

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
PROF. DELBY FERNANDES MEDEIROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**JANA LUIZA TOSCANO MENDES DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL E  
OFTALMOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum  
vulgare* L., LAMIACEAE**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2011**  
**JANA LUIZA TOSCANO MENDES DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL E  
OFTALMOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum  
vulgare* L., LAMIACEAE**

Tese apresentada ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do **Laboratório de Tecnologia Farmacêutica** da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de concentração: **FARMACOLOGIA**

**Orientadora:**  
**PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO  
DINIZ**

**João Pessoa – PB**  
**2011**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

O48i Oliveira, Jana Luiza Toscano Mendes.

Investigação da toxicidade geral e oftalmológica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., Lamiaceae / Jana Luiza Toscano Mendes Oliveira. - João Pessoa, 2011.  
109 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Melo Diniz.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antibacteriana. 2. *Origanum vulgare* L.  
3. Óleo essencial. 4. Conjuntivite bacteriana. 5.  
Investigação oftalmológica. 6. Ensaio toxicológico.  
I. Diniz, Margareth de Fátima Melo. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.281.9(043)

**JANA LUIZA TOSCANO MENDES DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL E  
OFTALMOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum  
vulgare* L., LAMIACEAE**

**Aprovado em 01 de abril de 2011**



**PgPN SB**  
Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

Ata da 128ª (Centésima vigésima oitava) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **JANA LUIZA MENDES DE OLIVEIRA**, candidata ao Título de "Doutor" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Às 14h00 (quatorze horas) do dia primeiro de abril do ano dois mil e onze (01.04.2011), no Auditório do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Professor Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniu-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Jana Luiza Toscano Mendes de Oliveira**, candidata ao Título de "DOUTOR" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores Raquel Linka Beniz Gouveia, Ph.D. em Ciências; Edeltrudes de Oliveira Lima, Ph.D. em Farmácia; Marcelo Sobral da Silva, Ph.D. em Química Orgânica; Davi Antas e Silva, Ph.D. em Farmacoquímica e Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Ph.D. em Farmacologia. Todos integrantes do Corpo Docente dessa Universidade. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca, professora Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, após declarar os objetivos da reunião apresentou a candidata **Jana Luiza Toscano Mendes de Oliveira**, a quem concedeu a palavra para que disertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Investigação da Toxicidade Geral e Oftalmológica do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae)". Após discorrer sobre o referido tema durante cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Ato contínuo passou a comissão em caráter secreto a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em Face da aprovação, declarou a Presidente, achar-se a examinada **Jana Luiza Toscano Mendes de Oliveira** legalmente habilitada a receber o Título de "DOUTOR" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Tânia Maria Alves de Araújo (Secretária)

Prof. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Orientadora)

Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Examinadora)

Prof. Dra. Raquel Linka Beniz Gouveia (Examinadora)

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva (Examinador)

Prof. Dr. Davi Antas e Silva (Examinador)

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
Casa Postal 5009 - Cidade Universitária - 58051-970 - João Pessoa - Paraíba - Brasil

*Dedicatória*

---

Ao meu Grande amor e companheiro da vida, Walter

# Agradecimientos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, por ser a pessoa mais importante na minha formação acadêmica, fazendo parte dela desde a graduação no curso de medicina e sendo grande influência científica até os dias atuais;

Agradeço à minha mãe, Maria das Graças Albuquerque Toscano, maior incentivadora da minha vida acadêmica, sempre enaltecendo a importância do conhecimento científico e do estudo para uma vida plena e mostrando os melhores caminhos para alcançar meus objetivos;

Agradeço ao meu marido, Walter Mendes de Oliveira Júnior, pela prontidão em ajudar sempre e em qualquer situação para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço à Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, por ter aberto as portas de seu laboratório para realização de grande parte deste estudo e pela gentileza ao passar seus valiosos ensinamentos;

Agradeço aos meus filhos, Arthur Toscano Mendes de Oliveira e Maria Luiza Toscano Mendes de Oliveira, por serem o combustível para minha busca em ser melhor.



# Resumo e Abstract

## RESUMO

OLIVEIRA, JANA LUIZA TOSCANO MENDES. **Investigação da Toxicidade Geral e Oftalmológica do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* L., Lamiaceae** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

A conjuntivite bacteriana é uma das doenças oculares mais comuns e seu tratamento é feito com antibioticoterapia tópica de largo espectro. Em testes farmacológicos preliminares, o óleo essencial de *Origanum vulgare* demonstrou boa atividade antibacteriana contra agentes colhidos do fundo de saco conjuntival de portadores da doença. O objetivo deste estudo foi realizar ensaios toxicológicos pré clínicos, agudo e subcrônico, e avaliação da irritação ocular aguda com o óleo essencial de *Origanum vulgare*. O estudo toxicológico pré clínico agudo foi realizado usando camundongos albinos suíços (*Mus musculus*). Para determinação da DL<sub>50</sub>, os animais foram tratados com 2g/kg do óleo essencial por via oral e observados por sete dias, ao final dos quais, não foi evidenciada nenhuma morte. Também não foram observadas alterações comportamentais, de evolução ponderal e nem no consumo de alimentos e água. O exame anatomopatológico dos órgãos vitais não apresentou alterações ao final do experimento. Tais achados sugerem baixa toxicidade da substância teste. Para o ensaio toxicológico subcrônico, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), divididos em quatro grupos, aos quais administrou-se, por via oral, o óleo essencial de *Origanum vulgare* nas concentrações de 1, 3 e 9%. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo e os animais foram observados por 28 dias. Não ocorreu nenhum caso de mortalidade. Com relação à evolução ponderal, consumo de água e ingestão de rações não surgiram alterações que caracterizem toxicidade importante. Não houve alteração na análise da temperatura colônica dos animais, nem com relação à glicemia caudal, indicando que o óleo essencial não altera o metabolismo e utilização da glicose. Não se observou alteração no tempo de permanência na barra no teste do “rota rod” em nenhum dos grupos estudados, indício de que o óleo essencial não possui efeitos neurotóxicos. No teste do campo aberto, houve um aumento do parâmetro ambulação e levantar em machos tratados com a maior dose do óleo essencial, comportamento semelhante a substâncias estimulantes motoras, sugerindo uma maior sensibilidade em machos. Quanto aos exames bioquímicos, foram evidenciadas alterações como eventos isolados, não tendo, aparentemente, importância clínica. Em relação à análise hematológica, o aumento do número de plaquetas nos machos foi expressivo, tanto do ponto de vista estatístico como clínico, podendo significar toxicidade esplênica. No estudo anatomopatológico dos órgãos, não foram evidenciadas alterações. O teste de irritação ocular aguda foi feito utilizando-se coelhos albinos neozelandeses (*Oryctolagus cuniculus*), aplicando-se 0,1 ml do óleo essencial, nas concentrações de 1, 3 e 9%, no fundo de saco conjuntival de um dos olhos do animal e tomando o outro olho como controle. O teste classificou o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 1%, como substância não irritante e nas concentrações de 3 e 9%, como praticamente não irritante, o que sugere segurança do uso do produto como agente terapêutico na superfície ocular.

**Palavras-chave:** *Origanum vulgare* L., Óleo essencial, Ensaios toxicológicos, Investigação oftalmológica

## ABSTRACT

OLIVEIRA, JANA LUIZA TOSCANO MENDES. **Investigation of the General and Ophthalmological Toxicity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* L., Lamiaceae** (Thesis). Graduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products

Bacterial conjunctivitis is one of the most common eye diseases and it is treated with topical broad-spectrum antibiotics. On preliminary pharmacological tests, the essential oil *Origanum vulgare* showed good antibacterial activity against agents learned from the conjunctival sac of carriers with the disease. The aim of this study was to conduct preclinical toxicological studies, acute and subchronic, and the assessment of ocular irritation with the essential oil *Origanum vulgare*. The acute clinical toxicology study was carried out using Swiss albino mice (*Mus musculus*). To determine the LD<sub>50</sub>, the animals were treated with 2g/kg of essential oil orally and observed for seven days, at the end of which, not one death was evident. There were also no abnormal behavior, weight gain and not in consumption of food and water. The pathological examination of vital organs showed no changes in the final experiment. These findings suggest low substantial toxicity of the test. For the subchronic toxicity study, rats were used (*Rattus norvegicus*) and divided into four groups, these of which were administered orally, the essential oil *Origanum vulgare* with concentrations of 1, 3 and 9%. The control group was treated only with the delivery system and the animals were observed for 28 days. No cases of mortality occurred. With respect to weight gain, water and food consumption, this did not suggest any changes which characterize any important toxicity. There was no change in the analysis of colonic temperature in the animals, nor with respect to glucose flow, indicating that the oil did not alter metabolism and glucose utilization. No change was observed in the time spent in the bar test "rotarod" in any group, indicating that the essential oil does not have neurotoxic effects. In the open field test, an increase of the parameter ambulation and rearing in males treated with the highest dose of essential oil, similar behavior to motor stimulant, suggesting a greater sensitivity in males. As for the biochemical tests, changes were observed as isolated events and did not appear to have clinical significance. In relation to a haematologic analysis, the increase in the number of platelets in males was significant, from a statistical perspective as a clinician, it can mean splenic toxicity. In pathological organ tests, there were no changes. The acute eye irritation test was done using New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), applying 0.1 ml of essential oil at concentrations of 1, 3 and 9% in the conjunctival sac of one eye of the animal and using the other eye as control. The test determined the essential oil of *Origanum vulgare* 1%, as a non-irritating substance and the concentration of 3 and 9%, as practically non-irritating, suggesting safety of the product as a therapeutic agent in ocular surface ...

**Keywords:** *Origanum vulgare* L. essential oil, Toxicological studies, ophthalmologic observation

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA-Análise de Variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST- Aspartato Transaminase

ALT- Alanina Transaminase

CHCM- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

CIM-Concentração Inibitória Mínima

CNS-Conselho Nacional de Saúde

DL<sub>50</sub>- Dose letal que mata 50% dos animais em experimentação

EDTA-Ácido Etileno Diaminotetracético

Fig.-Figura

g/ Kg-gramas por quilograma

GST-Enzima Destoxicante Glutation S-transferase

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

HULW-Hospital Universitário Lauro Wanderley

LABETOX-Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LTF- Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

ml-mililitro

n-número de animais por grupo experimental

OECD-Organisation for Economic Cooperation and Development

*O. vulgare-Origanum vulgare*

RDC-Resolução da Diretoria Colegiada

rpm- rotações por minuto

SNA- Sistema Nervoso autônomo

SNC-Sistema Nervoso Central

UFPB-Universidade Federal da Paraíba

VCM- Volume Corpuscular Médio

V.O.-Via Oral

**Observação:** As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Origanum vulgare* L. (oregano).....24
- Figura 2: Estrutura química do carvacrol e timol.....25
- Figura 3: histologia cardíaca normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%
- Figura 4: histologia renal normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%
- Figura 5: histologia pulmonar normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%
- Figura 6: histologia hepática normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%
- Figura 7: olho tratado com óleo essencial a 1%, apresentando aspecto macroscópico normal
- Figura 8: olho após 24 horas de tratamento com óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%, demonstrando hiperemia conjuntival discreta
- Figura 9: conjuntiva de olho de coelho, após 1 hora de contato com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%, com coloração vermelha fartamente distribuída
- Figura 10: corte histológico de conjuntiva bulbar em olho de coelho que recebeu óleo essencial de *Origanum vulgare* a 3%, demonstrando infiltrado inflamatório discreto

Figura 11: corte histológico de conjuntiva bulbar em olho de coelho que recebeu óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%, demonstrando ausência de infiltrado inflamatório

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a evolução ponderal dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valares representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).....54
- Gráfico 2:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o consumo de água dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valares representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).....55
- Gráfico 3:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a ingesta de ração dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valares representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).....56
- Gráfico 4:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a temperatura colônica dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valares estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).....57
- Gráfico 5:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a glicemia dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valares estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).....58
- Gráfico 6:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste do “rota rod”. A: machos. B: fêmeas. Os valares estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).....61

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1:</b> Especificações do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.....                                                                         | 35 |
| <b>Quadro 2:</b> Valores da classificação de primeira aproximação.....                                                                                      | 48 |
| <b>Quadro 3:</b> Determinação da classificação final.....                                                                                                   | 49 |
| <b>Quadro 4:</b> Resultados da avaliação da irritabilidade oftálmica aguda induzida por 1 % do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. em coelhos..... | 66 |
| <b>Quadro 5:</b> Resultados da avaliação da irritabilidade oftálmica aguda induzida por 3 % do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. em coelhos..... | 67 |
| <b>Quadro 6:</b> Resultados da avaliação da irritabilidade oftálmica aguda induzida por 9 % do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. em coelhos..... | 67 |



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Cotação das lesões oculares no teste de irritação ocular

**Tabela 2:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do campo aberto com macho

**Tabela 3:** Ganho de peso médio (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, após 14 dias de tratamento a dose de 2g/kg v.o. do óleo essencial de *Origanum vulgare*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.

**Tabela 4:** Consumo médio diário de água (em mL) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2g/kg v.o. de óleo essencial de *Origanum vulgare* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.\*\*\*p<0,001.

**TABELA 5-** Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2g/kg v.o. de óleo essencial de *Origanum vulgare* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.\*\*\*p<0,001.

**TABELA 6 –** Peso dos órgãos de camundongos Swiss albinos tratados com 2g/kg de *Origanum vulgare*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Teste “t” de Student/ Mann Whitney.

**Tabela 7:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do campo aberto com machos

**Tabela 8:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do campo aberto com fêmeas

**Tabela 9:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros bioquímicos dos machos.....62

**Tabela 10:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros bioquímicos das fêmeas.....63

**Tabela 11:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros hematológicos dos machos.....64

**Tabela 12:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros hematológicos das fêmeas.....64

**Tabela 13-** Peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* após o tratamento subcrônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Mann Whitney/ Dunn.

## SUMÁRIO

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                  | 19 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....                                       | 22 |
| 2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....                                          | 22 |
| 2.2 <i>Origanum vulgare</i> L.....                                 | 24 |
| 2.2.1 aspectos gerais.....                                         | 24 |
| 2.2.2 efeitos biológicos.....                                      | 26 |
| 2.3 avaliação da toxicidade.....                                   | 29 |
| 2.3.1 aspectos gerais.....                                         | 29 |
| 2.3.2 toxicidade ocular aguda.....                                 | 35 |
| 3 OBJETIVOS                                                        |    |
| 3.1 geral                                                          |    |
| 3.2 específicos                                                    |    |
| 4 MATERIAL                                                         |    |
| 4.1 animais                                                        |    |
| 4.2 obtenção do óleo essencial                                     |    |
| 4.3 soluções e reagentes                                           |    |
| 4.4 aparelhagem                                                    |    |
| 5 MÉTODOS                                                          |    |
| 5.1 estudo toxicológico pré clínico                                |    |
| 5.1.1 estudo toxicológico pré clínico agudo                        |    |
| 5.1.1.1 determinação da $dl_{50}$                                  |    |
| 5.1.1.2 triagem comportamental                                     |    |
| 5.1.1.3 evolução ponderal e consumo de água e ingesta de alimentos |    |
| 5.1.1.4 estudo anatomopatológico                                   |    |
| 5.1.2 estudo toxicológico pré clínico subcrônico                   |    |
| 5.1.2.1 evolução ponderal, consumo de água e ingesta de alimentos  |    |
| 5.1.2.2 temperatura colônica                                       |    |
| 5.1.2.3 glicemia caudal                                            |    |
| 5.1.2.4 teste de campo aberto                                      |    |
| 5.1.2.5 teste do “rota rod”                                        |    |
| 5.1.2.6 análise laboratorial do sangue                             |    |
| 5.1.2.7 estudo anatomopatológico subcrônico                        |    |
| 5.2 teste de irritação ocular aguda                                |    |
| 5.2.1 animais e exame preliminar                                   |    |
| 5.2.2 dose e aplicação do óleo essencial                           |    |
| 5.2.3 avaliação das reações oculares                               |    |
| 5.2.4 graduação das reações oculares                               |    |
| 5.2.5 exame histopatológico                                        |    |
| 5.3 análise estatística                                            |    |

## 6 RESULTADOS

### 6.1 estudo toxicológico pré clínico

#### 6.1.1 estudo toxicológico pre clinico agudo

##### 6.1.1.1 determinação da $dl_{50}$

##### 6.1.1.2 triagem comportamental

##### 6.1.1.3 evolução ponderal

##### 6.1.1.4 consumo de água e ingesta de alimentos

##### 6.1.1.5 estudo anatomopatológico agudo

#### 6.1.2 estudo anatomopatológico pré clínico subcrônico

##### 6.1.2.1 efeito do óleo na evolução ponderal e consumo de água e ração

##### 6.1.2.2 efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *origanum vulgare* L. na temperatura colônica

##### 6.1.2.3 efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *origanum vulgare* L. na glicemia caudal

##### 6.1.2.4 efeito do óleo essencial de *origanum vulgare* L. no teste de campo aberto

##### 6.1.2.5 efeito do óleo essencial de *origanum vulgare* L. no teste do “rota rod”

##### 6.1.2.6 efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *origanum vulgare* L. nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais

##### 6.1.2.7 estudo anatomopatológico subcrônico

### 6.2 estudo de irritabilidade oftálmica

#### 6.2.1 descrição das alterações macroscópicas

#### 6.2.2 descrição das alterações microscópicas

## 7 DISCUSSÃO

## 8 CONCLUSÕES

## 9 REFERÊNCIAS

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

A conjuntivite bacteriana aguda é uma doença comum e altamente contagiosa, causada pelo contato direto do olho com secreções infectadas (MARTÍNEZ, 2004). Acomete os seres humanos desde a antigüidade (HIRSCHBERG, 1982), sendo caracterizada por um crescimento bacteriano na superfície conjuntival que leva a processo inflamatório agudo ou crônico. A forma simples inclui conjuntivites causadas por qualquer agente bacteriano, exceto por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, que são consideradas patologias sistêmicas. O envolvimento inicialmente unilateral com acometimento do olho contralateral após 24 a 48 horas, indica causa bacteriana (SHEIKH, 2001; RIETVELD, 2003).

A Conjuntivite bacteriana simples pode ser causada por bactérias Gram positivas e Gram negativas (HWANG, 2003); pode acometer pacientes de ambos os sexos (LIMA, 1998), adultos e crianças (BURD, 1994; SCHOR, 2004), no entanto, os agentes etiológicos variam de acordo com a faixa etária. Nas crianças, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são os agentes mais comuns, seguidos pelo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catarrhalis* e enterobactérias. (GIGLIOTTI, 1981; BUZNACH, 2005; MARTÍNEZ, 2004). Nos adultos, as espécies de estafilococos são as predominantes como agentes causais, principalmente *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Casos crônicos são geralmente associados a *Staphylococcus aureus* ou espécies de *Moraxella*, principalmente, *Moraxella catarrhalis* (BROOK, 1979; SEAL, 1982; CHUNG, 2000). Raramente são causadas por outros agentes, como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, entre outros. (PERKINS, 1975)

A forma de apresentação pode variar, embora hiperemia conjuntival, quemose e presença de secreção serosa, mucosa ou mucopurulenta, estejam presentes em quase todos os casos. Outras queixas clínicas frequentes são queimação uni ou bilateral, ardência, lacrimejamento e sensação de corpo estranho ocular. Presença de papilas também são sugestivos de causa bacteriana de conjuntivite. Em casos graves, uma membrana inflamatória pode ser evidenciada. Uma pequena fotofobia pode sugerir associação com algum grau de ceratite.

Presença de crostas nas margens palpebrais e dificuldade de abrir os olhos ao amanhecer são característicos (CHUNG, 2000).

O tratamento é realizado com antibioticoterapia tópica de largo espectro, visto que, a cultura da secreção ocular, para determinação do agente causal, só está indicada nos casos rebeldes à terapêutica tradicional, ou ainda, diante de suspeita de casos agressivos (SHEIKH, HURWITZ, 2001; SEAN, 2002). No entanto, as bactérias possuem um número notável de mecanismos genéticos para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos: podem sofrer mutações cromossômicas, manifestar um gene latente de resistência cromossomal, adquirir novo material de resistência genética através da troca direta de DNA por conjugação, através de um bacteriófago (transdução), através de um plasmídeo extracromossomal de DNA, ou ainda, por aquisição de DNA, via transformação (HELLINGER, 2000). Desta forma, as pesquisas para a descoberta de novas drogas que possam manter a terapêutica de casos infecciosos eficaz, tornam-se imprescindíveis.

Neste contexto, as plantas medicinais têm recebido elevada atenção, devido à grande variabilidade de substâncias químicas presentes em sua composição, têm despertado o interesse de pesquisadores do mundo inteiro para a investigação de novos antibióticos (CUNHA, 1995; COWAN, 1999).

Dentre os vários constituintes das plantas, os óleos essenciais, vêm se destacando por apresentarem substâncias com atividades diversas, terapeuticamente e cientificamente comprovadas (SHUBINA et al., 1990), fato que tem gerado vários estudos relacionados com as propriedades farmacológicas destes compostos. Os óleos essenciais vêm sendo muito utilizados na medicina popular, sob a forma de infusatos, como antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989).

Entre as plantas cujos extratos possuem ação antimicrobiana (BURT, 2004; MARINO et al., 2001; BAYDAR et al., 2004), antifúngicas (THOMPSON, 1989), inseticida (KONSTANTOPOULOU et al., 1992), anti-helmíntica (FORCE et al., 2000) destaca-se o orégano (*Origanum vulgare*). Esta planta, mundialmente usada como um condimento pertence ao gênero *Origanum* (família Lamiaceae) e é caracterizada por uma larga diversidade morfológica e química. O óleo essencial derivado de

plantas do gênero *Origanum* possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus subtilis*) (ALLAN, 2005).

Em testes farmacológicos preliminares realizados em nosso laboratório, foi feito o exame microbiológico em secreções colhidas de saco conjuntival de pacientes portadores de conjuntivite bacteriana simples, sendo identificadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *enterobacter sp*, *proteus sp*, *acinetobacter sp* e *Klebsiella sp*. Em seguida, plantas medicinais, citadas na literatura como sendo portadoras de propriedades antimicrobianas, tiveram tal atividade testada sobre as cepas isoladas previamente. (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2009). Neste estudo, dentre todas as substâncias testadas, o óleo essencial do *Origanum vulgare* L. apresentou a melhor atividade antibacteriana (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Diante da promissora atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. sobre cepas bacterianas isoladas de pacientes com conjuntivite e aliado ao fato de não ter sido encontrado na literatura relato de estudos de toxicidade do óleo essencial, ficou evidente a importância da realização de estudos toxicológicos *in vivo* associado à avaliação da irritabilidade ocular a fim de determinar se o óleo essencial pode vir a ser utilizado no tratamento tópico de afecções oculares, visto que, dentro de uma estimativa e avaliação das propriedades tóxicas de uma substância para uso em cosméticos, perfumaria, defensivos, alvejantes e antimicrobianos a testar, a determinação das propriedades irritantes e/ou dos efeitos corrosivos sobre os olhos de mamíferos constitui uma etapa inicial importante que indicará os prováveis riscos de suscetibilidade à exposição dos olhos e conjuntivas a uma substância teste. (BRITO, 1994; ROMAY, 1996).



# Revisão da Literatura

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

É importante destacar algumas considerações referentes aos óleos essenciais, à espécie vegetal em estudo, bem como os princípios práticos e teóricos dos procedimentos de avaliação de toxicidade, em particular, o teste de irritação ocular.

### **2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS**

Óleo essencial é um termo que designa substâncias aromáticas, geralmente de odor agradável e intenso, na maioria em forma líquida. São solúveis em solventes polares, por exemplo, óleos fixos e com solubilidade limitada em água, por isso as águas aromáticas (hidrolatos) apresentam o aroma da essência. Evaporam rapidamente, quando expostos ao ar à temperatura ambiente, por isso também são chamados de óleos voláteis ou etéreos. Apresentam sabor acre (ácido) e picante; quando extraídos recentemente são incolores ou ligeiramente amarelados (poucos apresentam cor como o óleo essencial de camomila que é azul, devido ao alto teor de azulenos); portanto não são muito estáveis e alteram-se principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (BISSET, 1994).

Os óleos essenciais apresentam-se constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Os monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais, que são formados por duas e três unidades isoprênicas respectivamente, são encontrados normalmente em sementes, frutos, cascas, folhas e flores de muitas espécies vegetais, e são considerados, em muitos casos, como responsáveis pelos odores de plantas aromáticas. Estas substâncias voláteis podem atuar como elementos atrativos de agentes polinizadores, como elementos tóxicos em algumas plantas ou ainda como substâncias que servem de defesa contra insetos, devido a repelência olfativa e toxicidade direta (CHAVEZ, 1991).

Os óleos essenciais, em geral, são produtos do metabolismo secundário do vegetal, produzidos como resultado das exigências impostas pelo meio ambiente. Fatores como solo, situações climáticas, umidade e luminosidade, entre outros, limitam ou maximizam o fenótipo para produção de um composto químico pela

planta. Foi constatado que plantas cultivadas em solos secos e com baixos índices de nitrogênio, geralmente produzem maior quantidade de óleos essenciais, ao passo que aquelas cultivadas em condições de maior umidade e com bom suprimento de nitrogênio, apresentam uma maior produção de alcalóides (AMOROZO, 1989).

As plantas aromáticas e seus óleos essenciais vêm sendo muito utilizadas na medicina popular, sob a forma de infusatos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréicos (FREISE, 1935; ITOKAWA et al., 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994; COELHO-DE-SOUSA et al., 1998; MAGALHÃES et al., 1998), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), anti-hemorroidários (PEAK et al., 1993), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e no tratamento da rinite alérgica (BEZERRA, 1994).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são reconhecidas empiricamente há séculos. Muitas espécies vegetais são empregadas popularmente para o tratamento de doenças infecciosas, sendo que espécies ricas em óleos essenciais, em geral, apresentam atividade antimicrobiana, predominantemente atividade antifúngica (COSTA, 2009).

Diferentes modos de ação dos óleos essenciais compõem o mecanismo de inibição dos microorganismos. Compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais tem sido conhecido por possuir atividade antimicrobiana. Dentre as moléculas antibacterianas as mais potentes são: o carvacrol, o timol, o eugenol, o geraniol, o linalol, o terpineol e o mentol. A química dos óleos essenciais é complexa, mas geralmente os mais ativos apresentam grupamentos álcoois, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos. Essas substâncias sensibilizam a bicamada lipídica da membrana dos microorganismos, causando aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais ou danos nos sistemas enzimáticos deles (SHINGH et al., 2002).

Wash e colaboradores (2003) pesquisaram a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação de produtos fenólicos, eugenol e timol. Observou-se o extravasamento dos constituintes celulares pela membrana, e verificou-se que a saída de potássio é um sinal precoce da disfunção da membrana. Esses autores concluíram que o sítio de ação do eugenol e timol é a membrana plasmática.

Cox e colaboradores (2000) investigaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial *Melaleuca alternifolia*, que consiste principalmente de monoterpenos

cíclicos, contra *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Foram observadas diferenças na susceptibilidade entre os microorganismos testados, que foram atribuídas a variações na forma de penetração das substâncias através da membrana plasmática. A capacidade destes compostos na ruptura da permeabilidade da membrana plasmática, acompanhada pela perda do controle quimiostático, acarreta uma ação letal.

## **2.2 *Origanum vulgare* L.**

Discutiremos, a seguir, aspectos relevantes dessa espécie vegetal como sua importância econômica, química e, por fim, seus efeitos biológicos.

### **2.2.1 ASPECTOS GERAIS**

O orégano é um nome comum de plantas com aroma e sabor característicos provenientes de uma infinidade de gêneros e espécies vegetais utilizadas em todo o mundo como uma especiaria, mas normalmente se refere a espécies do gênero *Origanum*. Apesar de sua importância econômica, o gênero *Origanum* é muitas vezes referido como uma subutilização taxon, no sentido de que seus recursos genéticos, variabilidade e seu potencial de utilização, ainda não foram totalmente explorados (ARCILA-LOZANO, 2004). Isto é devido a sua complexa taxonomia e ao fato de que o conceito de um típico orégano ainda está em debate.

*Origanum vulgare* L. (Figura 1) é a espécie mais variável do gênero e é o único conhecido como orégano em maioria dos países (TUCKER; MACIARELLO, 1994). O trabalho de Ietswaart (1980), atualmente aceito como a referência taxonômica para o gênero *Origanum*, distingue seis subespécies de *Origanum vulgare* em função das alterações morfológicas características: *gracile* (Kock) *Ietswaart*, *glandulosum* (Desfontaines) *Ietswaart*, *hirtum* (Link) *Ietswaart*, *vulgare* L., *virens* (Hoffmannsegg et Link) *Ietswaart and viride* (Boissier) Hayek.

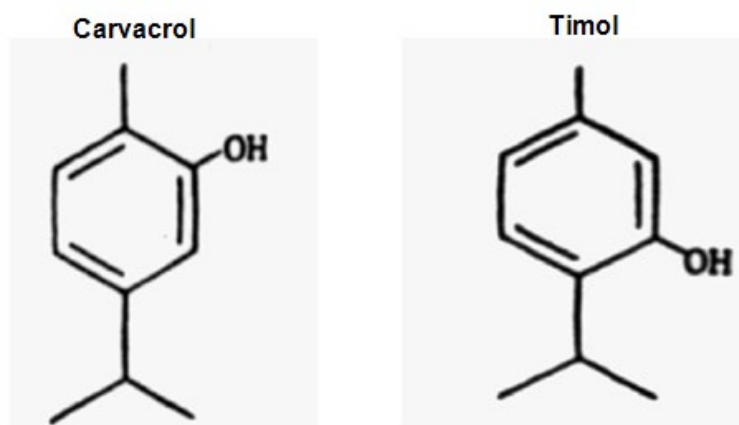
Figura 1: *Origanum vulgare* L. (oregano)



Os óleos essenciais das variedades do gênero *Origanum* variam na quantidade total produzida pela planta (variando desde traços a 8 mL / 100 g de peso seco), bem como em sua composição qualitativa. Como resultado o conteúdo total de fenóis (cristalizáveis e não cristalizáveis) de seu óleo essencial varia de traços até 95 %, mesmo entre plantas da mesma espécie (KOKKINI et al., 1989; VOKOU et al., 1993).

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L., uma das espécies com maior rendimento de óleo, é descrito por conter aproximadamente 34 compostos ativos. Os maiores constituintes do óleo essencial desta planta, os fenóis carvacrol, timol (Figura 2) (BAMPIDIS, 2005). Os altos níveis destes compostos e sua relação são de grande importância para a eficácia do produto. Entretanto, outros componentes têm provado ser de relevância significativa, visto que, a eficácia do carvacrol e do timol isolados, não atingem a eficiência biocida e antioxidante do óleo essencial (TSINAS, 1999).

Figura 2: Estrutura química do carvacrol e timol.



### 2.2.2 EFEITOS BIOLÓGICOS

Estudos têm mostrado que espécies de *Origanum* possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e enfatizam que as suas propriedades biológicas podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal (MILOS et al., 2000). As folhas secas e o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. têm sido usados na medicina por vários séculos em diferentes partes do mundo, e seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na planta e consequentemente em seus produtos derivados (PEAK et al., 1991; CERVATO et al., 2000).

Pesquisas médicas em humanos demonstraram que a administração oral diária do óleo essencial *Origanum vulgare* L., durante seis semanas, foi eficaz contra infestações entéricas de parasitos (*Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni* e *Endolimax nana*) (FORCE et al., 2000).

Além da atividade biocida, o óleo essencial de orégano apresenta uma promissora atividade antimicrobiana (SOUZA; STAMFORD, 2005). Marino e colaboradores (2001) analisando o efeito antimicrobiano de várias especiarias notaram que o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo na inibição de bactérias

gram positivas e gram negativas. Ademais, tal produto apresentou propriedades bactericidas, detectadas pela não recuperação de tais microrganismos após reincubação em meio de recuperação.

Sahin e colaboradores (2003) conduziram um estudo pra avaliar a efetividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos e observaram que o óleo essencial foi efetivo na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas, a citar *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *B. megantertium*, *Clavibacter michiganense*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

Baydar et al. (2004) analisaram a efetividade antibacteriana do óleo essencial de orégano sobre bactérias envolvidas na deterioração e/ou como agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos, e observou que na concentração de tal produto foi eficaz na inibição de todas cepas bacterianas ensaiadas. Entre tais microrganismos pode-se citar *Aeromonas hydrophilla*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *Corynebacterium xerosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeriamonocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *M. smegmatis*, *S. aureus*, *Y. enterocolítica*.

Nostro et al. (2004) evidenciaram sensibilidade de cepas de *S. aureus* e *S. epidemidis* metilicina resistentes ao óleo essencial de *Origanum vulgare* L. com concentrações inibitórias mínimas oscilando entre 0.06 e 0.125% (v/v), sendo todas as cepas ensaiadas sensíveis a tal produto. Chun et al. (2004) encontraram sensibilidade de cepas de *Helicobacter pylori* frente ao extrato aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* L.

Jugal et al. (2002) observaram uma inibição de *F. moniliforme* e *A. parasiticus* pelo óleo essencial de orégano e enfatizam que os achados científicos acerca da eficiente inibição do crescimento fúngico por produtos derivados de especiarias podem ter uma implicação social devido à possibilidade de prevenção através de medidas simples da síntese de toxinas fúngicas em produtos agrícolas contaminados. Basílico e Basílico (1999) também verificaram a eficiência antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (100 ppm) através da inibição do crescimento micelial de *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A por tal fungo.

Oliveira et al., 2004 avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. sobre cepas bacterianas

(*Staphylococcus aureus*, *S. coagulase negative*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp.) isoladas de pacientes com conjuntivite. Os resultados mostraram um destacável efeito inibitório de ambos os óleos essenciais ensaiados sobre todas as cepas bacterianas e enfatizou o uso de tais produtos como fontes de compostos antimicrobianos.

O modo de ação de fenóis contra bactérias segue o mesmo dos antibióticos clássicos, com a alteração da membrana plasmática celular bacteriana, aumento da permeabilidade, resultando em desequilíbrio aquoso e morte celular. Entretanto, em contraste aos antibióticos clássicos, não há evidências de resistência bacteriana ao óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (INGRAM, 1997).

De forma geral, os mecanismos de resistência bacteriana podem surgir de duas maneiras: mutação cromossômica (que não podem ser transferidas a outras bactérias) ou aquisição de plasmídios (que podem transferir resistência rapidamente) (BALCÁZAR et al., 2006). Portanto, como o efeito inibitório de *Origanum vulgare* L. não é através da transferência de nenhum cromossomo, não há risco de aumento na oposição da bactéria substâncias importantes como penicilinas e estreptomicina (TSINAS, 1999).

O estudo da atividade antioxidante do *Origanum vulgare* L. e de seus diferentes extratos e óleo essencial têm despertado a atenção da comunidade científica. Constituintes químicos com atividade antioxidante presentes nas plantas, determinam seu considerável papel na preservação de várias doenças degenerativas, como câncer e doença de Alzheimer (HU et al., 2002). Isto porque acredita-se que estas substâncias funcionem em oposição aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são geradas durante o metabolismo celular. Estes fitoquímicos, devido a seu anel fenólico e substituintes hidroxila, podem funcionar como antioxidantes fenólicos oriundos de uma dieta rica em tais compostos, podem neutralizar os radicais livres nocivos e então inibir suas reações oxidativas com moléculas biológicas vitais, prevenindo o desenvolvimento de muitas condições fisiológicas, as quais podem se manifestar em doenças (VATTEM et al., 2005).

Entre os principais constituintes presentes nas plantas, que participam no sistema de defesa da célula contra radicais livres, estão os compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenóides (SZETO et al., 2002). Capecka e colaboradores (2005) compararam a atividade antioxidante de algumas plantas após a colheita e



secagem. A atividade antioxidante do orégano expressa através da inibição da peroxidação do ácido linoléico e estabilização de radical livre (2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH) não sofreu significativo decréscimo após secagem da planta. Atribui-se tal efeito principalmente a riqueza desta planta em ácido rosmarinico, um composto que possui quatro grupos hidroxila em sua molécula e, por esta razão, possui alto potencial de estabilização de radicais livres.

## **2.2 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE**

### **2.3.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS**

A toxicidade de uma substância é a capacidade que esta tem em causar algum desequilíbrio ao organismo com o qual entra em contato, ou seja, refere-se ao potencial de um toxicante em produzir o efeito tóxico (BARROS; DAVINO, 2003). A importância de avaliar tal propriedade reside no fato de que toda e qualquer substância química pode vir a ser tóxica, dependendo de vários fatores, como dose, frequência, e duração da exposição, condições fisiológicas e/ou patológicas do organismo exposto.

Todos os produtos derivados de plantas usados como drogas devem ser avaliados para segurança e eficácia por métodos idênticos àqueles usados para novos compostos sintéticos. Esta prática inclui avaliação pré-clínica de segurança e eficácia, estudos controlados de fase clínica (placebo – controlados, randomizados, duplo – cegos, estatisticamente validados) com consentimento dos participantes da pesquisa e a exigência de que tais estudos sejam conduzidos de acordo com regulamentações federais (TALALAY; TALALAY, 2001).

Um tema bastante importante na toxicologia é a busca por modelos *in vitro* e *in vivo* que sejam preditivos dos efeitos adversos em humanos expostos a substâncias químicas. A condução dos estudos toxicológicos em animais de laboratório deve ser baseada na suposição de que a escolha dos modelos animais e do modelo dos estudos é realmente capaz de prever os riscos para a saúde humana e a identificação de qualquer falha nesta predição levaria a uma revisão dos regulamentos existentes, estimulando a busca por novos métodos de avaliação toxicológica (OLSON *et al.*, 2000).

Testes *in vitro* são considerados métodos alternativos para avaliações toxicológicas, já que existe uma grande preocupação ética em relação ao uso de animais de laboratório (MARIZ, 2007). Os ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* foram validados e são empregados como uma importante ferramenta para reduzir o número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica. Estes testes são considerados preditivos de toxicidade humana por basearem-se no conceito de que as funções celulares basais suportam as funções específicas dos órgãos. Porém, dados como o efeito dos metabólitos das drogas investigadas não podem ser obtidos neste tipo de estudo (VALADARES, 2006).

Olson *et al.* (2000), mostraram que houve taxa de concordância positiva entre a toxicidade humana e espécies roedoras e não roedoras de 71%, com os não roedores sozinhos sendo preditivos para 63% de toxicidade humana e os roedores sozinhos por 43%. A mais alta incidência da concordância total foi vista na toxicidade humana ocorrida nos sistemas hematológico, gastrointestinal e cardiovascular. Os pesquisadores concluíram então, que os resultados desta investigação suportam o valor dos estudos toxicológicos *in vivo* como preditivos para muitas toxicidades humanas significantes associadas com medicamentos.

No Brasil, a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, determina que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (Toxicologia pré-clínica e Toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (Farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde-CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004.

Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de Toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para Registro e renovação de registro de fitoterápicos. De acordo com este guia, deverão ser realizados ensaios para avaliação de Toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas), ensaios para avaliação de Toxicidade de doses repetidas (avalia a toxicidade

após a exposição a doses repetidas) e estudos sobre Genotoxicidade (devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos).

As etapas do estudo toxicológico pré-clínico são sequenciais e estão altamente bem definidas. Podem apresentar pequenas variações de acordo com as exigências legais de cada país e, até mesmo, conforme a obra de referência consultada; todavia, existe um consenso sobre tópicos descritos a seguir (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; LU, 1991; LARINI, 1993; PAUMGARTTEN, 1993; BRITO, 1994; BARROS; DAVINO, 2003; CORRÊA; ALONZO; TREVISAN, 2003; PAPARELLA; FASSOLD, 2004).

- Informações preliminares: antes de preceder qualquer experimento com um organismo, deve-se conhecer a substância a ser avaliada em aspectos como, por exemplo, estrutura e composição química, propriedades físico-químicas, aspectos toxicocinéticos, fontes e níveis de exposição e distribuição no ambiente, entre outros.

- Teste *in vitro*: são conhecidos como métodos alternativos para avaliação toxicológica. Esses testes surgiram basicamente em função da crescente preocupação ética com a utilização de animais em experimentação biológica. Podem ser citados: a cultura de tecido ocular de bovino para teste em cosmetologia, bem como teste em membrana carioalantóica (ANDERSEN et al., 2004).

- Teste *in vivo*: apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação toxicológica, os melhores resultados em termos de preditibilidade de efeitos humanos ainda são os obtidos em animais classicamente empregados em experimentação. As espécies mais empregadas são os roedores (95 %). Entre estes ratos e camundongos (90 %), cobaias (2 %), hamsters (2 %) e outros (1 %) (NETTO, 2006).

Entretanto, antes mesmo da definição da espécie animal a ser utilizada, é preciso estar atualizado sobre preceitos éticos do uso de animais de laboratório. A relevância desse tema tem crescido nas últimas décadas em função do grande número de animais empregados em experimentos diversos e das frequentes situações de sofrimento às quais eles são expostos. Segundo recente levantamento, o uso de animais em experimentação se dá, principalmente, para desenvolvimento e/ou registro de produtos bioativos (40 a 50 %), mas também, para ensaio (25 %) e diagnóstico (menos de 5 %) (CAZARIN et al., 2003).

### 2.3.2 TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR

Entre os protocolos de testes toxicológicos *in vivo* encontra-se o teste de irritação/corroção ocular aguda. O objetivo deste teste é conhecer os efeitos de um produto químico na superfície ocular de coelhos e prever o que ocorreria caso o produto entrasse em contato com os olhos humanos. O teste de irritação ocular padronizado como referência é o teste ocular de Draize (DRAIZE et al., 1944; DRAIZE et al., 1994).

Desde sua publicação, o teste de irritação ocular utilizado nos dias de hoje passou por adaptações, mas é baseado naquele teste originalmente desenvolvido por Draize. Dentre as principais adaptações feitas no teste original, estão as publicadas pela OECD, através do protocolo para teste de irritação ocular, publicado inicialmente em 1981 e posteriormente em 1987 e 2002, onde a graduação das alterações oculares excluía a área de opacidade na córnea e a secreção nas conjuntivas. A eliminação da quantificação da área da córnea envolvida deve-se ao fato de uma vez que o produto é considerado irritante, independente da área de opacidade na córnea. A secreção ocular é um parâmetro não específico e difícil de ser quantificado, pois não necessariamente determina efeito irritante. A superfície ocular é colonizada por microbiota bacteriana que contribui com a modulação de sua defesa, associada a fatores humorais próprios da sua superfície, inibindo o aparecimento de microorganismos patogênicos. (SOUZA *et al*, 1999)

O método de Draize foi desenvolvido para investigar os efeitos irritantes e corrosivos de produtos que podem entrar em contato com o olho, antes que o mesmo fosse comercializado. A finalidade da avaliação é fornecer informações a respeito do risco quando o produto for exposto por via ocular e precauções de manuseio. O método utiliza uma escala numérica para graduar a severidade da irritação ocular dos coelhos. Os valores individuais são somados e totalizados em um escore final que representa o grau da lesão ocular (DRAIZE et al., 1994; OECD, 2002).

Embora o método tenha passado por adaptações e seja questionável quanto à sua reprodutibilidade e relevância, uso e interpretação dos escores, seu custo monetário e ético, o teste de Draize ainda é o único teste aceito pelas agências governamentais regulatórias para identificar os efeitos nos olhos e a classificação de uma nova substância (COLLOR, 2007). Estudos mostram que ainda não há uma alternativa *in vitro* que possa ser usada como completa substituição ao teste de Draize (HUHTALA, 2003). O Principal fator que limita o uso dos testes *in vitro* é que

geralmente eles são desenvolvidos para conhecer as alterações em uma ou poucas estruturas oculares, normalmente a córnea, enquanto através do teste de Draize podemos conhecer o potencial do produto para causar lesões no olho inteiro.

Enquanto nenhum método alternativo ainda foi validado ou aceito, a redução do número de animais e a utilização de alternativas para minimizar dor, estresse e desconforto aos animais têm sido uma estratégia adotada pelo OECD e incluída no protocolo do Teste de Irritação/ corrosão ocular (OECD, 2002) para identificar os efeitos perigosos e a classificação de uma nova substância.

Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Realizar ensaios toxicológicos *in vivo* com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar estudo toxicológico pré-clínico, agudo e subcrônico, em roedores orientados pelas normas vigentes em nosso país (RE 90/2004) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por obras de referência e ainda por padronização prévia realizada no Biotério do LTF-UFPB (LARINI, 1997; MELO-DINIZ, 2000; BARROS; DAVINO, 2003; BRASIL, 2004; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001);
- Realizar ensaio toxicológico com avaliação da irritação ocular aguda – dose simples;
- Contribuir com o estudo das conjuntivites;
- Contribuir com o estudo do *Origanum vulgare* L.

*Material*

---



### 3 MATERIAL

#### 3.1 LOCAL DA PESQUISA

As atividades de pesquisa pré-clínica foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e Biotério Prof. Dr. Thomas George do Núcleo de Pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Outras atividades foram realizadas nos laboratórios de análises clínicas e patologia clínica do hospital universitário Lauro Wanderley (HULW) da UFPB.

#### 3.2 ANIMAIS

##### A) Camundongos Albinos Suíços (*Mus musculus*)

Para os ensaios toxicológicos agudos, foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 20-40 gramas.

##### B) Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)

Para os ensaios toxicológicos subcrônicos, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 260-300 gramas.

##### C) Coelhos Albinos Neozelandeses (*Oryctolagus cuniculus*)

Para avaliação oftalmológica, foram utilizados coelhos albinos neozelandeses pesando entre 2-3 quilos.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do LTF/UFPB. No biotério, estes animais foram alojados em gaiolas de polietileno contendo 5 camundongos, 5 ratos ou 1 coelho cada, mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12

horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas, com taxa de umidade relativa do ar entre 30% e 70%, tendo livre acesso à alimentação (tipo pellets, ração Purina®) e água “*ad libitum*”. Antes da realização dos protocolos experimentais, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal decorrentes da mudança de ambiente, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação.

### 3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L.

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Quadro 1), o objeto de nosso estudo, foi obtido comercialmente pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) (lote:210).

Imediatamente antes da realização dos testes, óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foi solubilizado em tween 80 (uma gota por mL de solução) e dissolvida em solução salina 0,9% de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

**Quadro 1:** Especificações do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

| Especificações                  |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Aparência                       | Líquido Límpido                    |
| Cor                             | Amarelo Esverdeado a Marrom Escuro |
| Impurezas                       | Isento                             |
| Odor                            | Característico                     |
| Densidade (20°C)                | 0,940 – 0,960                      |
| Índice de Refração (20°C)       | 1,500 – 1,520                      |
| Rotação Ótica                   | [-2° ; +3°]                        |
| Principais Componentes (aprox.) | Carvacrol = 70%                    |

Fonte: <http://www.ferquima.com.br/pdf/OREGANO%20OE.pdf>

### 3.4 SOLUÇÕES E REAGENTES

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes soluções e reagentes:

- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
- Ácido úrico (*kit* reagente Labtest®)
- Álcool etílico (95 %)
- Albumina (*kit* reagente Labtest®)
- Álcool etílico diluído (46°)
- Amilase (*kit* reagente Labtest®)
- Colesterol total (*kit* reagente Labtest®)
- Creatinina (*kit* reagente Labtest®)
- Formol (10 %)
- Fosfatase alcalina (*kit* reagente Labtest®)
- Glicose (*kit* reagente Labtest®)
- Hematoxilina-Eosina
- Parafina
- Proteínas totais (*kit* reagente Labtest®)
- Transaminases (*kit* reagente Labtest®)
- Triglicerídeos (*kit* reagente Labtest®)
- Tween 80 (polioxetileno sorbitano monoleato) (Sigma)
- Uréia (*kit* reagente Labtest®)
- Vaselina
- Xilol

### 3.5 APARELHAGEM

Durante a realização dos experimentos, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus® – Roche Diagnostic System) - para determinações bioquímicas no soro;

- Analisador de íons seletivos (Iselab<sup>®</sup>) - para determinações dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio;
- Analisador hematológico celular automático (Cobas Argos 50<sup>®</sup> – Roche Diagnostic System) - para obtenção de hemograma e contagem de plaquetas.
- Aparelho de “rota rod<sup>®</sup> (Hugo Basile, modelo 7750, Itália) - para avaliação da capacidade motora dos animais;
- Aparelho de Campo Aberto (fabricado no LTF/UFPB) – para avaliação da atividade exploratória dos animais;
- Balança analítica AID<sup>®</sup> - HR – 120 g – Japão;
- Balança eletrônica BG – 8000 GEHAKA<sup>®</sup>;
- Centrífuga (BIO ENG<sup>®</sup> BE 4000) - para separação do soro;
- Densitrômetro (BTS - 235<sup>®</sup> Biosystems) - para eletroforese de proteínas, realizadas em fitas de acetato de celulose;
- Glicosímetro (ADVANTAGE<sup>®</sup> Boehringer Mannheim) – para monitorar glicemia com fitas reativas;
- Lanterna de uso oftalmológico (HEINE<sup>®</sup>);
- Microscópico Olympus<sup>®</sup> - para confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas;
- Microscópio (RML5<sup>®</sup> Askmania-Germany) - utilizado nas análises histopatológicas;
- Oftalmoscópio binocular indireto (BIO WELCH ALLYN<sup>®</sup>);
- Sistema automático (Hematel 200<sup>®</sup>) – para contagem das células sanguíneas;
- Termômetro digital (modelo MC – 3 BC<sup>®</sup>, OMRON/China) – para avaliação da temperatura colônica dos animais.

### **3.6 COLÍRIOS**

- colírio de fluoresceína 1% - fabricante: Allergan
- colírio anestésico: cloridrato de proximetacaina 0,5% (anestalcon<sup>®</sup>) – fabricante: Alcon

*Métodos*

---

## 4 MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas duas formas diferentes de abordagens: a primeira consistiu na avaliação da toxicidade pré-clínica aguda e subcrônica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em camundongos e ratos, respectivamente. A segunda forma de abordagem avaliou a irritação ocular aguda em coelhos, nos quais, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foi aplicado dentro da bolsa conjuntival. Todos os protocolos deste estudo foram realizados seguindo as normas de cuidados com animais, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB.

### 4.1 ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO

Os protocolos experimentais para avaliação da toxicidade foram orientados pelas normas vigentes em nosso país (RE 90/2004) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por obras de referência e ainda por padronização prévia realizada no Biotério do LTF-UFPB (LARINI, 1997; MELO-DINIZ, 2000; BARROS; DAVINO, 2003; BRASIL, 2004; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001)

#### 4.1.1 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

Para a realização da avaliação toxicológica pré clínica aguda, camundongos (6 machos e 6 fêmeas, submetidos a jejum de 6 horas antes do experimento, foram tratados com 2 g/Kg do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. por via oral (gavagem), e um grupo controle tratado com veículo (solução salina 0,9% e tween 80).

##### 4.1.1.1 Determinação da DL<sub>50</sub>

A determinação da DL<sub>50</sub> possibilita investigar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias, para estabelecer a dose responsável pela morte de 50% dos animais em estudo (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

Após o tratamento, os camundongos foram observados por um período de 4 horas. Em seguida, os animais receberam água e comida, sendo observados a cada 12 horas por um período de até 7 dias para o registro de possíveis mortes.

#### 4.1.1.2 Triagem farmacológica comportamental

Para investigar se o tratamento agudo com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. induz o surgimento de sinais tóxicos gerais foi utilizado o protocolo para triagem comportamental proposto por Almeida et al. (1999). Esta metodologia tem por objetivo avaliar o comportamento dos animais após a administração de produtos naturais. Estes comportamentos são normalmente exibidos pelos animais, de forma que qualquer alteração no padrão de comportamento após a administração da preparação pode ser sugestiva de alteração no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (ALMEIDA et al. 1999). Segue descrição metodológica de alguns dos comportamentos exibidos:

- **Catatonía:** Exprime uma contração intensa na musculatura esquelética. Este comportamento é observado quando as patas anteriores do animal são colocadas em uma barra horizontal e este permanece na mesma posição por alguns minutos.

- **Analgesia:** Representa uma redução do reflexo à dor. É percebido através da reação do animal ao aperto do terço inferior de sua cauda com uma pinça.

- **Resposta ao toque diminuída:** Estalar os dedos ou friccionar uma caneta sobre as barras metálicas são dois dos principais recursos utilizados para auxiliar na avaliação deste estágio de depressão do animal.

- **Perda do reflexo corneal:** Em caso de produtos com atividade analgésica, o animal não apresenta o reflexo corneal ao se tocar com um cotonete de algodão ou papel na córnea do animal.

- **Tônus muscular:** Avalia-se colocando o animal em um bastão interligando duas superfícies. A perda da condição de sustentação/equilíbrio no bastão é indicativo da diminuição do tônus muscular.

- **Força para agarrar:** É medida ao tentar puxar pela cauda, em sentido contrário à sua movimentação, um animal cujas patas foram colocadas na grade de arame de uma gaiola. Essa é forma de sentir a resistência do animal em não caminhar.

Após o tratamento com o óleo essencial, foi realizada a observação de parâmetros comportamentais nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez por dia, sempre no mesmo horário, por volta de 8 horas da manhã, nos 13 dias seguintes.

#### 4.1.1.3 Evolução ponderal e consumo de água e ingesta de alimentos

Os animais foram pesados tanto no primeiro dia, para administração das doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., quanto nos demais dias do período de observação. Para construção de curva de evolução ponderal, foram utilizadas as médias diárias dos pesos dos animais de cada grupo referido anteriormente (cf. 4.1.1.2).

O consumo de água foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento (dia zero) disponibilizando-se mamadeiras graduadas e registrando-se, no dia posterior, o volume ingerido pelos animais. A ingesta de alimentos (ração na forma de *pellets*) também foi avaliada a partir do primeiro dia após o tratamento, pesando-se a ração disponibilizada diariamente para os animais e contabilizando-se, no dia seguinte, o peso consumido de ração.

#### 4.1.1.4 Estudo anatomopatológico

Após a morte e autopsia dos animais no décimo quinto dia após o tratamento como referido anteriormente (cf. 4.1.1.5), os camundongos do grupo controle e do grupo tratado com a maior dose do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foram submetidos a exame anatomopatológico. As vísceras foram retiradas e examinadas macroscopicamente, com ressecção e pesagem consecutiva de pulmão (submetido à perfusão, via traquéia, com formalina – solução de formol a 10%), coração, fígado e rins (seccionados por incisão sagital). As secções teciduais dos órgãos excisados



fixados em formalina (formol a 10%) tamponada, após 24 horas, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (MICHALANY, 1998). Em micrótomo, os fragmentos tissulares serão seccionados em espessura de 3,0  $\mu\text{m}$  com subsequentemente coloração por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson e examinados ao microscópio óptico.

#### **4.1.2 Estudo toxicológico pré-clínico subcrônico**

No ensaio subcrônico, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foi administrado diariamente, em diferentes doses a vários grupos de animais por um período de 28 dias.

Ratos Wistar machos e fêmeas foram selecionados e distribuídos em quatro grupos, sendo 3 grupos de animais tratados com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e um grupo controle. O grupo controle foi tratado com veículo (solução salina 0,9% e tween 80). Aos 3 grupos de animais tratados foram administrados por via oral (gavagem) 3 diferentes doses (uma para cada grupo) do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. diariamente durante 28 dias. As doses utilizadas foram: 1, 3 e 9%.

Os efeitos da administração prolongada do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foram avaliados sobre parâmetros como: evolução ponderal, consumo de água, ingesta de alimento, temperatura, glicemia, atividade exploratória (teste no aparelho de campo aberto), atividade motora (teste no aparelho de rota-rod), parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos e ainda foram realizados exames histopatológicos de órgãos de ratos tratados com a maior dose durante o estudo.

##### **4.1.2.1 Evolução ponderal, consumo de água e ingesta de alimentos**

Esses parâmetros foram avaliados conforme já descrito para o tratamento agudo (cf. 4.1.1.3). Os animais foram pesados todos os dias, a partir do primeiro dia, para administração das doses do óleo essencial e nos demais dias do período de

observação. O consumo de água e ingesta de ração foram avaliados diariamente a partir do segundo dia de tratamento.

#### **4.1.2.2 Temperatura colônica**

A temperatura corporal foi medida com auxílio de um termômetro digital (modelo MC – 3 BC®, OMRON), lubrificado com vaselina a fim de ser introduzido, cerca de 5 cm, pelo reto até atingir o cólon do animal. Esse procedimento foi realizado semanalmente em todos os animais durante o período de tratamento.

#### **4.1.2.3 Glicemia caudal**

Os ratos, sob jejum prévio de 12 horas, foram imobilizados em contêisores plásticos e uma gota de sangue, coletada da veia caudal mediante corte, foi coletada em fita reativa para dosagem de glicose e leitura realizada em monitor de glicemia (Advantage-Boehringer Mannheim). A determinação da glicemia era feita em todos os animais semanalmente na semana em que não se media a temperatura.

#### **4.1.2.4 Teste do Campo Aberto**

Esse teste foi realizado para avaliação de alterações comportamentais mediante o uso do aparelho de campo aberto proposto por CARLINI et al., (1986). Avaliou-se a atividade exploratória dos animais mediante sua movimentação espontânea (ambulação), registrada pelo número de vezes que cruza, com as quatro patas, as divisões do campo e também o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), de levantar (*rearing*) e o número de bolos fecais como índice de emocionalidade. Essas avaliações se deram quinzenalmente, sendo que todos os animais participantes desse teste foram avaliados em um mesmo dia. Cada animal foi observado durante 3 minutos, sendo que o experimento se iniciava sempre uma hora após os animais receberem a dose do óleo essencial (MANSUR; MARTZ; URLINI, 1971).

#### **4.1.2.5 Teste do “rota rod”**

O aparelho de “rota rod” (Hugo Basile, modelo 7750) constitui-se de uma barra giratória com 2,5 cm de diâmetro, dividida por cinco discos em quatro segmentos de 20 cm, e localizada a 40 cm de altura em relação a pequenas pranchas que desativavam automaticamente um contador digital de tempo com a queda dos animais da barra. O modelo utilizado possui dispositivos para ajuste de velocidade da barra giratória em rotações por minuto (RPM) e para contabilizar, de forma automática, o tempo de permanência dos animais na mesma.

O teste de rota rod é uma metodologia utilizada na triagem de drogas com possível atividade neurotóxica/mio-relaxante e consiste em avaliar a coordenação motora do animal, através do tempo de permanência na barra giratória (CAPASSO et al., 1996).

Esse teste foi realizado quinzenalmente, uma hora após a administração do óleo essencial, com animais controle e tratados que foram expostos ao aparelho para a observação dos parâmetros acima descritos.

#### **4.1.2.6 Análise laboratorial do sangue**

Após os 28 dias de tratamento, foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial (sob 12 horas de jejum) dos grupos tratados com o óleo essencial (nas doses de 1, 3 e 9%) e do grupo controle. Os procedimentos de coleta e análise laboratorial do sangue foram os mesmos utilizados durante o estudo toxicológico agudo (cf. 4.1.1.5).

#### **4.1.2.7 Estudo anatomopatológico**

Ao final do tratamento subcrônico, os animais tratados com a maior dose do óleo essencial (9%) foram sacrificados por tração cervical e tiveram suas vísceras coletadas para realização do estudo anatomopatológico de modo semelhante ao relatado no estudo agudo (cf. 4.1.1.4).

## 4.2 ESTUDO DE IRRITABILIDADE OFTÁLMICA

A metodologia utilizada para avaliar o efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o olho, foi baseado no trabalho desenvolvido por Draize e colaboradores (1944), com algumas modificações baseadas no protocolo para teste de irritação ocular da OECD (Organisation for Economic Coopeation and Development), 2002.

### 4.2.1 Animais e exame preliminar

O coelho albino é o modelo mais comumente utilizado em estudos de irritação ocular devido à ausência de pigmentos na mucosa ocular e por apresentar uma ampla e acessível área ocular, permitindo assim que os efeitos resultantes sejam facilmente observados.

Os animais foram selecionados dentre uma população de coelhos saudáveis, e cerca de 24 horas antes da realização do teste, os olhos dos animais foram cuidadosamente examinados com uma lanterna de uso oftalmológico para verificar a presença de alguma lesão. Os animais que apresentaram quaisquer sinais de irritação dos olhos ou lesão preexistente de córnea não foram utilizados no estudo.

### 4.2.2 Dose e aplicação do óleo essencial

As doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. utilizados no teste foram: 1, 3 e 9%. Com auxílio de uma seringa aplicou-se 0,1 mL do produto, em dose única, diretamente no saco conjuntival de um dos olhos do animal, após levantar delicadamente a pálpebra inferior do globo ocular. Seguindo a aplicação, as pálpebras foram mantidas unidas por alguns segundos para evitar a perda doproduto. O olho contralateral, não tratado, foi utilizado como controle.

#### 4.2.3 Avaliações das reações oculares

Foram analisados os efeitos causados pela aplicação do óleo essencial de *Origanum vulgare* nas concentrações de 1, 3 e 9%, na região da córnea, íris e conjuntiva. Essas reações foram observadas ao completar 1, 24, 48, 72 e 168 horas após aplicação do produto. A OECD, recomenda que diante da presença de alterações oculares no sétimo dia de observação, os coelhos devem ser reavaliados ao completar 14 e 21 dias, a fim de obter dados sobre a evolução e reversibilidade das lesões. Como tal fato não ocorreu, todos os animais foram eutanasiados no sétimo dia. As avaliações foram realizadas com o auxílio de um oftalmoscópio binocular indireto e uso de colírio de fluoresceína. O corante fluoresceína é uma substância inócua e bastante eficaz no diagnóstico de alterações na superfície da córnea que não podem ser vistas ao olho nu (PUY et al., 1998). Todos os exames foram realizados pelo mesmo observador.

#### 4.2.4 Graduação das reações oculares

As alterações na córnea, íris e conjuntivas foram graduadas de acordo com a escala de graduação das reações oculares de Draize (Tabela1) .

Tabela 1: cotação das lesões oculares no teste de irritação ocular

| <b>Córnea – opacidade – grau de densidade</b>                                                     |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| LESÃO                                                                                             | VALOR |
| Sem lesão nem opacidade                                                                           | 0     |
| Zonas de opacidade dispersas, detalhes da íris notadamente visíveis                               | 1     |
| Zona translúcida facilmente discernível, detalhes da íris notadamente visíveis                    | 2     |
| Zonas nacaradas, detalhes da íris completamente invisíveis, dimensão da pupila apenas discernível | 3     |
| Córnea opaca, íris não discernível através da opacidade                                           | 4     |
| <b>Iris – irite – resposta inflamatória generalizada</b>                                          |       |
| LESÃO                                                                                             | VALOR |
| Normal                                                                                            | 0     |

|                                                                                                                                          |              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Dobras mais profundas, congestão, tumefação, hiperemia pericorneana moderada ou conjuntivas injetadas. A íris continua a responder à luz | 1            |
| Ausência de reação à luz, hemorragia, destruição marcante do tecido                                                                      | 2            |
| <b>Conjuntivas - hiperemia</b>                                                                                                           |              |
| <b>LESÃO</b>                                                                                                                             | <b>VALOR</b> |
| Coloração normal                                                                                                                         | 0            |
| Hiperemia de certos vasos (olhos injetados)                                                                                              | 1            |
| Coloração púrpura difusa, vasos sanguíneos individuais dificilmente discerníveis                                                         | 2            |
| Coloração vermelha fartamente distribuída                                                                                                | 3            |
| quemose                                                                                                                                  | 4            |

Basendo-se na cotação de lesões oculares acima detalhadas, os dados foram agrupados para posterior análise. (tabela 2)

Tabela 2: Tabela para registro das lesões oculares evidenciadas nos coelhos albinos incluídos no estudo

| Coelho (número) | Partes     | Alterações     | Tempo de observação (horas) |    |    |    |     |
|-----------------|------------|----------------|-----------------------------|----|----|----|-----|
|                 |            |                | 1                           | 24 | 48 | 72 | 168 |
| 1               | Íris       | Inflamação     |                             |    |    |    |     |
|                 | Córnea     | Opacidade      |                             |    |    |    |     |
|                 | conjuntiva | Rubor<br>Edema |                             |    |    |    |     |
| 2               | Íris       | Inflamação     |                             |    |    |    |     |
|                 | Córnea     | Opacidade      |                             |    |    |    |     |
|                 | Conjuntiva | Rubor<br>Edema |                             |    |    |    |     |
| 3               | Íris       | Inflamação     |                             |    |    |    |     |
|                 | Córnea     | Opacidade      |                             |    |    |    |     |
|                 | Conjuntiva | Rubor<br>Edema |                             |    |    |    |     |

O total diário para cada uma das partes analisadas foi obtido da seguinte maneira:

**Córnea:** (somatório dos valores de opacidade dos coelhos 1...3) + (somatório dos valores de área dos coelhos 1...3) x 5

**Íris:** (somatório dos valores de inflamação dos coelhos 1...3) x 5

**Conjuntivas:** (somatório dos valores rubor e edema dos coelhos 1...3) x 2

A média diária (MD) foi obtida somando-se os valores obtidos para córnea, íris e conjuntivas para cada tempo de leitura, 1 h (MQ<sub>1</sub>), 24 h (MQ<sub>2</sub>), 48 h (MQ<sub>3</sub>), 72 h (MQ<sub>4</sub>) e 7 dias (MQ<sub>7</sub>) e dividindo-se o valor assim calculado pelo número de coelhos utilizados no ensaio. De acordo com o valor obtido, as substâncias podem ser classificadas, na primeira aproximação, em uma das oito categorias listadas no quadro 2. Para tanto, devem ser tomadas as MD dos quatro primeiros dias do ensaio e o maior valor entre os quatro é escolhido. Este valor é a média máxima (MM), a partir desta se determina a classificação de primeira aproximação quadro 2.

**Quadro 2:** Valores da classificação de primeira aproximação

| Média Máxima (MM) | Classificação de primeira aproximação    |
|-------------------|------------------------------------------|
| 0,0               | (N) não irritante                        |
| <2,5              | (PN) praticamente não irritante          |
| 2,5 – 15,0        | (M <sub>1</sub> ) irritante mínimo       |
| 15,1 – 25,0       | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
| 25,1 – 50,0       | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
| 50,1 – 80,0       | (S) severamente irritante                |
| 80,1 – 100,0      | (E) extremamente irritante               |
| 100,1 – 110,0     | (Mx) irritante máximo                    |

A classificação final corrige a classificação de primeira aproximação e leva em consideração a duração e a intensidade da reação observada. Para tanto, além das médias diárias dos quatro primeiros dias do ensaio (MQ<sub>1</sub> a MQ<sub>4</sub>), deve ser consideradas aquelas obtidas no sétimo dia (MQ<sub>7</sub>) e os valores totais individuais (VTI) do sétimo dia. Se o valor de MQ<sub>7</sub> for diferente do obtido na classificação de primeira aproximação, deve ser feita a classificação final de acordo com o quadro X.

**Quadro 3:** Determinação da classificação final

| Classificação de 1ª aproximação          | Casos | Condição             | Classificação Final                      |
|------------------------------------------|-------|----------------------|------------------------------------------|
| (N) não irritante                        | 1     | Até MQ2 = 0          | (PN) praticamente não irritante          |
|                                          | 2     | Até MQ3 = 0          | (M <sub>1</sub> ) irritante mínimo       |
|                                          | 3     | Até MQ4 = 0          | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
|                                          | 4     | MQ7<20;VTI<10*       | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 5     | 20<MQ7<40;VTI<30*    | (S) severamente irritante                |
|                                          | 6     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (M <sub>1</sub> ) irritante mínimo       | 1     | Até MQ2 = 0          | (M <sub>1</sub> ) irritante mínimo       |
|                                          | 2     | Até MQ3 = 0          | (M <sub>1</sub> ) irritante mínimo       |
|                                          | 3     | Até MQ4 = 0          | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
|                                          | 4     | MQ7<20;VTI<10*       | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 5     | 20<MQ7<40;VTI<30*    | (S) severamente irritante                |
|                                          | 6     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante | 1     | Até MQ2 = 0          | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
|                                          | 2     | Até MQ3 = 0          | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
|                                          | 3     | Até MQ4 = 0          | (M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante |
|                                          | 4     | MQ7<20;VTI<10*       | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 5     | 20<MQ7<40;VTI<30*    | (S) severamente irritante                |
|                                          | 6     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  | 1     | Até MQ2 = 0          | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 2     | Até MQ3 = 0          | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 3     | Até MQ4 = 0          | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 4     | MQ7<20;VTI<10*       | (M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado  |
|                                          | 5     | 20<MQ7<40;VTI<30*    | (S) severamente irritante                |
|                                          | 6     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (S) severamente irritante                | 1     | Até MQ2 = 0          | (S) severamente irritante                |
|                                          | 2     | Até MQ3 = 0          | (S) severamente irritante                |
|                                          | 3     | Até MQ4 = 0          | (S) severamente irritante                |
|                                          | 4     | MQ7<20;VTI<10*       | (S) severamente irritante                |
|                                          | 5     | 20<MQ7<40;VTI<30*    | (S) severamente irritante                |
|                                          | 6     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (E) extremamente irritante               | 7     | 40<MQ7<80;30<VTI<60* | (E) extremamente irritante               |
| (Mx) irritante máximo                    | 8     | MQ7<80*;VTI<60*      | (E) extremamente irritante               |
|                                          | 9     | MQ7<80*;VTI>60*      | (Mx) irritante máximo                    |

#### 4.2.5 Exame histopatológico

As estruturas examinadas foram córnea, íris e conjuntiva do olho tratado e controle. Quando presente o processo inflamatório foi classificado com discreto, moderado e acentuado de acordo com a quantidade de células de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) presentes. O processo inflamatório foi considerado



discreto quando poucas células foram visualizadas; moderado quando uma quantidade aumentada de células era facilmente visível, e acentuado, quando havia excessiva quantidade de células inflamatórias, envolvendo uma extensa área.

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados numéricos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram determinadas através da Análise de Variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Dunnett, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. As análises foram feitas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 4 (GraphPad Software Inc., EUA).

*Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO

#### 5.1.1 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

##### 5.1.1.1 Determinação da DL<sub>50</sub>

A toxicidade oral aguda do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. foi investigada em camundongos albinos suíços machos e fêmeas. Todas as seis fêmeas e seis machos tratados com 2 g/Kg do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. por via oral (gavagem) sobreviveram, sem exibir alterações dignas de registro, até o final do período de observação (7 dias), sugerindo que o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. pertence à classe de agentes xenobióticos, de baixa toxicidade.

##### 5.1.1.2 Triagem comportamental

Não foram observadas alterações comportamentais nos camundongos tratados com óleo essencial de *Origanum vulgare* na dose de 2g/kg, após administração ou durante os 14 dias de observação.

##### 5.1.1.3 Evolução ponderal

Não houve qualquer alteração na evolução ponderal de camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato na dose de 2g/kg v.o. em comparação aos seus respectivos grupos controle. Os resultados são vistos na Tabela 3

**TABELA 3** – Ganho de peso médio (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, após 14 dias de tratamento a dose de 2g/kg v.o. do óleo essencial de *Origanum vulgare*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.

| GRUPOS          |                 |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Machos          |                 | Fêmeas          |                 |
| Controle        | Tratado         | Controle        | Tratado         |
| 7,29 $\pm$ 1,44 | 5,23 $\pm$ 0,74 | 2,03 $\pm$ 0,68 | 2,11 $\pm$ 0,85 |

#### 5.1.1.4 Consumo de água e ingesta de alimentos

As fêmeas que receberam o óleo essencial apresentaram ingesta de água semelhante a do grupo controle, enquanto que os machos tratados tiveram sua ingesta de água reduzida em relação a seu controle. Os resultados são apresentados na Tabela 4

**TABELA 4** - Consumo médio diário de água (em mL) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2g/kg v.o. de óleo essencial de *Origanum vulgare* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

| GRUPOS           |                    |                 |                 |
|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Machos           |                    | Fêmeas          |                 |
| Controle         | Tratado            | Controle        | Tratado         |
| 10,28 $\pm$ 0,43 | 7,84 $\pm$ 0,41*** | 8,01 $\pm$ 0,25 | 8,11 $\pm$ 0,15 |

Os machos tratados com o óleo essencial apresentaram consumo de alimentos semelhante ao do grupo controle, enquanto que as fêmeas tratadas aumentaram significativamente seu consumo de ração em comparação a seu controle. Os resultados são apresentados na Tabela 5

**TABELA 5**- Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2g/kg v.o. de óleo essencial de *Origanum vulgare* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

| GRUPOS          |                 |                 |                    |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Machos          |                 | Fêmeas          |                    |
| Controle        | Tratado         | Controle        | Tratado            |
| 6,73 $\pm$ 0,11 | 6,91 $\pm$ 0,19 | 5,21 $\pm$ 0,14 | 6,27 $\pm$ 0,20*** |

#### 5.1.1.5 Estudo anatomopatológico agudo

O exame macroscópico dos órgãos vitais: coração, pulmão, fígado e rins dos animais do estudo, não apresentou alterações macroscópicas. Nenhuma diferença foi constatada entre o peso dos órgãos dos animais tratados e dos animais dos grupos controle. Tabela 6

A análise histológica dos órgãos revelou que os mesmos encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade.

**TABELA 6** – Peso dos órgãos de camundongos Swiss albinos tratados com 2g/kg de *Origanum vulgare*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Teste “t” de Student/ Mann Whitney.

| ÓRGÃOS         | GRUPOS          |                 |                 |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                | Machos          |                 | Fêmeas          |                 |
|                | Controle        | Tratado         | Controle        | Tratado         |
| <b>Coração</b> | 0,18 $\pm$ 0,01 | 0,17 $\pm$ 0,01 | 0,16 $\pm$ 0,00 | 0,18 $\pm$ 0,01 |
| <b>Fígado</b>  | 1,78 $\pm$ 0,18 | 1,74 $\pm$ 0,11 | 1,78 $\pm$ 0,12 | 1,89 $\pm$ 0,21 |
| <b>Rins</b>    | 0,57 $\pm$ 0,03 | 0,77 $\pm$ 0,11 | 0,49 $\pm$ 0,01 | 0,45 $\pm$ 0,03 |

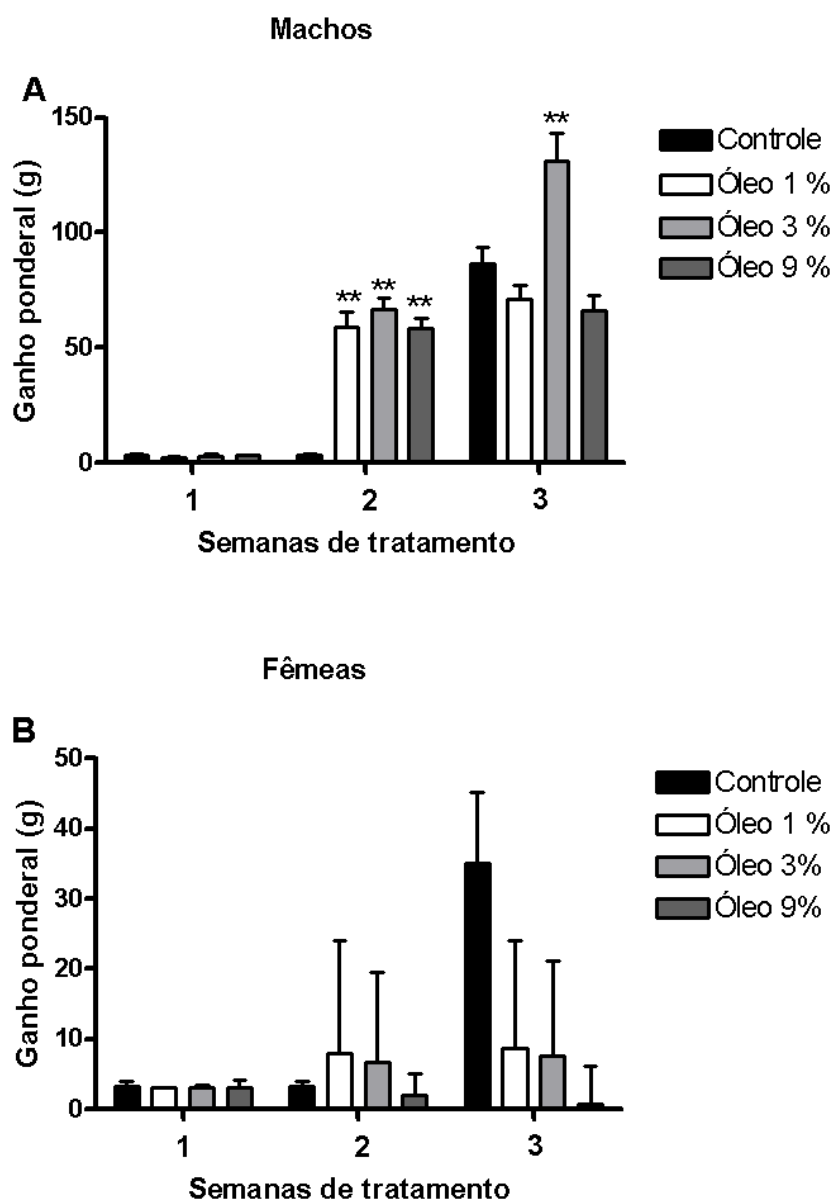
### 5.1.2 Estudo toxicológico pré-clínico subcrônico

Os resultados demonstrados a seguir referem-se à administração do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. nas doses de 1, 3 e 9 %, que foram administradas diariamente durante 28 dias, por via oral (gavagem), em ratos de ambos os sexos.

#### 5.1.2.1 Efeito do óleo na evolução ponderal e consumo de água e ração

A avaliação dos resultados (Gráfico 1B) mostrou que o tratamento subcrônico das fêmeas com o óleo essencial não induziu variação significativa de peso, quando comparado com o grupo controle. Nos machos ocorreu um ganho significativo de peso (Gráfico 1A) na 2ª semana do tratamento em todas as doses avaliadas. Na 3ª semana de tratamento foi evidenciado um aumento significativo de peso para os machos tratados com 3 % do óleo (Gráfico 1A).

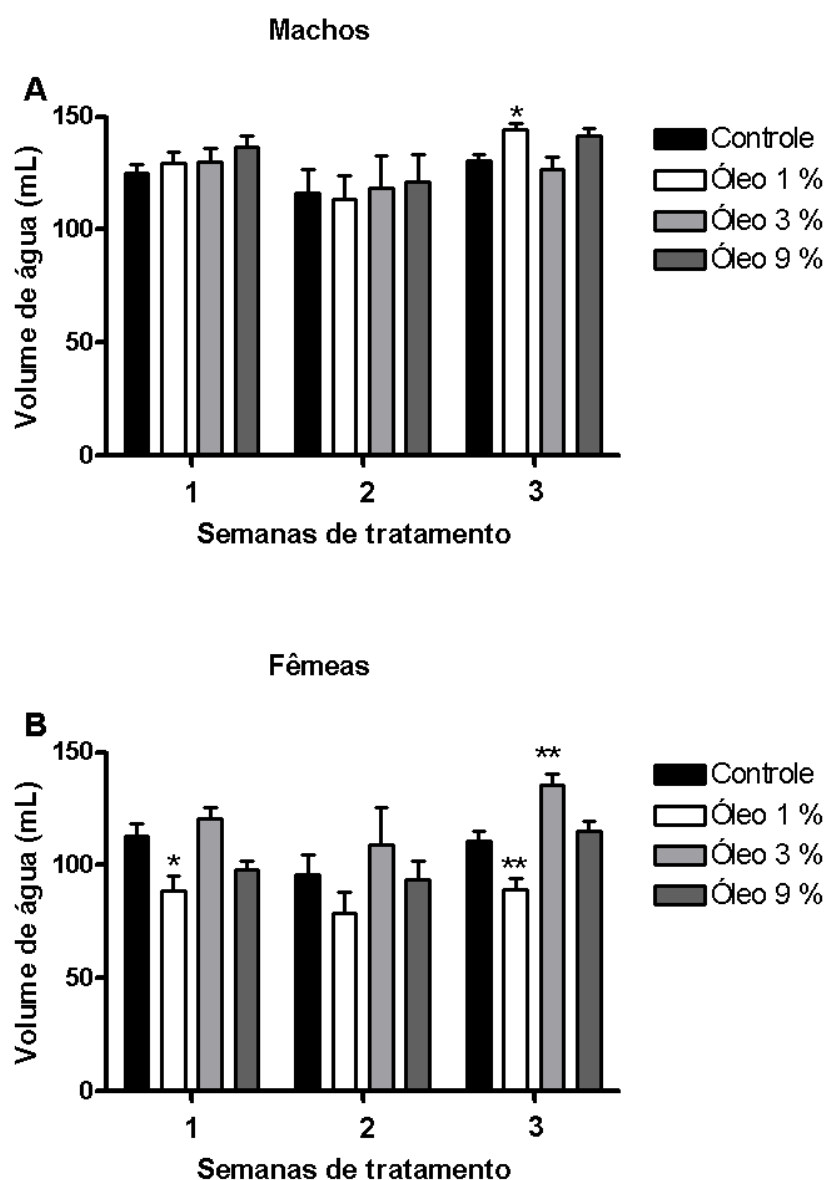
**Gráfico 1:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a evolução ponderal dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).



Referindo-se ao consumo de água, os resultados mostrados no gráfico 2, revelaram que a administração prolongada do óleo essencial provocou alterações significativas no consumo de água de machos e fêmeas. Os machos demonstraram aumento no consumo de água na 3ª semana de tratamento com a dose de 1 % do óleo essencial (Gráfico 2A). As fêmeas demonstraram diminuição no consumo de água na 1ª semana de tratamento com a dose de 1 %. Enquanto que as fêmeas na

3ª semana de tratamento diminuíram o consumo de água quando tratadas com 1 % e aumentaram o consumo de água quando tratadas com 3 % (Gráfico 2B).

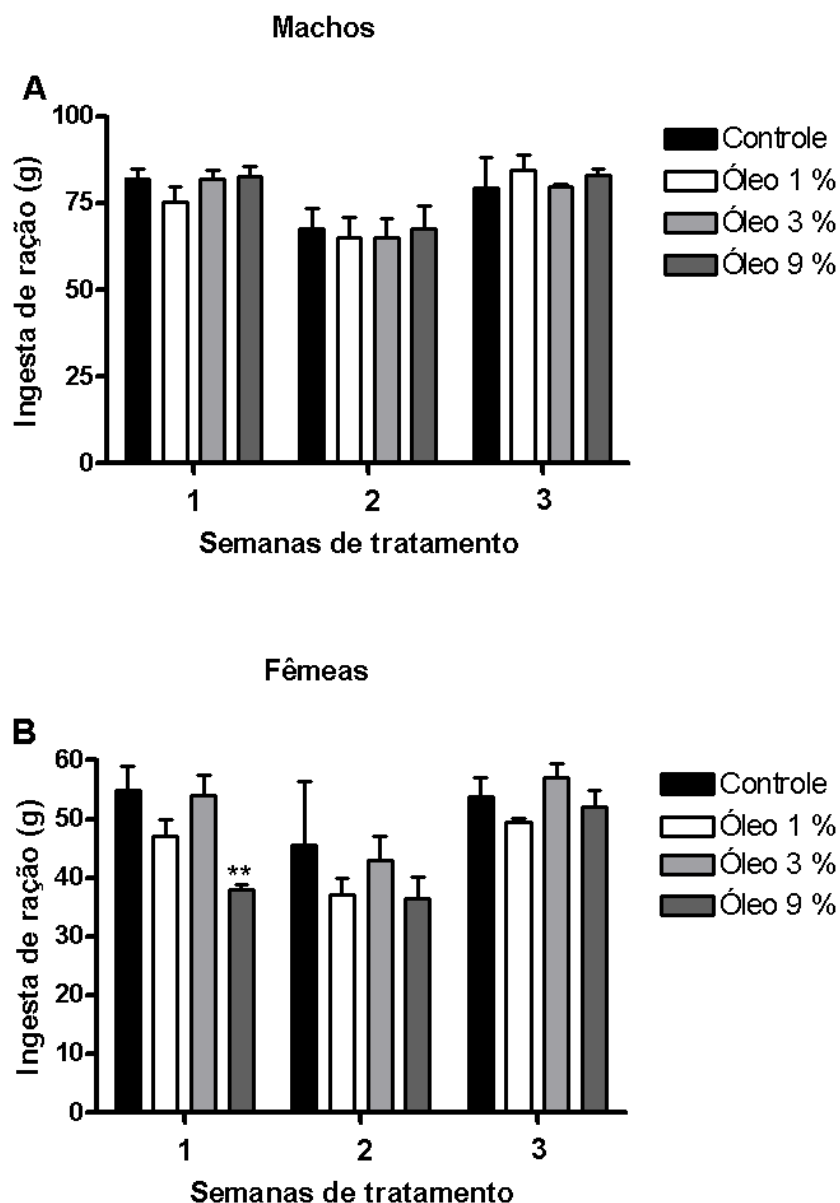
**Gráfico 2:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o consumo de água dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).



Referindo-se a ingesta de ração, Os resultados mostrados no gráfico 3A, demonstra que o tratamento com o óleo essencial não interferiu na ingesta de ração dos machos ao longo das 3 semanas. As fêmeas tratadas com o 1 % óleo essencial

exibiram diminuição na ingesta de ração na 1ª semana de tratamento, quando comparado ou controle, não sendo observada alterações na 2ª e 3ª semanas de tratamento, como mostra o gráfico 3B.

**Gráfico 3:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a ingesta de ração dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*\*p<0,01 vs Controle (ANOVA seguindo Dunnett's).

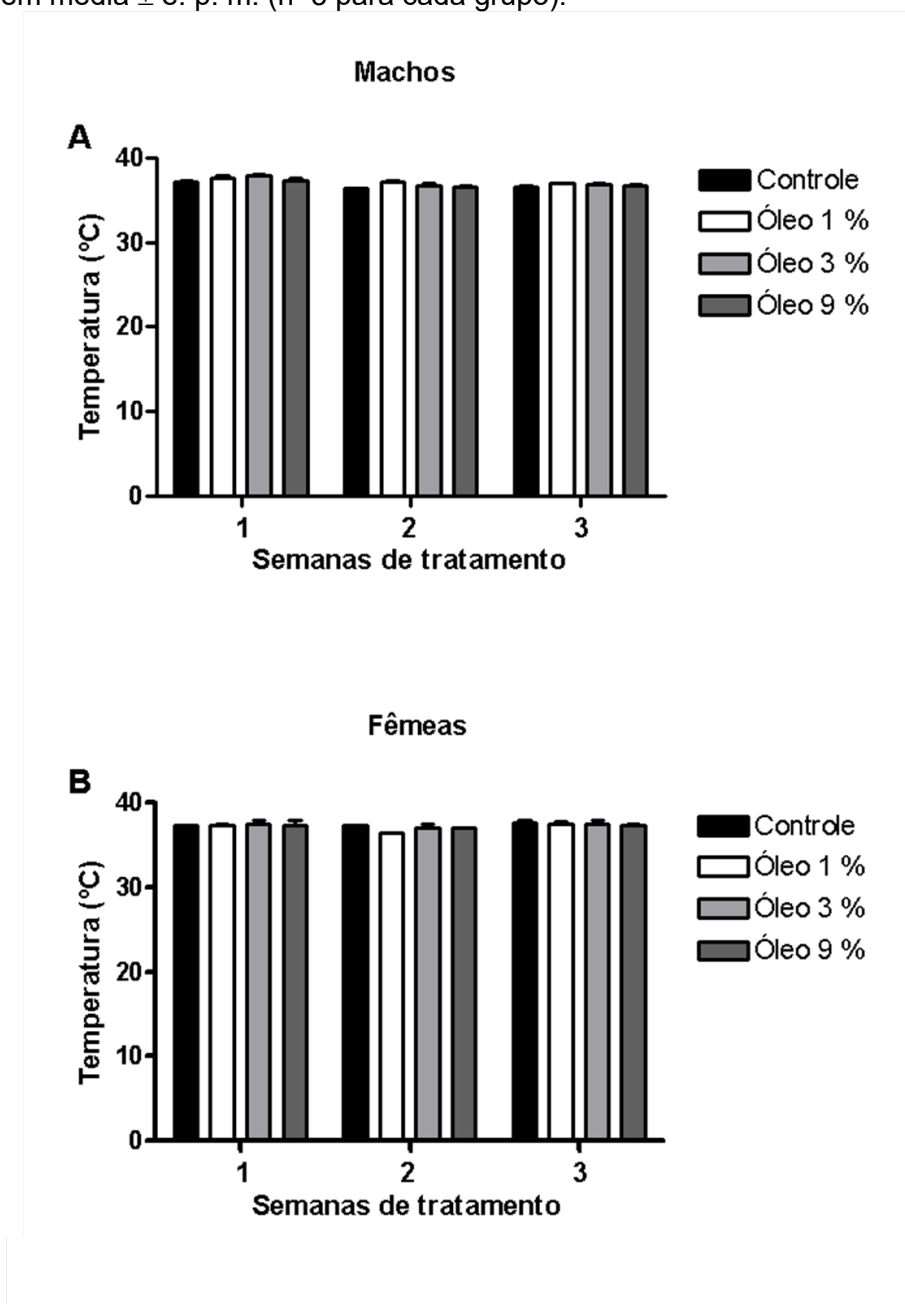


#### 5.1.2.2 Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. na temperatura colônica



Quanto à temperatura colônica, não foram observadas alterações em ambos os sexos durante a administração subcrônica das três doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Gráfico 4).

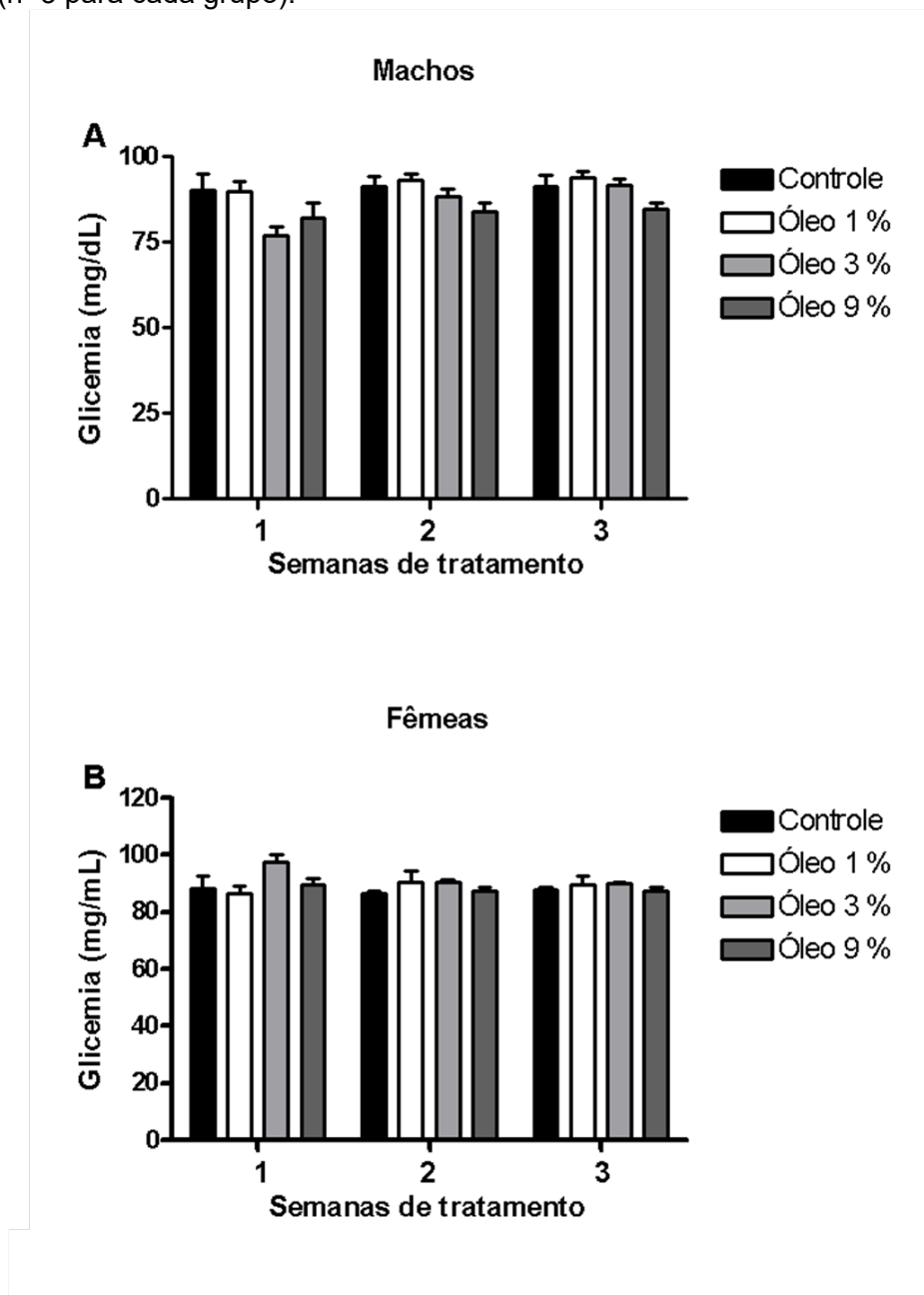
**Gráfico 4:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a temperatura colônica dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).



#### 5.1.2.3 Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. na glicemia caudal

Conforme ilustrado no gráfico 5, não foram observadas alterações da glicemia dos animais de ambos os sexos durante o tratamento subcrônico com as três doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., em relação ao controle.

**Gráfico 5:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a glicemia dos animais. A: machos. B: fêmeas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).



#### 5.1.2.4 Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste de campo aberto (*Open Field*)

A tabela 7 mostra que o tratamento subcrônico com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. na dose de 9 % induziu um aumento significativo, em relação ao controle, no comportamento de levantar ou *rearing* (1ª semana de tratamento) e na ambulação (2ª e 3ª semana de tratamento) dos machos. Com a dose de 3 % apenas a defecação, nos machos, mostrou-se alterada de forma significativa (1ª semana de tratamento).

Tabela 7: : Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do campo aberto com machos.

| Grupo                   | Parâmetros do campo aberto |             |           |              |
|-------------------------|----------------------------|-------------|-----------|--------------|
|                         | Ambulação                  | Levantar    | Limpeza   | Defecação    |
| 1ª Semana de tratamento |                            |             |           |              |
| Controle                | 20,3 ± 2,9                 | 7,7 ± 1,2   | 0,3 ± 0,3 | 4,3 ± 0,9    |
| Óleo 1 %                | 19,3 ± 0,3                 | 6,0 ± 0,6   | 1,7 ± 1,2 | 6,3 ± 0,9    |
| Óleo 3 %                | 23,3 ± 11,0                | 5,0 ± 1,2   | 2,0 ± 0,6 | 17,3 ± 2,2** |
| Óleo 9 %                | 47,3 ± 12,6                | 17,3 ± 2,2* | 1,3 ± 0,9 | 0,0 ± 0,0    |
| 2ª Semana de tratamento |                            |             |           |              |
| Controle                | 7,7 ± 3,7                  | 4,0 ± 1,2   | 1,0 ± 0,0 | 2,0 ± 1,0    |
| Óleo 1 %                | 20,0 ± 8,5                 | 3,7 ± 2,0   | 0,3 ± 0,3 | 4,3 ± 1,5    |
| Óleo 3 %                | 14,7 ± 2,9                 | 4,3 ± 2,9   | 2,7 ± 0,9 | 2,3 ± 1,3    |
| Óleo 9 %                | 35,7 ± 0,3**               | 1,7 ± 0,7   | 0,7 ± 0,3 | 0,0 ± 0,0    |
| 3ª Semana de tratamento |                            |             |           |              |
| Controle                | 9,0 ± 6,7                  | 4,0 ± 2,1   | 1,0 ± 0,6 | 2,0 ± 2,0    |
| Óleo 1 %                | 20,0 ± 9,1                 | 3,7 ± 2,0   | 0,3 ± 0,3 | 4,3 ± 2,6    |
| Óleo 3 %                | 14,7 ± 5,4                 | 4,3 ± 2,9   | 2,7 ± 0,9 | 2,3 ± 1,9    |
| Óleo 9 %                | 35,7 ± 1,2*                | 1,7 ± 0,9   | 0,7 ± 0,7 | 0,0 ± 0,0    |

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=3 para cada grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)

No experimento realizado nas fêmeas, em todos os parâmetros observados, a única alteração estatisticamente significativa em relação ao controle foi uma redução no comportamento de limpeza ou *grooming* (2ª semana de tratamento) nas doses de 1 % e 9 % do óleo conforme apresentado na tabela 8. Não foram observadas alterações nos demais parâmetros avaliados (tabela 8).

Tabela 8: Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do campo aberto com fêmeas.

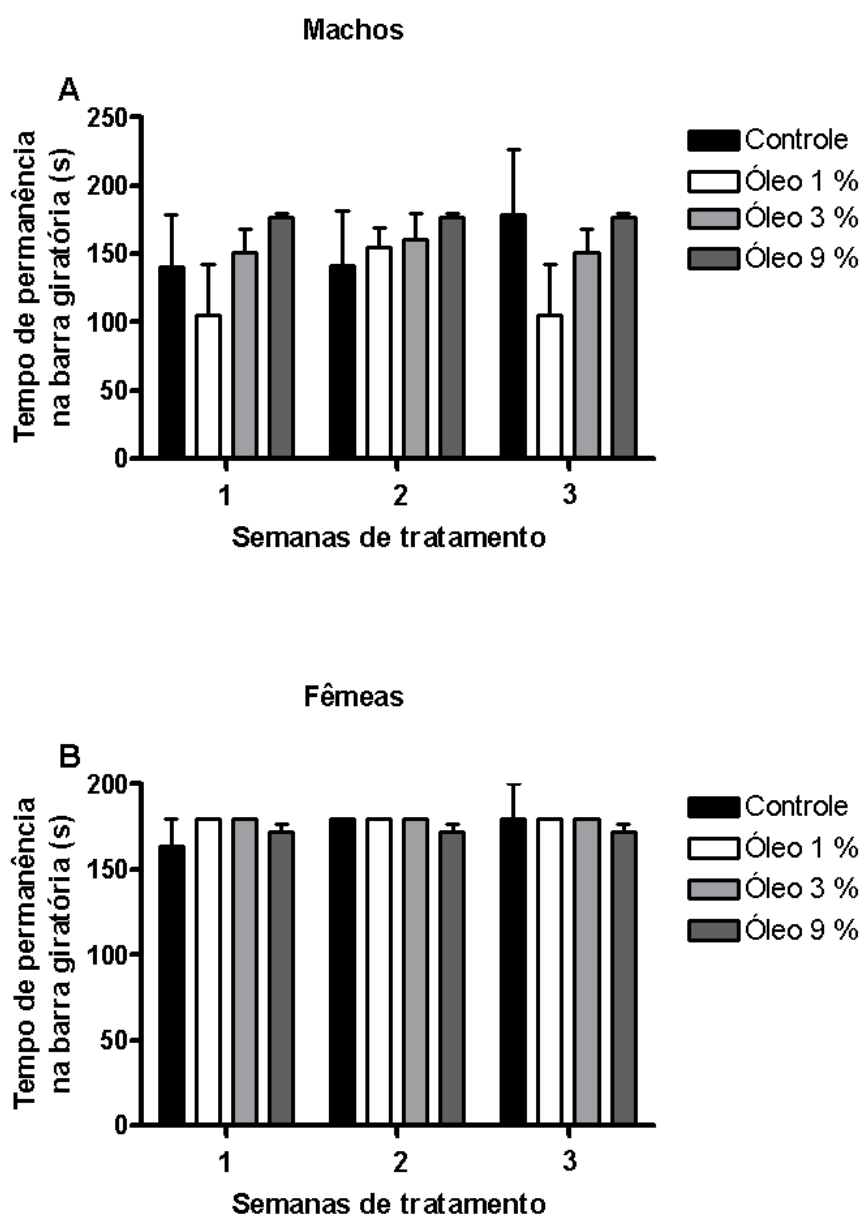
| Grupo                   | Parâmetros do campo aberto |            |            |           |
|-------------------------|----------------------------|------------|------------|-----------|
|                         | Ambulação                  | Levantar   | Limpeza    | Defecação |
| 1ª Semana de tratamento |                            |            |            |           |
| Controle                | 25,3 ± 5,4                 | 12,0 ± 3,8 | 0,3 ± 0,3  | 4,0 ± 1,5 |
| Óleo 1 %                | 38,0 ± 11,1                | 17,0 ± 2,7 | 0,0 ± 0,0  | 4,0 ± 1,7 |
| Óleo 3 %                | 26,3 ± 5,4                 | 15,3 ± 5,8 | 2,3 ± 0,9  | 1,3 ± 0,9 |
| Óleo 9 %                | 47,3 ± 12,6                | 17,3 ± 2,2 | 1,3 ± 0,9  | 0,0 ± 0,0 |
| 2ª Semana de tratamento |                            |            |            |           |
| Controle                | 13,7 ± 1,9                 | 7,7 ± 3,8  | 3,7 ± 1,5  | 5,0 ± 2,1 |
| Óleo 1 %                | 7,0 ± 4,0                  | 1,7 ± 0,3  | 0,3 ± 0,3* | 2,7 ± 0,9 |
| Óleo 3 %                | 8,7 ± 1,9                  | 13,0 ± 1,0 | 2,3 ± 0,3  | 6,0 ± 0,0 |
| Óleo 9 %                | 4,3 ± 0,3                  | 3,0 ± 0,6  | 0,0 ± 0,0* | 2,3 ± 0,3 |
| 3ª Semana de tratamento |                            |            |            |           |
| Controle                | 13,7 ± 3,5                 | 7,7 ± 4,3  | 3,7 ± 1,9  | 5,0 ± 1,6 |
| Óleo 1 %                | 7,0 ± 3,1                  | 1,7 ± 0,7  | 0,3 ± 0,3  | 2,7 ± 0,9 |
| Óleo 3 %                | 8,7 ± 2,6                  | 13,0 ± 2,0 | 2,3 ± 0,9  | 6,0 ± 1,2 |
| Óleo 9 %                | 4,3 ± 1,3                  | 3,0 ± 1,2  | 0,0 ± 0,0  | 2,3 ± 0,7 |

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=3 para cada grupo).\*p<0,05 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)

### 5.1.2.5 Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no teste do “rota rod”

De acordo com o gráfico 6, os animais de ambos os sexos tratados com as três doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. não apresentaram perda da coordenação motora.

**Gráfico 6:** Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste do “rota rod”. A: machos. B: fêmeas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=3 para cada grupo).



### 5.1.2.6 Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais

Após vinte e oito dias de tratamento com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. nas doses de 1, 3 e 9% v.o. (gavagem), alguns parâmetros bioquímicos analisados demonstraram alterações estatisticamente significativas em ambos os sexos. Nos machos tratados com o óleo essencial, houve alterações nos níveis de amilase,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , proteínas totais e globulina (Tabela 9), enquanto que nas fêmeas tratadas, houve alterações nos níveis de glicose e albumina (Tabela 10).

Tabela 9: Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros bioquímicos dos machos.

| Parâmetro                 | Controle      | Óleo 1 %      | Óleo 3 %      | Óleo 9 %      |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Glicose (mg/dL)           | 108,0 ± 6,7   | 113,0 ± 16,1  | 118,60 ± 4,8  | 116,0 ± 14,0  |
| Uréia (mg/dL)             | 41 ± 2,0      | 42,3 ± 3,2    | 48,4 ± 4,2    | 45,0 ± 1,7    |
| Ácido Úrico (mg/dL)       | 0,8 ± 0,1     | 0,7 ± 0,1     | 0,82 ± 0,1    | 0,7 ± 0,1     |
| Creatinina (mg/dL)        | 0,4 ± 0,03    | 0,4 ± 0,04    | 0,38 ± 0,04   | 0,4 ± 0,03    |
| Colesterol (mg/dL)        | 48,7 ± 2,4    | 55,0 ± 3,7    | 73,4 ± 12,4   | 62,3 ± 2,8    |
| Triglicerídeos (mg/dL)    | 101,3 ± 18,8  | 127,8 ± 14,6  | 120,2 ± 11,3  | 94,0 ± 1,2    |
| Proteína total (g/dL)     | 6,5 ± 0,5     | 73 ± 0,05     | 7,4 ± 0,08*   | 6,8 ± 0,1     |
| Albumina (g/dL)           | 2,9 ± 0,3     | 3,1 ± 0,03    | 3,08 ± 0,07   | 2,7 ± 0,1     |
| Globulina (g/dL)          | 3,6 ± 0,2     | 4,2 ± 0,04**  | 4,30 ± 0,05** | 4,1 ± 0,03**  |
| AST (UI/L)                | 517,7 ± 201,1 | 378,0 ± 156,9 | 296,4 ± 93,1  | 416,0 ± 100,1 |
| ALT (UI/L)                | 125,7 ± 18,5  | 113,5 ± 26,9  | 100,2 ± 13,6  | 111,0 ± 19,9  |
| Amilase (UI/L)            | 564,7 ± 66,5  | 974,3 ± 30,2* | 706,2 ± 109,6 | 815,7 ± 60,7  |
| Fosfatase Alcalina (UI/L) | 129,7 ± 18,8  | 200,8 ± 11,6  | 160,0 ± 48,5  | 120,0 ± 5,8   |
| $\text{Ca}^{2+}$          | 10,7 ± 0,4    | 9,3 ± 0,2*    | 10,1 ± 0,3    | 11,6 ± 0,4    |
| $\text{Mg}^{2+}$          | 2,2 ± 0,1     | 3,2 ± 0,1**   | 3,0 ± 0,10**  | 2,4 ± 0,2     |

Os valores estão expressos em média ± e. p. m. (n=3 controle, n=4 óleos 1 %, n=5 óleo 3 % e n= 3 óleo 9 %). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)

Tabela 10: Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros bioquímicos das fêmeas.

| Parâmetro                 | Controle      | Óleo 1 %     | Óleo 3 %     | Óleo 9 % |
|---------------------------|---------------|--------------|--------------|----------|
| Glicose (mg/dL)           | 122,7 ± 11,4  | 88,5 ± 7,5*  | 101,3 ± 2,5  | 94       |
| Uréia (mg/dL)             | 49,3 ± 2,4    | 49,5 ± 13,5  | 51,5 ± 7,3   | 35       |
| Ácido Úrico (mg/dL)       | 0,8 ± 0,2     | 1,7 ± 0,7    | 0,6 ± 0,1    | 0,7      |
| Creatinina (mg/dL)        | 0,4 ± 0,03    | 0,4 ± 0,1    | 0,3 ± 0,05   | 0,3      |
| Colesterol (mg/dL)        | 59,7 ± 4,5    | 85,0 ± 14,0  | 82,3 ± 5,9   | 75       |
| Triglicerídeos (mg/dL)    | 98,7 ± 18,9   | 116,0 ± 21,0 | 131,5 ± 12,3 | 157      |
| Proteína total (g/dL)     | 7,2 ± 0,2     | 7,9 ± 0,6    | 7,8 ± 0,3    | 7,2      |
| Albumina (g/dL)           | 3,1 ± 0,1     | 3,3 ± 0,1    | 3,5 ± 0,05*  | 3,4      |
| Globulina (g/dL)          | 4,1 ± 0,1     | 4,6 ± 0,5    | 3,8 ± 0,1    | 3,8      |
| AST (UI/L)                | 303,3 ± 88,9  | 357,0 ± 83,0 | 184,8 ± 21,5 | 179      |
| ALT (UI/L)                | 103,3 ± 7,7   | 134,0 ± 19,0 | 82,8 ± 7,1   | 62       |
| Amilase (UI/L)            | 770,3 ± 132,9 | 592,0 ± 55,0 | 638,8 ± 68,7 | 455      |
| Fosfatase Alcalina (UI/L) | 161,7 ± 14,3  | 144,0 ± 47,0 | 93,3 ± 19,9  | 65       |
| Ca <sup>2+</sup>          | 9,3 ± 0,2     | 10,0 ± 0,05  | 10,4 ± 0,5   | 9,9      |
| Mg <sup>2+</sup>          | 3,0 ± 0,2     | 2,4 ± 0,6    | 2,9 ± 0,2    | 3,2      |

Os valores estão expressos em média ± e. p. m. (n=3 controle, n=2 óleos 1 %, n=4 óleo 3 % e n= 1 óleo 9 %). \*p<0,05 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)

As tabelas 11 e 12 representam as alterações hematológicas produzidas pelo tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em machos e fêmeas, respectivamente. Inicialmente, percebe-se um aumento do número de hemácias e valores de hemoglobina e hematócrito de machos tratados com 1 e 3 % do óleo, em comparação ao grupo controle. Enquanto que, nas fêmeas tratadas com 1 e 3 %, houve uma diminuição no número de hemácias. A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) foi aumentada em fêmeas tratadas com as três doses do estudo.

No leucograma, observou-se um aumento significativamente diferente do grupo controle, na contagem de plaquetas de machos tratados com 1 e 3 % do óleo.

Tabela 11: Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros hematológicos dos machos.

| Parâmetro                         | Controle         | Óleo 1 %               | Óleo 3 %                | Óleo 9 % |
|-----------------------------------|------------------|------------------------|-------------------------|----------|
| Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )   | $6,1 \pm 0,14$   | $8,2 \pm 0,26^{**}$    | $8,7 \pm 0,27^{**}$     | 8,7      |
| Hemoglobina (g/dL)                | $11,9 \pm 0,05$  | $15,6 \pm 0,48^{**}$   | $16,2 \pm 0,21^{**}$    | 15,9     |
| Hematócrito (%)                   | $29,0 \pm 0,80$  | $37,6 \pm 2,00^*$      | $39,1 \pm 1,09^{**}$    | 37,9     |
| VCM (fL)                          | $47,5 \pm 0,50$  | $46,0 \pm 1,52$        | $45,0 \pm 0,60$         | 43,0     |
| HCM (pg)                          | $19,6 \pm 0,35$  | $19,0 \pm 0,12$        | $18,5 \pm 0,47$         | 18,2     |
| CHCM (g/dL)                       | $41,2 \pm 0,90$  | $41,7 \pm 1,03$        | $40,9 \pm 0,44$         | 41,8     |
| Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ ) | $1,5 \pm 0,05$   | $4,3 \pm 0,43$         | $6,2 \pm 1,80$          | 7,9      |
| Neutrófilos (%)                   |                  | $26,7 \pm 3,50$        | $25,0 \pm 2,60$         | 26,0     |
| Linfócitos (%)                    |                  | $69,0 \pm 3,50$        | $67,7 \pm 3,48$         | 69,0     |
| Monócitos (%)                     |                  | $3,3 \pm 0,67$         | $6,0 \pm 3,48$          | 4,0      |
| Eosinófilos (%)                   |                  | $1,0 \pm 0,00$         | $1,3 \pm 0,33$          | 1,0      |
| Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )  | $178,0 \pm 39,6$ | $975,6 \pm 74,59^{**}$ | $996,33 \pm 39,46^{**}$ | 1149,0   |

Os valores estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=2 controle, n=3 óleos 1 %, n=3 óleo 3 % e n= 1 óleo 9 %). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)

Tabela 12: : Efeito do tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre os parâmetros hematológicos das fêmeas.

| Parâmetro                         | Controle          | Óleo 1 %             | Óleo 3 %             | Óleo 9 %             |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )   | $8,3 \pm 0,01$    | $7,4 \pm 0,31^*$     | $7,4 \pm 0,10^*$     | $7,85 \pm 0,14$      |
| Hemoglobina (g/dL)                | $15,6 \pm 0,55$   | $15,3 \pm 0,70$      | $15,2 \pm 0,32$      | $15,9 \pm 0,29$      |
| Hematócrito (%)                   | $38,7 \pm 0,80$   | $35,9 \pm 1,55$      | $37,2 \pm 1,12$      | $37,4 \pm 0,70$      |
| VCM (fL)                          | $46,5 \pm 0,50$   | $48,0 \pm 0,00$      | $48,0 \pm 0,58$      | $47,7 \pm 0,33$      |
| HCM (pg)                          | $18,7 \pm 0,65$   | $20,60 \pm 0,10^*$   | $20,6 \pm 0,20^*$    | $20,3 \pm 0,23^*$    |
| CHCM (g/dL)                       | $40,1 \pm 0,50$   | $42,7 \pm 0,10^{**}$ | $42,9 \pm 0,07^{**}$ | $42,6 \pm 0,10^{**}$ |
| Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ ) | $3,4 \pm 0,10$    | $7,1 \pm 1,20$       | $4,2 \pm 0,67$       | $5,0 \pm 0,76$       |
| Neutrófilos (%)                   | $26,0 \pm 1,00$   | $19,5 \pm 1,50$      | $26,3 \pm 6,69$      | $29,0 \pm 2,89$      |
| Linfócitos (%)                    | $69,0 \pm 2,00$   | $73,0 \pm 3,00$      | $70,0 \pm 6,08$      | $67,3 \pm 3,38$      |
| Monócitos (%)                     | $4,5 \pm 0,50$    | $6,5 \pm 1,50$       | $3,33 \pm 0,88$      | $3,0 \pm 1,53$       |
| Eosinófilos (%)                   | $0,5 \pm 0,50$    | $1,0 \pm 0,00$       | $0,33 \pm 0,33$      | $0,67 \pm 0,33$      |
| Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )  | $964,0 \pm 11,31$ | $770,0 \pm 167,73$   | $918,0 \pm 72,64$    | $901,7 \pm 65,4$     |

Os valores estão expressos em média  $\pm$  e. p. m. (n=2 controle, n=2 óleos 1 %, n=3 óleo 3 % e n= 3 óleo 9 %). \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs controle (ANOVA seguido de Dunnett's)



### 5.1.2.7 Estudo anatomopatológico

Em relação ao peso dos órgãos, não houve nenhuma alteração em ambos os sexos com qualquer das doses administradas. Tabela 13

**TABELA 13-** Peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* após o tratamento subcrônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Mann Whitney/ Dunn.

| GRUPOS            | ÓRGÃOS          |                 |                 |                 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                   | BAÇO            | FÍGADO          | CORAÇÃO         | RINS            |
| MACHOS            |                 |                 |                 |                 |
| CONTROLE          | 0,23 $\pm$ 0,01 | 0,22 $\pm$ 0,02 | 2,01 $\pm$ 0,07 | 0,60 $\pm$ 0,02 |
| Óleo essencial 1% | 0,25 $\pm$ 0,03 | 0,19 $\pm$ 0,01 | 2,13 $\pm$ 0,21 | 0,60 $\pm$ 0,03 |
| Óleo essencial 3% | 0,37 $\pm$ 0,13 | 0,23 $\pm$ 0,01 | 2,14 $\pm$ 0,10 | 0,59 $\pm$ 0,05 |
| Óleo essencial 9% | 0,27 $\pm$ 0,11 | 0,15 $\pm$ 0,01 | 2,07 $\pm$ 0,06 | 0,55 $\pm$ 0,02 |
| FÊMEAS            |                 |                 |                 |                 |
| CONTROLE          | 0,18 $\pm$ 0,01 | 1,75 $\pm$ 0,11 | 0,14 $\pm$ 0,01 | 0,47 $\pm$ 0,02 |
| Óleo essencial 1% | 0,21 $\pm$ 0,01 | 1,74 $\pm$ 0,12 | 0,16 $\pm$ 0,01 | 0,50 $\pm$ 0,04 |
| Óleo essencial 3% | 0,25 $\pm$ 0,05 | 1,78 $\pm$ 0,15 | 0,17 $\pm$ 0,02 | 0,53 $\pm$ 0,05 |
| Óleo essencial 9% | 0,34 $\pm$ 0,11 | 1,82 $\pm$ 0,11 | 0,15 $\pm$ 0,01 | 0,62 $\pm$ 0,12 |

Não foram evidenciadas alterações macroscópicas nos órgãos vitais após os 28 dias do estudo. A estrutura histológica manteve-se normal no coração, nos rins, nos pulmões e no fígado. Figuras 3, 4, 5 e 6

Figura 3: histologia cardíaca normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%

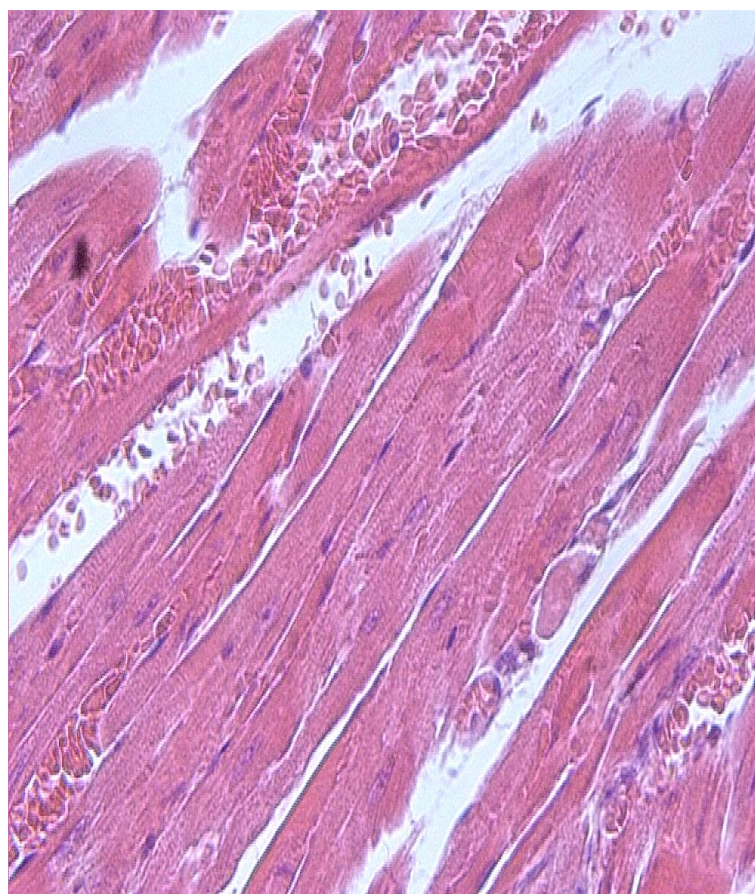


Figura 4: histologia renal normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%

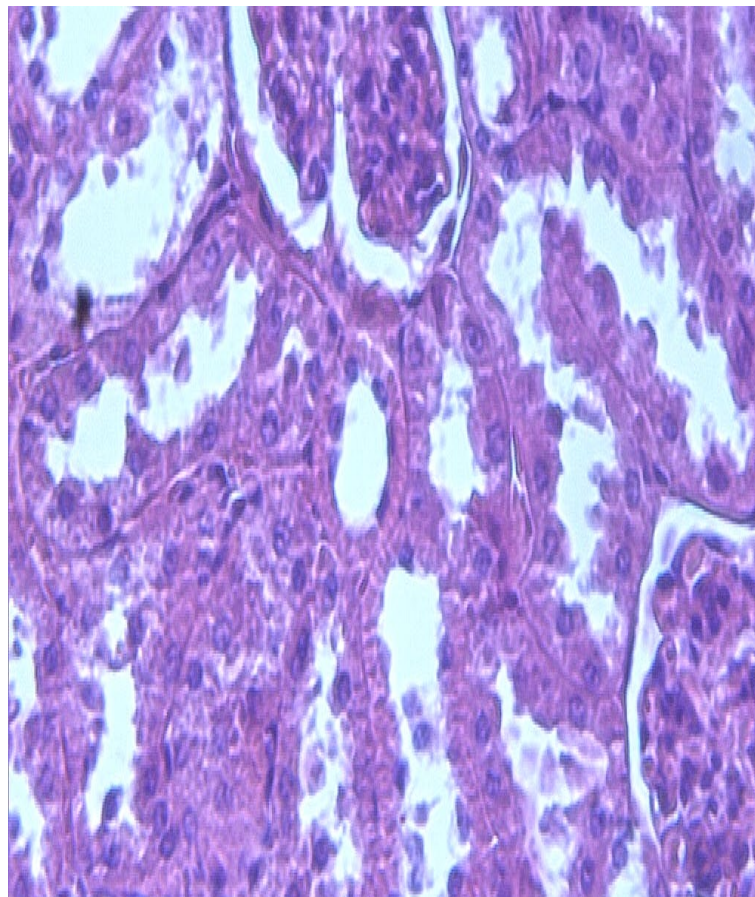


Figura 5: histologia pulmonar normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%

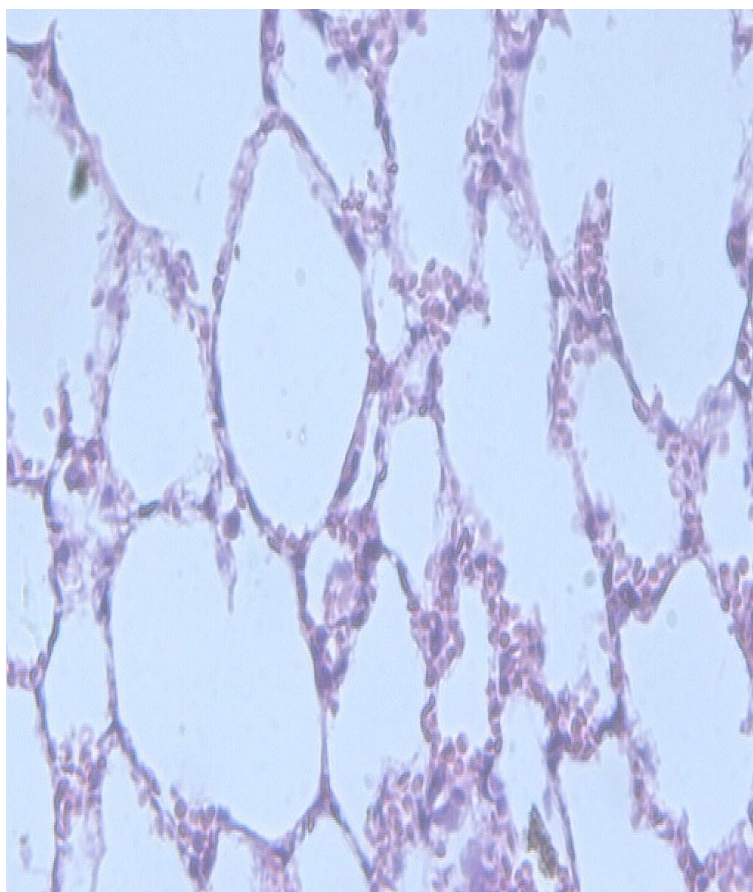
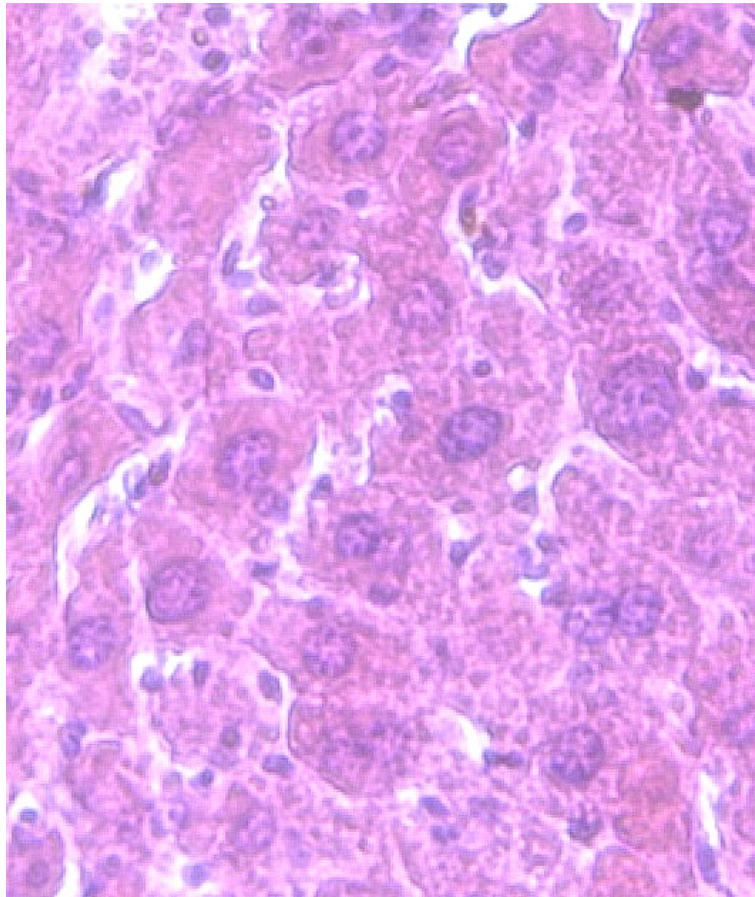




Figura 6: histologia hepática normal em animal tratado com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%



## 5.2 ESTUDO DE IRRITABILIDADE OFTALMICA

### 5.2.1 Descrição das alterações oculares macroscópicas

Conforme descrito na metodologia, foram avaliadas as seguintes estruturas dos olhos dos animais tratados: córnea (opacidade), íris (irite) e conjuntivas (hiperemia e edema). O corante fluoresceína não revelou qualquer alteração na superfície da córnea antes e nem após a aplicação do óleo essencial nas concentrações de 1 , 3 e 9%.

Após realização do teste de irritação ocular com o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 1%, não foram identificadas alterações na córnea, íris ou conjuntiva em nenhum dos tempos de observação padronizados pelo método de Drayse (Figura 7), resultando em uma média máxima de zero, classificando o produto, nesta concentração, como não irritante (quadro 4).

Figura 7: olho tratado com óleo essencial a 1%, apresentando aspecto macroscópico normal



Quadro 4: valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize, para óleo essencial de *Origanum vulgare* 1%

| Estrutura ocular examinada | Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas) |    |    |    |     |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|-----|
|                            | 1                                                                                                                                    | 24 | 48 | 72 | 168 |
| Córnea                     | 0                                                                                                                                    | 0  | 0  | 0  | 0   |
| Conjuntiva                 | 0                                                                                                                                    | 0  | 0  | 0  | 0   |
| Íris                       | 0                                                                                                                                    | 0  | 0  | 0  | 0   |
| Média diária               | 0                                                                                                                                    | 0  | 0  | 0  | 0   |
| <b>Média máxima ± DP</b>   | 0,00 ± 0,0                                                                                                                           |    |    |    |     |

Ao realizar o teste de irritabilidade ocular primária com o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 3%, evidenciou-se alteração nas conjuntivas na avaliação oftalmológica realizada ao completar 1 hora de instilação da substância (coloração púrpura difusa em um dos animais incluídos no estudo), e no exame realizado ao completar 24 horas de uso tópico do óleo essencial apenas hiperemia discreta em um dos animais do estudo (Figura 8). Não foram evidenciadas outras alterações oculares em nenhum dos outros tempos de avaliação preconizados neste teste. A média máxima foi de 1,33, classificando o óleo essencial nesta concentração como praticamente não irritante (quadro 5)

Figura 8: olho após 24 horas de tratamento com óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%, demonstrando hiperemia conjuntival discreta



Quadro 5: valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize, para óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%

| Estrutura ocular examinada | Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas) |      |    |    |     |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----|----|-----|
|                            | 1                                                                                                                                    | 24   | 48 | 72 | 168 |
| Córnea                     | 0                                                                                                                                    | 0    | 0  | 0  | 0   |
| Conjuntiva                 | 2                                                                                                                                    | 1    | 0  | 0  | 0   |
| Íris                       | 0                                                                                                                                    | 0    | 0  | 0  | 0   |
| Média diária               | 1,33                                                                                                                                 | 0,67 | 0  | 0  | 0   |
| <b>Média máxima ± DP</b>   | 1,33 ± 0,64                                                                                                                          |      |    |    |     |

O quadro 6 mostra os valores obtidos, segundo os parâmetros preconizados por Draize, após o teste de irritação ocular, instilando-se o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9% no fundo de saco conjuntival de coelhos. Foram evidenciadas alterações apenas nas conjuntivas, coloração vermelha fartamente distribuída na primeira hora (figura 9) e coloração púrpura difusa no exame realizado ao completar vinte e quatro horas de aplicação do produto. Os exames realizados nas 48, 72 e 168 horas, após aplicação da substância, não evidenciaram alteração em nenhuma das estruturas oculares investigadas. A média máxima foi de 2,00,



sendo o óleo essencial, nesta concentração, classificado como praticamente não irritante.

Quadro 6: valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize, para óleo essencial de *Origanum vulgare* 9%

| Estrutura ocular examinada | Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas) |      |    |    |     |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----|----|-----|
|                            | 1                                                                                                                                    | 24   | 48 | 72 | 168 |
| Córnea                     | 0                                                                                                                                    | 0    | 0  | 0  | 0   |
| Conjuntiva                 | 3                                                                                                                                    | 2    | 0  | 0  | 0   |
| Íris                       | 0                                                                                                                                    | 0    | 0  | 0  | 0   |
| Média diária               | 2,00                                                                                                                                 | 1,33 | 0  | 0  | 0   |
| <b>Média máxima ± DP</b>   | 2,00 ± 0,8                                                                                                                           |      |    |    |     |

Figura 9: conjuntiva de olho de coelho, após 1 hora de contato com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%, com coloração vermelha fartamente distribuída



### 5.2.1 Descrição das alterações microscópicas

Nos exames histopatológicos não houve diferença estatisticamente importante entre os olhos controle e os olhos submetidos ao contato com óleo essencial nas concentrações de 1, 3 e 9%. Encontrou-se processo inflamatório discreto em um dos olhos controle e em um dos olhos submetidos ao contato com o óleo essencial a 3% (figura 8). Os demais olhos não apresentaram infiltrado inflamatório (figura 9).

Figura 10: corte histológico de conjuntiva bulbar em olho de coelho que recebeu óleo essencial de *Origanum vulgare* a 3%, demonstrando infiltrado inflamatório discreto.

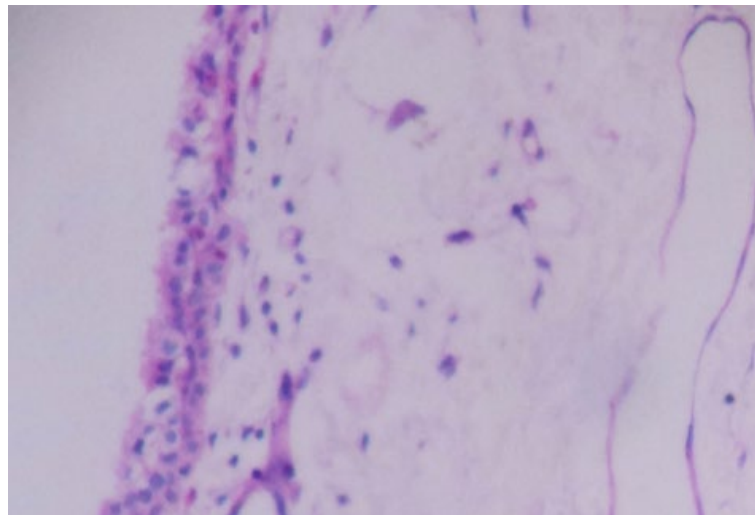
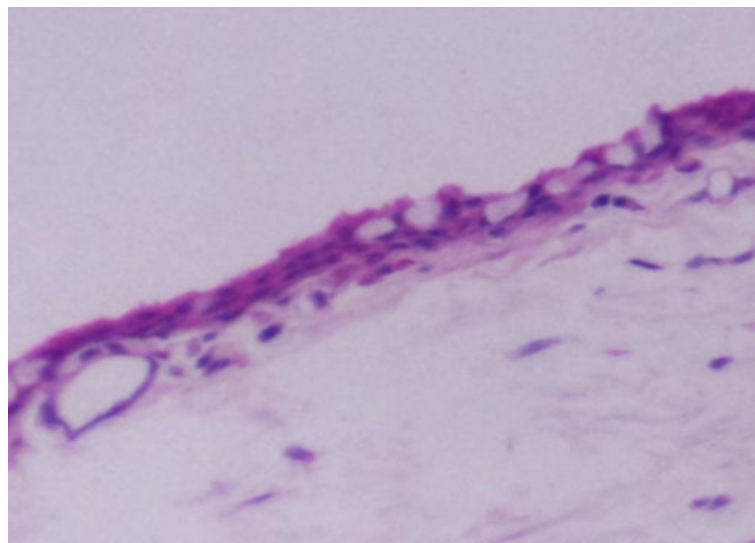


Figura 11: corte histológico de conjuntiva bulbar em olho de coelho que recebeu óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%, demonstrando ausência de infiltrado inflamatório



*Discussão*

---

## 6 DISCUSSÃO

A conjuntivite bacteriana é uma doença que acomete o homem desde a antigüidade, havendo uma descrição acurada dos sinais cardinais da patologia, hiperemia, secreção e edema, pelos egípcios, 1550 anos antes de Cristo (HIRSCHBERG, 1982).

Apesar de ser uma doença, reconhecidamente, muito comum, não existem relatos precisos na literatura mundial a respeito de sua incidência na população geral. É altamente contagiosa e a transmissão, tipicamente, se dá pelo contato mão – olho, no entanto, em casos particulares, outras vias de transmissão podem estar envolvidas na gênese desta doença, desde formas exógenas, através de colírios, lentes de contato, maquiagem, microscópios, insetos e hospitais, até formas de transmissão endógenas, como, por contigüidade, através dos cílios, córnea, sistema de drenagem lacrimal, por via hematogênica e por inoculação através de contaminação do olho contralateral (HWANG, 2003).

Em testes farmacológicos preliminares realizados em nosso laboratório, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. apresentou uma promissora atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *S. coagulase negative*, *Enterobacter* spp. *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp.) isoladas de pacientes com conjuntivite. Os resultados mostraram um destacável efeito inibitório do óleo essencial sobre todas as cepas bacterianas, notado pela formação de amplas zonas de inibição do crescimento bacteriano (15-32 mm). O valor da Concentração Inibitória Mínima – CIM encontrada foi 5-20 µL/mL, o qual foi capaz de causar significativo efeito inibitório sobre a viabilidade celular de *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *S. aureus* causando uma total eliminação do inóculo microbiano em um tempo máximo de 24 h de exposição. Estes resultados suportam o reconhecimento do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. como uma possível fonte de compostos antimicrobianos para ser utilizado em formulações farmacêuticas para tratar as infecções bacterianas, particularmente, conjuntivite (OLIVEIRA et al., 2004).

Diante da efetiva atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., que levanta a possibilidade do uso de tal produto como fonte de compostos antimicrobianos, da escassez de estudos toxicológicos pré-clínicos, decidiu-se investigar a toxicidade *in vivo* pré-clínica aguda e subcrônica do óleo

essencial de *Origanum vulgare* L. bem como, avaliar a irritação ocular aguda em coelhos em que óleo essencial foi aplicado dentro da bolsa conjuntival.

Os experimentos com os animais foram desenvolvidos dentro dos princípios éticos e técnicos atualmente estabelecidos sempre objetivando empregar o menor número possível de animais e diminuir o sofrimento destes. Poda cada um dos experimentos utilizamos grupo controle, onde os animais eram tratados com o veículo a fim de observar eventuais alterações oriundas do meio ambiente ou do estresse produzido nos animais pela manipulação dos mesmos.

O ensaio toxicológico agudo tem o objetivo de obter dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância-teste e seus efeitos adversos num organismo submetido a tratamento de curta duração, informando-nos acerca dos riscos para a saúde humana (ALMEIDA, 2006; BARROS, 2003; ESTEVAM, 2008).

Inicialmente, o estudo toxicológico agudo foi conduzido com a realização de uma triagem farmacológica comportamental utilizando-se metodologia padronizada por Almeida *et al.* (1999), com o objetivo de detectar alterações em nível do Sistema Nervoso Central provocadas pelo óleo essencial. Para tanto, os camundongos receberam através de gavagem a dose única de 2 g/kg de óleo essencial de *Origanum vulgare*; tal dose é considerada por diversos autores como dose limite para avaliação toxicológica aguda (VALADARES, 2006), mesmo por aqueles que ainda preconizam o uso da dose letal mediana ( $DL_{50}$ ), os quais o fazem, na grande maioria, até o limite desta dose experimental, por considerarem que, acima disso, a exposição seria muito alta e pouco provável de acontecer em seres humanos, e a quebra da homeostasia seria atribuída ao fato do organismo em estudo ficar descompensado, não ajudando a conhecer a toxicidade da substância.

Após muitos anos de controvérsias e debates, o teste da  $DL_{50}$  foi eliminado das diretrizes que norteiam a avaliação da toxicidade aguda no final de 2002 (OECD, 1987; BOTHAM, 2004). Ainda assim, a legislação brasileira, que dispõe sobre o registro de fitoterápicos, preconiza, para avaliação da toxicidade aguda de medicamentos fitoterápicos, a estimativa da  $DL_{50}$  sem estabelecer o valor máximo da dose a ser utilizada nestes experimentos. No entanto, a escolha da dose limite de 2 g/Kg neste estudo, foi feita por acreditar que a recomendação da legislação brasileira não está em harmonia com as atuais preocupações em bioética animal, não somente pelo alto número de animais utilizados na determinação da  $DL_{50}$ , como

também por usar, como critério analítico, o evento morte, seguramente o pior de todos os efeitos tóxicos.

A tendência atual em diversos países do primeiro mundo é o de substituir os experimentos para cálculo da DL<sub>50</sub> pelo teste da dose fixa, que tem como vantagem a redução do número de animais e a possibilidade de minimizar o sofrimento destes, uma vez que não há necessidade de ocorrência de morte (PURCHASE *et al*, 1998; DAVINO, 2003; MOTA, 2008).

Após a avaliação dos parâmetros descritos no protocolo para triagem comportamental, nenhuma alteração foi constatada. Além dos sinais tóxicos gerais, foram avaliados outros parâmetros como evolução ponderal e consumo de água e ração, os quais não mostraram qualquer alteração estatisticamente significativa. A determinação desses parâmetros são importantes no estudo de segurança de um produto com fins terapêuticos, uma vez que a adequada ingestão de água e nutrientes são essenciais para o bom funcionamento do sistema fisiológico dos animais e, conseqüentemente, para uma adequada resposta à droga testada, já que condições nutricionais impróprias podem acarretar deficiência do organismo (STEVENSON, 1994; IVERSEN, 2003). Como também são importantes para a avaliação das possíveis alterações metabólicas produzidas pelo produto utilizado.

De acordo com os critérios de classificação de toxicidade da Comunidade Européia, a não ocorrência de mortes, após a administração de 2 g/ Kg de um produto obtido de uma espécie vegetal, por via oral, indica uma provável ausência de toxicidade para a espécie (BARROS, 2003)

No estudo toxicológico subcrônico, os animais foram tratados com 3 doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., geometricamente espaçadas, conforme estabelece a RE 90 da Anvisa. Portanto as doses estabelecidas para o estudo subcrônico foram as seguintes: a dose com efeito antimicrobiano (1 %), três vezes (3 %) e nove vezes (9 %) a dose com efeito terapêutico. Nessa face do estudo foram pesquisadas alterações tanto de parâmetros mensurados durante o tratamento quanto após o período de administração das doses do óleo essencial. Os parâmetros avaliados no tratamento subcrônico foram: consumo de água, ingestão de ração, variação da evolução ponderal, temperatura colônica, glicemia, análises comportamentais, alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, pesagem de coração, fígado e rins e análises histopatológicas.

Os dados obtidos com o teste subcrônico demonstraram que o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. é bastante tolerável ao organismo dos animais, pois durante os 28 dias de tratamento não ocorreu nenhum caso de mortalidade. Com relação à avaliação da variação da evolução ponderal, consumo de água e ingesta de rações, em machos, houve um ganho de peso em alguns dos grupos estudados sem alterações importantes no consumo de água e ingesta de alimento. Estes achados sugerem que o óleo essencial não apresenta toxicidade importante, já que a alteração de peso corpóreo dos animais pode ser indício simples e sensível de toxicidade após exposição a substâncias tóxicas (TOFOVIC; JACKSON, 1999; TEO et al., 2002). Em fêmeas não houve importantes variações da evolução ponderal, consumo de água e ingesta de rações. Esses dados estão em concordância com os achados de Cleff e colaboradores (2008) que avaliou a toxicidade de doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* administrado em ratas Wistar, adultas.

Na análise da temperatura colônica dos animais, os mesmos apresentaram temperatura corporal normal entre 37,5 – 38,5 °C (RALSTON PURINA, 1998), mostrando que a relação metabolismo/regulação se manteve preservada com a administração prolongada do óleo essencial. Com relação à glicemia caudal, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. não promoveu alterações nas doses estudadas, indicando que o óleo essencial não altera o metabolismo e utilização da glicose.

Na realização da triagem comportamental, seguindo o modelo descrito por Almeida et al. 1999, foi observado que administrações do óleo essencial promoveu discretas alterações comportamentais. No teste da coordenação motora (“*rota rod*”) onde se procura analisar um possível efeito neurotóxico, caracterizado por um relaxamento muscular (MORAIS et al., 1998). O tratamento subcrônico com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. não alterou o tempo de permanência na barra em nenhum dos grupos estudados, o que é indício que o óleo essencial não possui efeitos neurotóxicos.

O campo aberto (“*open-field*”) é uma metodologia que possibilita avaliar a “emocionalidade” do animal, pois sabe-se que a ambulação e o comportamento de levantar sejam atividades ligadas, principalmente, a uma boa coordenação motora, enquanto que o comportamento de limpeza e a defecação estejam associados muito mais ao estado emocional do animal (BUENO et al., 1984). Em comparação com o grupo controle, houve um aumento do parâmetro ambulação e levantar em machos tratados com a maior dose do óleo essencial, comportamento semelhante a



substâncias estimulantes motoras, como por exemplo, drogas tipo anfetamina (RANG et al., 2007). Nas fêmeas, apenas o comportamento de limpeza esteve diminuído nas doses de 1 e 9 % do óleo essencial na 2ª semana de tratamento, isto sugere uma maior sensibilidade em machos. Várias drogas têm sido descritas por induzir efeitos tóxicos predominantemente em um dos sexos do animal (HU et al., 1993), por estarem diretamente relacionadas com variações no metabolismo das drogas em machos e fêmeas (ROFF et al., 1992).

Roff et al. (1992) documentaram que algumas isoenzimas da citocromo P450 existentes no fígado do rato são sexo específicas, e portanto o metabolismo de algumas drogas podem variar segundo o sexo. Steiner et al., (1995) estudaram as variações qualitativas e quantitativas de proteínas do fígado de animais, machos e fêmeas, os dados revelaram a existência de proteínas exclusivas de machos e outras exclusivas de fêmeas. Portanto, a expressão de proteínas detectadas em apenas, ou predominante, um dos sexos, pode resultar em efeitos farmacológicos e toxicológicos diversificados e sexo-dependente.

A análise laboratorial do sangue de roedores representa uma importante forma de se investigar a segurança de drogas-teste. Quanto aos resultados dos exames bioquímicos, do conjunto de resultados com significância em termos estatísticos, além de pouco expressivos e sem relação dose-resposta, muito pouco parece relacionar-se com significância fisiológica. Em outro aspecto, muitos dos valores destacados pela avaliação estatística encontram-se dentro de faixas de normalidade estabelecidas para animais (LILLIE et al., 1996; WOLFORD et al., 1986).

Na análise bioquímica do sangue, destacamos inicialmente, a capacidade do óleo essencial (1 %) em reduzir a glicose sanguínea nas fêmeas. A elevação dos níveis de proteínas totais também foi um achado isolado (apenas em machos tratados com 3 % do óleo essencial). Além disso, pode-se afirmar que tal elevação foi clinicamente discreta, considerando-se o que o aumento de 7,4 g/dL é muito próximo de limite superior da faixa dos valores de referência para animais do biotério estabelecida em 6,8 g/dL (MELO-DINIZ, 2000). A globulina também foi elevada em animais tratados com todas as doses do óleo essencial nas fêmeas. Considerando-se que a maior parte das proteínas séricas, tanto albumina quanto globulina possuem síntese hepática (RAVEL, 1997; KANEKO, 1996), este achado, apesar de inespecífico e clinicamente discreto, pode apontar um discreto potencial

hepatotóxico nos machos. Também foram achados isolados: elevação da amilase e  $\text{Ca}^{2+}$  (observado apenas em machos tratados com 1 % do óleo essencial), elevação do  $\text{Mg}^{2+}$  (observado em machos tratados com 1 e 3 % do óleo essencial), aumento na albumina em fêmeas tratadas com 3 % do óleo essencial. No entanto, esses achados apesar de estatisticamente significantes, parece não ter importância clínica por se tratar de eventos isolados, independentes de dose, além do fato de que as alterações observadas encontram-se muito próximas do limite superior dos valores de referência.

Em relação à análise hematológica, destaca-se a capacidade do óleo essencial em aumentar o número de hemácias, a hemoglobina e o hematócrito em machos. O aumento destes parâmetros hematológicos nos animais apesar de estatisticamente significativo, não exibe significância clínica, considerando que os valores superiores de referência para animais de biotério (MELO-DINIZ, 2000) é de  $9,1 \times 10^6/\text{mm}^3$  para hemácia, 15,0 g/dL para hemoglobina e 43 % para o hematócrito. Desta forma, apenas a hemoglobina dos animais tratados com 3 % do óleo superou em 8 % o valor de referência. Nas fêmeas, o óleo induziu uma diminuição no número de hemácias e aumento do HCH e CHCM. As alterações destes índices hematimétricos nas fêmeas apesar de estatisticamente significativo também não apresentam significância clínica por apresentarem valores dentro da faixa de referência para animais de nosso biotério.

Um dos parâmetros hematológicos avaliados foi a contagem diferencial de leucócitos, que são os elementos figurados incolores do sangue circulante e desempenham papel essencial no mecanismo de defesa do organismo contra agressões infecciosas ou de outra natureza. Eles podem ser de três classes: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos e monócitos. A percentagem relativa destas células pode fornecer informações sobre diferentes condições patológicas (VASCONCELOS, 2004; MOTA, 2008). A administração subcrônica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. não alterou a contagem diferencial de leucócitos nos animais.

Convém ressaltar, ainda na análise dos parâmetros hematológicos, o aumento do número de plaquetas nos machos, esse achado foi expressivo tanto do ponto de vista estatísticos como clínico. Esse achado laboratorial pode significar, entre outras situações, predisposição a hemorragias e toxicidade esplênica (OLIVEIRA, 1985).

No estudo anatomopatológico dos órgãos e tecidos coletados durante a necrópsia, não foram evidenciadas alterações macroscópicas ou morfológicas, assim como em relação ao estudo histopatológico das amostras coletadas dos animais experimentais, sem diferença entre os grupos.

A ausência de efeitos colaterais pelo o uso do *Origanum vulgare* L. foi demonstrada em outros estudos com animais (ALLAN; BILKEY, 2005; GIANNENAS et al., 2003). A adição de folhas secas da planta na dieta de suínos resultou em maior índice reprodutivo em leitoas, além de melhorar a atividade metabólica intestinal desses animais, e quando adicionou 1000 ppm do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. na dieta, não foram observadas quaisquer alterações (ALLAN; BILKEY, 2005). Segundo os autores os efeitos positivos do vegetal na saúde e produção de suínos podem ser devido à ação antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória, sendo que a propriedade anti-radical atribuída ao *Origanum vulgare* L. se deve a presença dos monofenóis, carvacrol e timol (ARCILA-LOZANO et al., 2004). Outros autores ao adicionar o óleo essencial do *Origanum vulgare* L. á ração de aves poedeiras constataram uma diminuição na contaminação por hemoparasitas (GIANNENAS et al., 2003).

Por outro lado, estudos clínicos têm demonstrado que *Orégano* spp apresenta alergenicidade, sendo recomendado evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido a propriedades sedativas e abortivas (ARCILA-LOZANO et al., 2004). Estudo utilizando extrato aquoso a 20% de *Origanum vulgare* L. em fêmeas prenhes, evidenciaram pequeno atraso no desenvolvimento embrionário, porém o percentual de embriões anormais não foi significativo, o que foi atribuído ao efeito antimutagênico e antioxidante do extrato (OLIVEIRA; RIBEIRO-PINTO; PAUMGARTTEN, 1997). O potencial anticarcinogênico parece ser devido à capacidade do óleo de *Origanum vulgare* L. induzir um incremento na atividade da enzima destoxicante glutathione S-transferase (GST) quando administrado oralmente (LAM; ZHENG, 1991).

Laboratórios americanos passaram a desenvolver metodologias para investigar os efeitos irritantes ou corrosivos de uma substância para os olhos antes que a mesma fosse comercializada, após sério acidente alérgico com uma senhora que utilizou tintura nos cílios. As alterações oculares clínicas e histopatológicas passaram a ser estudadas em animais, geralmente, coelhos. Nos anos 40, Friedenwald et al (1944) publicaram uma escala numérica para graduar a severidade

da irritação na córnea de coelhos. Esse sistema possibilitou transformar as observações qualitativas macroscópicas das alterações oculares em valores numéricos, facilmente interpretados. Os valores individuais eram somados e totalizados em um escore final que representava a severidade da lesão ocular. Além disso, o sistema também permitiu que os pesquisadores correlacionassem a dose e resposta do agente irritante e comparar os efeitos de substâncias diferentes. O método foi adotado por outros autores e, mais tarde, foi refinado por John H. Draize e colaboradores (WILHELMUS, 2001; SCHEIWILLER, 2005)

O teste de irritação ocular ou Teste Ocular de Draize faz parte dos testes toxicológicos exigidos pelas agências regulatórias para registros de diversos tipos de substâncias. Os resultados obtidos a partir deste teste tem grande importância na decisão da classificação toxicológica de um produto, por ser muitas vezes o dado mais crítico entre os testes toxicológicos (WILHELMUS, 2001; STAUB, 2007).

A razão de se estudar os efeitos do óleo de *Origanum vulgare* L. sobre a superfície ocular reside no fato do mesmo apresentar promissora atividade antimicrobiana contra cepas oriundas de pacientes portadores de conjuntivite bacteriana e, na expectativa do uso de tal produto como fonte de compostos antimicrobianos que possam ser usados no tratamento de afecções oculares. (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al, 2009)

No teste original de Draize três tipos de tecidos são examinados: córnea, íris e conjuntivas. Cada tecido tem diferentes características a serem avaliadas (DRAIZE et al, 1944). No teste de Draize adaptado pela OECD, 405/2002, examina-se na córnea, a densidade da opacidade, na íris, a irritação, e nas conjuntivas, a hiperemia e o edema.

Após o teste de irritação ocular com o óleo essencial de *Origanum vulgare* na concentração de 1%, que é a dose terapêutica contra bactérias causadoras de conjuntivite, não foram identificadas alterações em nenhuma das estruturas oculares examinadas, em nenhum dos tempos de observação, quando comparados com o controle. De acordo com o teste utilizado, foi feita uma média diária, que foi alcançada somando-se os valores obtidos para córnea, íris e conjuntiva, para cada tempo de leitura e dividindo-se o valor assim calculado pelo número de coelhos utilizados no ensaio (BRITO, 1994). De acordo com o valor obtido, o *Origanum vulgare* 1% foi classificado como substância não irritante, sugerindo que tal componente pode ser usado na superfície ocular sem provocar efeitos tóxicos.

A realização do mesmo teste com o óleo essencial na concentração de 3%, provocou hiperemia conjuntival após 1 hora da instilação do produto no saco conjuntival, estando este efeito bem diminuído após 24 horas e ausente em todos os outros tempos de avaliação. A hiperemia surge no olho devido à vasodilatação local, sendo manifestação comum em um organismo em resposta a um irritante, com o intuito de liberar mediadores químicos para desativar o agente agressor (BOROWSKY, C.; BELLINI, L.P., 2007). Como a conjuntiva é amplamente vascularizada e encontra-se, do ponto de vista anatômico, como primeira camada de contato do olho com o meio externo, constitui importante barreira de defesa do aparelho ocular. Consequentemente, a hiperemia conjuntival é achado clínico muito comum, mesmo diante de agentes fracamente irritantes (KANSKI et al, 2008). Em nosso estudo apenas um animal manifestou tal sinal e o mesmo desapareceu rapidamente, não sendo considerado como fator importante para considerar a substância agressiva para o olho nesta concentração. Nenhum outro parâmetro encontrou-se alterado em nenhum dos tempos padronizados de exame.

A média máxima é o maior valor de média diária obtida, tomando-se como base as médias diárias dos quatro primeiros dias de observação (DRAIZE, 1944; BRITO, 1994; OECD, 2002) . Com o óleo essencial a 3%, a média máxima foi de 1,33 o que classifica o produto como praticamente não irritante, o que sugere segurança para uso como inoculante ocular, mesmo nesta concentração que é três vezes superior à dose terapêutica.

Como preconizado pela ANVISA através do guia para realização de estudos de toxicidade pré clínica de fitoterápicos (BRASIL, 2004), a avaliação da toxicidade ocular também foi realizada com a concentração de 9% do óleo essencial de *Origanum vulgare*, dose nove vezes maior que a dose terapêutica, a fim de avaliar possíveis efeitos tóxicos diante de uma inoculação acidental de quantidade muito superior a preconizada para um possível tratamento.

Ao completar uma hora da inoculação do óleo essencial a 9% no saco conjuntival do coelho, evidenciou-se coloração vermelha fartamente distribuída na conjuntiva. Este efeito diminui, apresentando-se com coloração púrpura difusa na avaliação oftalmológica feita com 24 horas. Nos demais tempos de avaliação, não houve mais alteração conjuntival. Embora a reação inflamatória conjuntival tenha sido um pouco mais pronunciada com o aumento da concentração do óleo essencial, é importante ressaltar que desapareceu, por completo, após 24 horas.

Nenhuma das outras estruturas oculares encontraram-se alteradas em nenhum dos tempos padronizados de avaliação oftalmológica. A média máxima calculada foi de 2,00, classificando o produto em praticamente não irritante, o que sugere que, mesmo diante de uma inoculação acidental do produto no olho, não resultará em sequelas oculares, demonstrando segurança para uso do produto.

Portanto, para as conjuntivas, o tratamento com o óleo essencial, em todas as doses estudadas, quando induziu alterações, estas foram discretas e reversíveis em um período curto após a aplicação do produto.

A córnea é a estrutura mais importante a ser avaliada no teste de irritação ocular, devido ao papel que desempenha no processo da visão. Qualquer desarranjo na córnea é porta de entrada para processos infecciosos ou causa de distúrbio funcional (ESTÉVEZ, 2004). No presente estudo os animais tratados com todas as doses avaliadas do óleo de *Origanum vulgare* L. não apresentaram alterações na córnea em nenhum dos tempos de avaliação.

O mesmo foi observado para íris, visto que o tratamento com o óleo de *Origanum vulgare* L. não induziu irritação na íris com nenhuma das concentrações testadas.

De acordo com a literatura, o olho de coelho é mais sensível a agentes irritantes que o olho humano. A superfície epitelial do olho do coelho é dez vezes mais permeável aos solutos hidrofílicos que o olho humano. A córnea do coelho é bem mais fina que a dos humanos, com espessura média de 0,37mm, enquanto nos humanos é de 0,51mm. A membrana de Bowman da córnea destes animais é seis vezes mais fina. O limiar de dor do coelho é muito mais elevado do que dos seres humanos, fazendo com que substâncias irritantes sejam removidas lentamente, fato potencializado por um sistema lacrimogêneo menos eficiente, atrasando ainda mais a remoção de substâncias irritantes de sua superfície. Além disso, a córnea representa 25% da área de superfície do olho do coelho e somente 7% da área de superfície ocular humana. Finalmente, o PH do humor aquoso do coelho é de 8,2, comparado com 7,1 a 7,3 para o homem, tornando os coelhos mais suscetíveis aos danos causados por materiais alcalinos (KAUFMAN, 2007).

Na maior parte dos casos, os coelhos albinos são mais sensíveis que o homem aos agentes irritantes. Resultados de ensaios efetuados em outras espécies animais podem reforçar aqueles obtidos com coelhos. É possível, então, extrapolar

os dados para os seres humanos. (Draize et al, 1944; BRITO et al, 1994; OECD, 2002)

Nosso estudo demonstrou que o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 1% foi não irritante e nas concentrações de 3 e 9 % praticamente não irritante. Como descrito acima, os olhos de coelhos são mais sensíveis a agentes tóxicos, fazendo-nos sugerir que os efeitos encontrados provavelmente seriam ainda menos significativos em olhos humanos. Associado aos achados macroscópicos, a avaliação microscópica dos olhos após exposição a todas as concentrações do óleo essencial, não evidenciaram alterações significativas quando comparadas aos olhos controle.

O teste de irritação ocular demonstrou que o contato dos olhos estudados com todas as concentrações avaliadas do óleo de *Origanum vulgare* L. produz lesões oculares mínimas, as quais são reversíveis geralmente após as 24 horas de exposição ao produto.

*Conclusões*

---



## 7 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, conclui-se que:

- O estudo toxicológico pré-clínico agudo demonstrou que o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. possui toxicidade aguda (v.o.) relativamente baixa, principalmente considerando-se que não foi possível calcular a DL<sub>50</sub>.

- O estudo toxicológico pré-clínico subcrônico demonstrou que o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. possui toxicidade subcrônica (v.o.) mínima, essencialmente pelo fato de não induzir letalidade, associado ao fato de não haver indicativos de toxicidade renal e hepática em animais tratados com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

- A avaliação da irritabilidade oftálmica contribuiu para conhecer as alterações clínicas macrocópicas e microscópicas na superfície ocular dos olhos de coelhos expostos ao óleo essencial de *Origanum vulgare* L., em cada intervalo do teste de irritabilidade ocular. Com base nos dados obtidos foi possível classificar o óleo essencial de *Origanum vulgare* L a 1% como não irritante, e nas concentrações de 3 e 9%, como irritante mínimo.

---

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, P.; BILKEY, G. Oregano improves reproductive performance of sows. **Theriogenology**, v.63, p.716-721, 2005.
- ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.; DINIZ, R.S.T; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. **Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais**. Rev. Bras. Farm. V. 80, n.3-4, p. 72-76. 1999.
- ALMEIDA, R.N.; CARLINI, E.L.A. Aspectos éticos da experimentação com animais. IN: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia. Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.62-75, 2006.
- AMOROZO, M. C. M. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, Luiz Cláudio (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciências. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. P.47-67.
- ANDERSEN, M. L. et al. **Princípios éticos práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP. 2004. 167p.
- ARCILA-LOZANO, C. C.; GUADALUPE, L. P.; SALVADOR, L. U.; MEJÍA, E. G. Oregano: properties, composition and biological activity. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, p.100-111, 2004.
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. Review - The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173-186, 2006.
- BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; CHISTAKI, E.; SPAIS, A. B.; CHATZOPOULOU, P. S. Effects of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. **Animal Feed Science and Technology**, p.1-11, 2005.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu Editora. 2003. P.57-67.
- BASÍLICO, M. Z.; BASÍLICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.238-241, 1999.
- BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169-172, 2004.
- BEZERRA, M. A. C. **Alpinia speciosa Schum: Estudo das frações fixas e do óleo essencial**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

- BISSET, N.G. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals - A handbook for practice on a scientific bases**. Stuttgart: CRC Press, London. Medpharm, 1994.
- Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução - RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de março de 2004.
- BOTHAM, P.A. Acute systemic toxicity-prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**. v. 18, n.2, p. 227-30, 2004
- BRASIL. Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE"**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.
- BRITO, A. S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994, 122p.
- BROOK, L. *et al.* Anaerobic and aerobic bacteriology of acute conjunctivitis, **Ann Ophthalmol**, 11: 389, 1979.
- BURD, E.M. **Bacterial keratitis and conjunctivitis - Bacteriology**. Smolin, g. & Thoft, RA The Cornea. 3. ed. Boston. Little, Brown and Company, 1994
- 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.
- BUSNACH, N.; DAGANS, R.; GREENBERG, D. Clinical and bacterial characteristics of acute bacterial conjunctivitis in children in the antibiotic resistance era. **Pediatric Infect Dis J**. v.24(9), p. 823-828, 2005.
- CAPASSO, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. Pharmacology effects of aqueous extract from *valeriana adscendens*. **Phytoterapy Research**, v.10, p.309-312, 1996.
- CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food chemistry**, p.1-4, 2002.
- CARLINI, E.A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. Savier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 1973.
- CAZARIN, K. C.C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Situação internacional da utilização de animais em estudos toxicológicos frente ao programa 3RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 13, 2003, Londrina, **Revista Brasileira de Toxicologia**. São Paulo, v.16, n.1, p.204, 2003.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v.24, p.453-465, 2002.

CHÁVEZ, J. P. **Terpenóides de Ocotea corymbosa [Meissn] Mez**. Dissertação de Mestrado Universidade de SP, São Paulo, 1991.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v.16, p.2-7, 2004.

CHUNG, C.W.; COHEN, E.J. Bacterial conjunctivitis. **West J Med**. 173(3): 202-5, 2000.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; Lima, C.C., Leal Cardoso, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v.11, p.299-304, 1997.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. H. A.; TREVISAN, R. M. S. Avaliação do risco In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p.69-76.

COSTA, A.C. Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. Contra Bactérias Multirresistentes. Tese (doutorado) em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

COWAN, M.N. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev**. 12:14, oct, 1999,564-582.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMING, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170-175, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v.16, p.224-228, 1993.

CUNHA, R. M. **Efeitos do óleo essencial de ocotea duckei vattimo (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, 2004. 106p. UFPB.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study to irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. **Journal of Pharmacology Experimental therapeutics**, v.82, p.377-390, 1944.

ESTEVAM, E.C. **Avaliação da toxicidade pré clínica das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. em camundongos**. Tese (doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

ESTÉVEZ, R. A. **Efeito do tacrolino na reepitelização da córnea em coelhos** (Tese de doutorado), 2004.

FREISE, F. W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. **Perfume Essential Oil Research**, v.26, p.219-220, 1935.

FRIEDENWALD, J.S.; HUGHES JUNIOR, W.F.; HERMANN, H. Acid-base tolerance of the cornea. **Archives of Ophtalmology**, v.31, p. 279-283. 1944.

FORCE, M.; SPARKS, W. S.; RONZIO, R. A. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. **Phytotherapy Research**, v.3, p.213-214, 2000.

GIANNENAS, I. A.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZAHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. A.; SPAIS, A. B.. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, p.99–106, 2003.

GIGLIOTTI, F; WILLIAMS, W.T., HAYDEN, F.G.; et al. Etiology of acute conjunctivitis in children. **J Pediatr**. 98:531-536, 1981;.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, v.11, p.17-20, 1990.

HELLINGER, W. **Confronting the problem of increasing antibiotic resistance**. **Mayo Clinical Medicine**. V 93(9). p.842-848. 2000

HIRSCHBERG, J. **The history of ophthalmology, vol 1, the history of ophthalmology in antiquity**, Bonn, 1982, JP Wayenborgh.

HU, F. B.; WILLETT, W. C. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. **Journal of American Medical Association**, v.288, n.20, p.2569-2578, 2002.

HU, J. J.; LEE, M. J.; VAPIWALA, M.; REUHL, K.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.122, p.16-26, 1993.

HUHTALA, A. Corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell culture assays as potential alternatives to animal experiments for the evaluation of ocular toxicity. **Helsinki University of Technology**, 2003.

HWANG, D.G. A phase 111, placebo controlled clinical trial of 0,5% levofloxacin ophthalmic solution for the treatment of bacterial conjunctivitis. **British Journal of Ophthalmology**. V. 87 p. 1004-1009,2003

INGRAM, C. **The cure em the cupboard, (How to use oregano for better health)**. Publisher: Knowledge House, Illinois, 1997.

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A. Pungent diarylheptanoid from the *Alpinia oxyphylla*. **Phytochemistry**, v.20, p.769-771, 1981.

IVERSEN, P.O.; NICOLAYSEN, G. **Water-for life**. Tidsskrift for den Norske Laegeforening 123, 3402-3405. 2003

JACOBSON-KRAM, D.; KELLER, K. A. **Toxicology testing handbook**. New York: Marcel Dekker, 2001.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v.65, p.683-687, 2002.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, San Diego: Academic Press, 1996.

KANSKI, J.J. **Oftalmologia Clínica, uma abordagem sistemática**. Ed. Elsevier, São Paulo, 2008.

KAUFMAN, S.R. Problems with the Draize test. **Americans for medical advancement**. 2007

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.40, p.387-391, 1992.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisin) an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p.1049-1055, 1985.

KOKKINI, S.D. VOKOU and R. KAROUSOU. Essential oil yield of Lamiaceae plants in Greece. In: **Biosciences** (S.C. Hatacharyya, N. Sen and K. L. Sethi, eds.). Proceedings of the 11 th International Congress Essential oils, Fragrances and Flavours. Oxford and IBH, new Dehli, v.3, p.5-12, 1989.

KONSTANTOPOULOU, I.; VASSILOPOULOU, L.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.; SCOURAS, Z. G. Insecticidae effects of essencial oils. A study of the effects of essencial oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, v.48, p.616-619, 1992.

LAM, L. K. T.; ZHANG, J.; ZHANG, F.; ZHANG, B. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by 2-n-heptylfuran and 2-n-butylthiophene from roast beef aroma In: Mussinan, C. J.; KEELAN, M. E, (Eds). **Sulfur Compounds in Food**. Washington, DC: ACS Symposium Series ,1994. p. 278-291.

LARINI, L. Avaliação toxicological. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3.ed. são Paulo: Manole. 1993. P.43-58.

LILLIE, L.E.; TEMPLE, N.J.; FLORENCE, L.Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. **Human & Experimental Toxicology**, v.15, nº 8, p612-6, 1996.

LIMA, AL.G. *et al*. Microbiota anaeróbica e facultativa da conjuntiva normal do recém nascido. **Arq. Bras. Oftal**. 56: 138-144, 1988.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. Simplified method of evaluating dose – effect experiments. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, p.96-99, 1949.

LU, F. C. **Toxicologie – Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, evaluation du risqué**. Paris: Masson, 1991, 361p.

LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. Essential oils of the some Amazonian zingiberaceae, Genera *Alpinia* and *Rengalinine*. **Journal of Natural Products**, v.47, p.907-908, 1984.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; Leal Cardoso, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v.12, p.172-177, 1998.

MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W.; URILINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-)<sup>9</sup>-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open-field arena. **Psychopharmacology**, v.9, p.388-397, 1971.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.187-195, 2001.

MARTÍNEZ, B.O.; RUIZ, R.M.; PÉREZ, R. M. Conjuntivitis bacteriana: patógenos más prevalentes y sensibilidad antibiótica. **Anales de Pediatría**, v. 61 n. 01. p. 32-36, 2004.

MELO-DINIZ, M. F. F. M. **Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich.** Tese (doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.93-97, 1991.

MENDONÇA, V.L.M. **Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-graduação em farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 152, 1989.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3 ed. São Paulo: Michalany. 1998, 295p.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERCOVIK, L. Chemical composition and oxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from *Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v.71, p.79-83, 2000.



MOTA, C.A.X. **Avaliação Toxicológica Pré Clínica de Praxelis Clematidea (Griseb.) R.M. King e H. Robinson.** Tese (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

NETTO, S. M. Animais de laboratório. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia. Fundamentos práticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. P.46-52.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO ROCCARO, A., ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO-PINTO, J. R.; PAUMGARTTEN, J. R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. **Toxicology letters**, v.92, p.39-46, 1997.

OLIVEIRA, H. P. **Hematologia Clínica.** 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985, 606p.  
Oliveira, J. L. T. M.; Diniz, M. F. M.; Lima, E. O.; Souza, E. L.; Trajano, V. N.; Santos, B. H. C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in Inhibiting the growth of bacterial Strains Isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.1, p.45-50, 2009.

OLIVEIRA, J.L.T.M. **Estudo da atividade antibacteriana de óleos essenciais contra agentes etiológicos da conjuntivite bacteriana simples.** Tese (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

OLIVEIRA, J.L.T.M.; DINIZ, M.F.F.M; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; SANTOS; B.H.C.; Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.45-50, 2009

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRANCKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K. V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 32, p. 56-67, 2000.

ORÉFICE, F.; BONFIOLI, A.A.; BORATTO, L.M. **Biomicroscopia e Gonioscopia. Texto e Atlas.** São Paulo: editora cultura médica. 2001

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, p.100. 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 405. Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2002.

PAPARELLA, M.; FASSOLD, E. The challenge to reduce animal testing in regulatory toxicology. Example: The biocidal products directive (BPD). **Pharmacology**, v.72, n.2, p.151, 2004.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Risk assessment for chemical substances: the link between toxicology and public health. **Cadernos de saúde Pública**, v.9, n.4, p.439-447, 1993.

PEAK, P. W.; PUSSEL, B. A.; MARTYN, P.; TIMMERMANS, V.; CHARLESWORTH, PRUDENTE, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; MICHEL, G.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the automan from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum). **The Journal of Essential Oil Research**, v.5, p.255-264, 1993.

PERKINS, RE. *et al.* Bacteriology of normal and infected conjunctiva. **J Clin Microbiol** 1: 147, 1975

PURCHASE, I.F.; BOTHAM; P.A.; BRUNER, L.H.; FLINT, O.P.; FRAZIER, J.M.; STOKES, W.S. workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v. 43, n.2, p.86-101, 1998.

PUY, P.; BENÍTEZ DEL CASTILLO, J. M.; JIMÉNEZ ALFARO, I.; GARCIA SÁNCHEZ, J.; Alteración de La permeabilidade Del epitélio corneal in pacientes com ojo seco. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v.73; p.495-499, 1998.

RALSTON PURINA DO BRASIL LTDA. **Manual de animais de laboratório**. São Paulo, 1998, 21p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTIER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2007, 848p.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações e clínicas dos achados laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RIETVELD, RP.; WEERT, H.C.P.M.; RIERT, G. BINDELS, P.J.E. Diagnostic impact of signs and symptoms in acute infectious conjunctivitis: systematic literature search. **Clinical Evidence**. 327:789,2003

ROFF, C. F.; PASTOSYN, A.; J. T.; VANIER, M. T.; BRADY, R. O.; SCALLEN, T. J.; PENTCHEV, P. G. Protein variability in male and female wistar rat liver proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v.267, p.15902-15908, 1992.

ROMAY, T. Estudio de la irritabilidad oftálmica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.1, p.13-15, 1996.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 56, p.2-9, 2003.

SCHOR, P.; CHAMON, W. BELFORT, RJ. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar** - UNIFESP/ Escola Paulista de Medicina. Editora Manole. 2004.

SEAL, D.V.; BARRETT, S.P.; MCGILL, J.I. Aetiology and Treatment of acute bacterial infection of the external eye. **Br J Ophthalmol**. 1982; 66:357-360.

SEAN, P. D. Should we prescribe antibiotics for acute conjunctivitis? **American Family Physician**, v.66, p.199-210, 2002.

SHEIKH, A.; HURWITZ, B. topical antibiotics for acute bacterial conjunctivitis: a systematic review. **The British Journal of General Practice**, v.51, p.473-477, 2001.

SHINGH N.; SINGH, R.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Efficacy of chlorine dioxide; ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing E. Coli O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technology**, v.35, p.720-729, 2002.

SHUBINA, L. P.; SIURIN, S. A.; SAVCHENKO, V. M. Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis. **Vrach Delo**, v.5, p.66-67, 1990.

SOUZA, L. B.; LIMA, A. L. H. Flora ocular normal. In: LIMA, A. L. H.; ISHIWAKI-DANTAS, M. C.; ALVES, M. R. **Manual do CBO: doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1999.

STEINER, S.; WAHL, D.; VARELA, M. C.; AICHER, L.; PRIETO, P. Protein variability in the male and female wistar rat liver proteins. **Eletroforesis**, v.16, p.1969-1976, 1995.

STEVENS, K.R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. In: Hayes, A.W. (ed), **Principles and methods of toxicology**, 3<sup>rd</sup> ed. Raven Press, New York, p. 673. 1994

SZETO, Y. T.; TOMLINDON, B.; BENZIE, I. F. Total antioxidant and Ascorbic Acid content of fresh fruits and vegetables implications for dietary planning and food preservation. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.55-59, 2002.

TALALAY, P.; TALALAY; P. The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**. v. 76(3), p. 238-247, 2001.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 174, p.183-196, 2002.

THOMPSON, D. P. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. **Mycologia**, v.81, n.1, p.151-153, 1989.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.33, p.360-366, 1999.

TSINAS, A. C. The art of oregano. **Grain Feed & Milling Techonogy**. P.25-26, 1999.

VALADARES, M.C. avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a "era do teste DL<sub>50</sub>". **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 3(2), 93-98, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos e clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE)**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, 2004, 140p.

VATTEM, D. A.; RANDHIR, R.; SHETTY, K. Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. **Process Biochemistry**, v.20, p.2225-2238, 2005.

VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J. M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.21, p.287-295, 1993.

WALSH, S. E.; MAILLAR, J. Y.; RUSSEL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L., BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.940-247, 2003.

WOLFORD, S. T.; SCHROER, R. A.; GOHS, F. X.; GALLO, P. P.; BRODECK, M.; FALK, H. B.; RUHREN, R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.18, p161-88, 1986.

WILHEMUS, K.R. The Draize Eye Test. **Survey of Ophtalmology**, v.45, p.493-515, 2001.