

LINSTROM P, MIROKHIN Y, TCHEKHOVSKOI D, YANG X. NIST Mass Spectral Search Program. Gaithersburg-USA: **National Institute of Standards and Technology (NIST)**; 2005.

LÓPEZ, M.A.; STASHENKO, E.E.; FUENTES, J.L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics And Molecular Biology**, Bucaramanga, Colombia., v. 3, n. 34, p.479-488, 2011.

LORENZI, H.; MATOS F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, São Paulo, 2002, 530 pp.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. **Flavour Fragrance Journal**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.356-359, 2001.

MARENGONI, N. Production of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (chitralada strain) reared in cages with different stocking densities. **Archivos de zootecnia.**, v.55, n.210, p.127-138, 2006.

Mariano, W.S, Oba, E.T., Assis, H. S. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES. In: Saran Neto A, dos Santos Mariano W, P. Sória S, ed. by.

Tópicos Especiais em Saúde e Produção Animal. 1st ed. São Carlos - SP: Pedro & João Editores; p. 81 – 106, 2009b.

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; FERNANDES, M.N. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.** v.10, n. 1, p. 210-223, 2009a.

MATOS, F.J.A. As ervas cidreiras do nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). Parte I. Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.72, n.2, p.65–67, 1996.

MEINERTZ, J. R., STEHLY, G. R. E. GINGERICH, W. H. METABOLISM, ELIMINATION, AND PHARMACOKINETICS OF THE FISH ANESTHETIC BENZOCAINE. In: Smith D, Gingerich W, Beconi-Barker M, ed. by. **Xenobiotics in Fish.** 1st ed. New York: Plenum Publishers; 1999. p. 189-200.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. In: Sanseverino, M.T.V.; Spritzer, D.T; Schuler-Faccini, L. (Org.). **Manual de teratogênese.** Porto Alegre: Editora da universidade, UFRGS, p. 423-450. 2001.

MESA-ARANGO, A. C.; BETANCUR-GALVIS, L.; MONTIEL, J.; BUENO, J. G.; BAENA, A.; D.C. DURÁN; MARTÍNEZ J. R.; STASHENKO, E. E. Antifungal Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Lippia alba* (Miller) N.E Brown Grown in Different Regions of Colombia. **Journal Of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.568-574, 2010.

NAKATSU, T.; LUPO, A.T.; CHINN, J.W.; KANG, R.K.L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Studies in Natural Products Chemistry.**, v.21, p.571–631, 2000.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: DIAS, Marcos Tavares. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá- Ap: Embrapa, Cap. 8. p. 226-247. 2009.

OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, 2016.

OSS, R. N., KAMPKE, E. H., CHIPPARI-GOMES, A. R. E GOMES, L. C. The effects of subchronic exposure to copper in fat snook (*Centropomus parallelus*). **Aquatic Toxicology**, v.177, p.441-445, 2016.

OZENIRLER, S.; ERKAN, G.; KONCA DEGERTEKIN, C.; ERCIN, U.; CENGİZ, M.; BILGIHAN, A.; YILMAZ, G.; AKYOL, G. The relationship between advanced oxidation protein products (AOPP) and biochemical and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Journal Of Digestive Diseases**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.131-136, 2014.

PALIĆ, D.; HEROLT, D.M.; ANDREASEN, C.B.; MENZEL, B.W.; ROTH, J.A.. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, [s.l.], v. 254, n. 1-4, p.675-685, 2006.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E; MATA, S.; VILLAR, A.. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 76, n. 3, p.201-214, 2001b.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Il Farmaco**, [s.l.], v. 56, n. 5-7, p.501-504, 2001a.

PILUZZA, G., VIRDIS, S., SERRALUTZU, F. E BULLITTA, S. Uses of plants, animal and mineral substances in Mediterranean ethno-veterinary practices for the care of small ruminants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 87-99, 2015.

PINO, J.A.; GARCIA, J.; MARTINEZ, M.A. Solvent Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Leaf. **Journal Of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.341-343, maio 1997.

PINTO, F. E., HERINGER, O. A., SILVA, M. A., ANDRADE, T. U., RIBEIRO, J. S., LENZ, D., LESSA, F. C. R.; ENDRINGER, D. C. Stability and disinfecting proprieties of the toothbrush rinse of the essential oil of *Protium heptaphyllum*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.9, n.6, p.173-181. 2015.

PIZAIA, M., CAMARA, M., SANTANA, M., ALVES, R. A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de "*Oreochromis niloticus*". **XLVI Congresso da sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Rio Branco: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural; 2008. p. 1-16.

PRÁ, D., FRANKE, S. I. R., GIULIAN, R., YONEAMA, M. L., DIAS, J. F., ERDTMANN, B. E HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **BioMetals**, v.21, n.3, p.289-297, 2008.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v.62, p.250-264, 2014.

REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v.22, n.3, p.659-661, 2007.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu - Sp, v. 13, n. 4, p.486-491, 2011.

SCHOETTGER, R.A., JULIN, M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. **Investigations in Fish Control**, U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Resource Publication, v.13, p.1–15. 1967.

SCHUNK, P. F. T., KALIL, I. C., PIMENTEL-SCHMITT, E. F., LENZ, D., DE ANDRADE, T. U., RIBEIRO, J. S. E ENDRINGER, D. C. ICP-OES and Micronucleus Test to Evaluate Heavy Metal Contamination in Commercially Available Brazilian Herbal Teas. **Biological Trace Element Research**, v. 172, n. 1, p. 258-265, 2015.

SHACTER E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples*. **Drug Metabolism Reviews**, v.32, n.3-4, p.307-326, 2000.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N.K.. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 135, n. 2, p.165-170, 2009.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Efficacy of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet and their major constituents on mortality, oviposition and feeding behaviour of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], n. 91, p.2287-2283, 2011.

SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; RAMOS, M.F.S.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.C.K.V.; AQUINO NETO, F.R.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v.50, n. 12, p.3518-3521, 2002.

SIEGHART W. Structure, pharmacology, and function of GABA_A receptor subtypes. **Advances in Pharmacology**, v.54, p. 231- 263, 2006.

SIMÕES, L.N.; GOMES, L.C.. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.613-620, 2009.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L.. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, Nova Iorque, v. 175, n. 1, p.184-191, 1988.

SINHA, S., JOTHIRAMAJAYAM, M., GHOSH, M. E MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71-77, 2014.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v.488, n.2, p.151-169, 2001.

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

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; TORRES, G.A.; VICCINI, L.F. Chromosome banding and essential oils composition of Brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia**, Lavras - Mg, v. 4, n. 64, p.711-715, 2009.

SOUZA J, MONTALVÃO M, DA SILVA A, DE LIMA RODRIGUES A, MALAFAIA G. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. **Chemosphere.**, v.175, p.521-533, 2017.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTINEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v.1025, n.1, p.93-103, 2004.

TANELIAN D.L., KOSEK P., MODY I., MACIVER M.B. The role of the GABA_A receptor/chloride channel complex in anesthesia. **Anesthesiology**, v.78, p.757-776, 1993

TEIXEIRA, B., MARQUES, A., RAMOS, C., NENG, N.R., NOGUEIRA, J.M., SARAIVA, J.A., NUNES, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops And Products**. v.43, p. 587–595, 2013.

TELES, S.; PEREIRA, J.A.; SANTOS, C.H.B.; MENEZES, R.V.; MALHEIRO, R.; LUCCHESI, A.M.; SILVA, F. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.247-252, 2012.

TIMÓTEO, P.; KARIOTI, A.; LEITÃO, S.G.; VINCIERI, F.F.; BILIA, A.R. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 175, p.366-373, 2015.

TOFIÑO-RIVERA, A., ORTEGA-CUADROS, M., GALVIS-PAREJA, D., JIMÉNEZ-RIOS, H., MERINI, L. E MARTÍNEZ-PABÓN, M. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.194, p.749-754, 2016.

TONINI, C.L.; CAMPAGNARO, B.P.; LOURO, L.P.S.; PEREIRA, T.M.C.; VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative

Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.3325-3342, 2013.

VALE ,T.G., MATOS, F.J.A., LIMA, T.C.M., VIANA, G.S.B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**., v.67, p.127-133, 1999.

VALENÇA-SILVA, G., BRAZ, M. G., BARRETO, R. E., SALVADORI, D. M. F. E VOLPATO, G. L. Low Dose of the Anesthetic Propofol Does Not Induce Genotoxic or Mutagenic Effects in Nile Tilapia. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 143, n. 2, p. 414-419, 2014.

VEECK, A.P.L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L.F.; BECKER, A.G.; HELDWEIN, C.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T.. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 93, n. 4, p.955-960, 2012.

VERAS, H.N.H.; CAMPOS, A.R.; RODRIGUES, F.F.G.; BOTELHO, M.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Essential Oil Interfere with Aminoglycosides Effect Against *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.574-581, 2011.

VICINI, L.F.; SILVEIRA, R.S.; DO VALE, A.A.; CAMPOS, J.M.S; REIS, A.C.; SANTOS, M.O.; CAMPOS, V.R.; CARPANEZ, A.G.; GRAZUL, R.M.. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 59, p.14-19, 2014.

VICENTE, I. S. T., ELIAS, F. E E. FONSECA-ALVES, C. Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**., v.37, n.4, p.392-398, 2014.

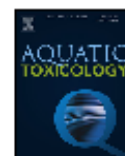
ZÉTOLA M.; DE LIMA T.C.M.; SONAGLIO D.; GONZÁLEZ–ORTEGA G.; LIMBERGER R. P.; PETROVICK P.R.; BASSANI V.L. CNS activities of liquid and spraydried extracts from *Lippia alba* – *Verbenaceae* (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**., v.82, p.207–215, 2002.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S.
Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown growing wild in the Brazilian Amazon.
Flavour Fragrance Journal.,[s.l.], v. 13, n. 1, p.47-48, 1998.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

The effects of subchronic exposure to copper in fat snook (*Centropomus parallelus*)



Rodrigo Nunes Oss, Edgar Hell Kampke, Adriana Regina Chippari-Gomes, Levy Carvalho Gomes*

Laboratório de Ictiologia Aplicada—Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Vila Velha, ES, 291 02-770, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2016

Received in revised form 22 June 2016

Accepted 23 June 2016

Available online 24 June 2016

Keywords:

Ecotoxicology

Metals

Growth

Genotoxicity

Water contamination

ABSTRACT

Anthropogenic processes affect different communities through the release of contaminated effluents into water bodies. Copper can be found in the effluents of most industrial processes and in other effluent types. The fat snook *Centropomus parallelus*, found from Florida in the United States to southern Brazil, is of great economic importance and is used as a food resource near the coast. This study aimed to determine the effects of copper on *C. parallelus*. The fish were exposed for 30 or 60 days to treatments of 0, 13 and 26 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. Genotoxic effects of copper were observed in the micronuclei, especially in individuals exposed to higher concentrations. Copper exposure also had a negative effect on the growth of fat snook individuals. Compared to the control group without the addition of metal, an accumulation of metal was observed in the gills of exposed fish, an effect that was not found in the muscle.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aquatic environments receive high loads of heavy metals daily, including copper (Bopp et al., 2008; Buck et al., 2007; Joyeux et al., 2004). Because copper is a constituent of many domestically used products, it is found extensively in sewage, domestic wastes, and pesticides (El Hadri et al., 2012; Balint et al., 2015; Zhang et al., 2016). Improper disposal of such contaminants leads to copper accumulation in both soil and water (Zhang et al., 2016). Other sources of copper contamination include port activities that often release waste-containing trace metals into the water, especially when located close to estuarine environments. This causes damage to marine life and humans, in whom copper accumulation can lead to Alzheimer's disease and other conditions (Vieira et al., 2009; Barbosa et al., 2012; Khan et al., 2013; Koupaie and Eskicioglu, 2015).

At low concentrations, copper possesses important functions in organisms. In fish, copper is necessary for the metabolism of various nutrients and is a constituent of various enzymes involved in antioxidant defense mechanisms (Ferrari et al., 2004; Oliveira et al., 2008). However, concentrations slightly above the required level lead to dysfunctions in the fish body, including the loss of appetite, reduced growth, stress, and bioaccumulation (Gagnon

et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Gharedaashi et al., 2013). Additionally, in certain situations, a transition from copper II to copper I that is inadequately metabolized can generate reactive oxygen species, leading to cell damage via processes such as lipid peroxidation and genotoxic effects (Simonato et al., 2016).

The fat snook (*Centropomus parallelus*) is an estuarine fish species (Tsuzuki et al., 2007) that is subject to prolonged copper exposure in the environment, particularly in highly urbanized areas. Therefore, to better understand the effect of subchronic exposure to low copper levels, it is important to study invisible responses, such as the micronucleus frequency and metal accumulation. Under subchronic exposure conditions, invisible responses can impair the functions of the organism (i.e., fish growth); under extreme conditions, these responses can impair the conservation and maintenance of the species. The reduced growth caused by tissue copper accumulation is particularly important due to its population level effects. To highlight the importance of the study of invisible responses on this fish species, on November of 2015 the Doce River basin in Southeastern Brazil suffered its greatest environmental impact due the collapse of two mining dams (Escobar, 2015), resulting in the release of high concentrations of metals, including copper. As a result, wild *C. parallelus* populations living in the Doce River estuary were chronically exposed to copper. The present study tested the effects of prolonged exposure (30 and 60 days) to low copper concentrations on the growth parameters, genotoxicity, and copper accumulation in *C. parallelus*.

* Corresponding author.

E-mail addresses: levygc@yahoo.com.br, levy.gomes@uvv.br (L.C. Gomes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.019>

0166-445X/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

**In vitro cytotoxic activity of *Tribulus terrestris* Linn and
protodioscin**

***Claudio C. Oliveira Filho,¹ Edgar H. Kampke,¹ Thais S. Vargas,¹ Nathacha A.
Salustriano,¹ Rodrigo Scherer,¹ Márcio Fronza,¹ Bianca P. Campagnaro*¹***

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, Brazil

*Correspondence:

Bianca P. Campagnaro, PhD - biancacampagnaro@yahoo.com.br

Rua Mercúrio, s/n, Boa Vista 1, Vila Velha – ES, Brazil, 29.102-623