



MARIANA ARAÚJO ESPÓSITO

***Lippia alba* AND *Eucalyptus* sp ESSENTIAL OIL:
BIOLOGICAL AND CHEMICAL
CHARACTERIZATION**

**LAVRAS-MG
2018**

MARIANA ARAÚJO ESPÓSITO

***Lippia alba* AND *Eucalyptus* sp ESSENTIAL OIL:
BIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. SILVANA MARCUSSI
ORIENTADORA

**LAVRAS-MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Espósito, Mariana Araújo.

Lippia alba AND *Eucalyptus* sp Essential oil: : Biological and
chemical characterization / Mariana Araújo Espósito. - 2018.

87 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Eucalyptus. 2. Lippia. 3. Inibidor enzimático. I. Marcussi,
Silvana. . II. Título.

MARIANA ARAÚJO ESPÓSITO

***Lippia alba* AND *Eucalyptus* sp ESSENTIAL OIL:
BIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION**

**ÓLEO ESSENCIAL *Lippia alba* e *Eucalyptus* sp:
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 04 de julho de 2018.
Dr. Juliana Mesquita Freire, DQI, UFLA
Dr. Luis David Solis Murgas, DMV, UFLA
Dr. Luciano José Pereira, DCS, UFLA
Dr. Marta Chagas Monteiro, DFAR, UFPA

Prof. Dra. Silvana Marcussi
ORIENTADORA

**LAVRAS-MG
2018**

*Dedico este trabalho a minha professora orientadora Silvana Marcussi,
por fornecer em sua conduta, de sensibilidade e dedicação a nós, o
modelo que precisamos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus criador e protetor.

À minha filha pelo amor, lealdade e companhia.

À professora Silvana, pela orientação, paciência e disposição para ajudar. À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química, pela oportunidade. Aos Reitores Édila Vilela, Rafael Pinho e Tadayuki.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado. A Fapemig e ao CNPq. À PRAEC que me acompanhou e fortaleceu.

À todos os funcionários da UFLA, de diferentes áreas, que me trataram de forma especial e com afincio.

Aos Professores Paulo, Luciana Matos, Luciana Lopes, Teodorico, Magela, Gavilanes, Luis Roberto, Marcelo Oliveira e José Eduardo Brasil, pela orientação, carinho e paciência. A Professora Graça por me ensinar um pouco mais sobre Fitoquímica.

A todos os colegas de departamento, pois muitos se tornaram amigos. Em especial à Rafaela Brandão, Lucilene, Pedro, Adnéia, Priscila, Tamara, Lucas, Tássia, Thaís, Matheus e Mariana Baga.

À minhas irmãs Debora e Laura. Meu irmão Rafael –que cuidou de mim nas horas mais difíceis. Aos meus tios, Octávio e Deuslira. A meus primos Claudio e Flávia Candiani.

À equipe do Hospital Luxemburgo e Mário Penna – que me trouxeram de volta a vida. Em especial aos médicos Telma Rossi, Luiz Flávio e Arnaldo. A meu amigo Adilson Alves Júnior.

À minhas amigas Binha, Paula, Meila e Cris Hinkelman. À Patrícia Pompeu, Trota e tio Gui. Às famílias que me acolheram: José Maria; Josilaine Campos, Nelson Curi e Juliana.

À D. Ana, Eliana Bernardes, Ricardo, Fabrício Salgado, Eduardo Campadeli, Lena, Victor, Cida, Gilson e Maria José: minha família em espírito neste mundo. Aos mentores espirituais que me renovam as forças diariamente. Ao grupo de estudo do CEAS que me modificaram moralmente.

MUITO OBRIGADA!

“A simplicidade é a essência da vida.”

Iara Schmeigel

RESUMO GERAL

Óleos essenciais (OE) são metabólitos especiais vegetais biossintetizados à partir do isopreno e que possuem propriedades biológicas variáveis de acordo como a seus componentes. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os componentes que constituem os OE de folhas de *Eucalyptus grandis* (EG), *Eucalyptus microcorys* (EM); flores e folhas de *Lippia alba* (LA) sobre as enzimas e toxinas presentes nas peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Lachesis muta*. Os componentes majoritários do OE de *E.grandis* e *E.microcorys* foram o 1,8 Cineol (55,24% e 57,14% respectivamente); para *Lippia alba* foi o Geranial nas proporções de 38,06 % na folha e 49,83% na flor. Os OE de EG e EM apresentaram atividade trombótica enquanto os de *Lippia* apresentaram efeitos pró-coagulantes sobre o trombo nas doses de 0,6 e 1,2 µL. Os OE de EG e EM aumentaram o tempo de coagulação do plasma humano citrado enquanto que o da flor de *L.alba* diminuiu quando testado *B.moojeni* . Os OE de Eucalipto apresentam uma atividade protetora sobre a hemólise. Sobre a genotoxicidade, os OE de EG apresentaram resultados semelhantes aos controles positivo: 59,8 a 66,0 % de dano (Doxorrubicina 100 µg: 80% de dano; *Lachesis muta* 50µg: 70,5%). Os OE de EM apresentaram frequência de dano menor: 23,9 a 33%. Para LA, os OE apresentaram frequência de dano de 14,4 a 15,4%. Quando testados em conjunto com peçonha de *L.muta*, os OE das folhas protegeram o DNA de leucócitos humanos e apresentaram dano de 11,6 a 34,9%. Os dados obtidos sugerem alto potencial dos óleos avaliados como inibidores enzimáticos, com foco principalmente em fosfolipases, serinoproteases e metaloproteases, que atuam processos relacionados à hemostasia humana.

Palavras-chave: *Eucalyptus*. *Lippia*. Óleo essencial Inibidor enzimático.

GENERAL ABSTRACT

Essential oils (OE) are special plant metabolites biosynthesized from isoprene and have variable biological properties according to their components. The objective of this work was to characterize the components that belong to *Eucalyptus grandis* (EG) and *Eucalyptus microcorys* (EM) EO's leaves and *Lippia alba* (LA) flowers and leaves EO as well. Also to evaluate the cited EO on the enzymes and toxins present in the venoms of *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta*. The major components of EO of EG and EM were Cineol 1.8 (55.24% and 57.14%, respectively); for *Lippia alba* was the Geranial in the proportions of 38.06% in leaf and 49.83% in flower. EG and EM OE presented thrombolytic activity while *Lippia* presented pro-coagulant effects on the thrombus at doses of 0.6 and 1.2 μ L. EG and EM OE increased coagulation time of citrated human plasma while LA flower decreased when *B.moojeni* was tested. *Eucalyptus* EO have a protective activity on hemolysis. On genotoxicity, EG OE presented similar results to positive controls: 59.8 to 66.0% of damage (Doxorubicin 100 μ g: 80% damage; *Lachesis muta* 50 μ g: 70.5%). The OE of EM had a lower frequency of damage: 23.9 to 33%. For LA, OE had a frequency of damage of 14.4 to 15.4%. When tested essential and *L.muta* venom together, leaf OE protected DNA from human leukocytes and presented damage from 11.6 to 34.9%. The data obtained suggest a high potential of the evaluated oils as enzymatic inhibitors, focusing mainly on phospholipases, serinoproteases and metalloproteases, which affect processes related to human hemostasis.

Keywords: *Eucalyptu.*, *Lippia*. Essential oil. Enzyme inhibitor..

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Blocos de construção a partir do Acetil-CoA	20
Figura 2 - Modelo Clássico da Cascata da Coagulação.....	25
Figura 3 - Estruturas do Citral, Carvona e Linalol.	33
Figura 4 - Estrutura química dos principais constituintes do OE de <i>Eucalyptus</i>	35

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1 – Activity on human blood thrombi.....	63
Figura 2 - Effect of EO from <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Eucalyptus microcorys</i> on human erythrocytes lyse.....	64
Figura 3 - Effect of EO from <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Eucalyptus microcorys</i> on DNA from human blood leukocytes. Percentage of nucleoids in the different comet classes corresponding to the varying degradation levels of the DNA molecules.....	65
Figura 4 – Comet assay (single cell gel electrophoresis) in human blood leukocytes.....	66

ARTIGO 2

Figura 1 – Activity on human blood thrombi.....	76
Figura 2 - Effect of <i>Lippia alba</i> flower and Leaf EO on DNA from human blood leukocytes. Percentage of nucleoids in the different comet classes corresponding to the varying degradation levels of the DNA molecules.....	80
Figura 3 - Comet assay (single cell gel electrophoresis) in human blood leukocytes. Demonstrative images of scores observed in different Damage Classes (form 0 to 4).....	81

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Atividades antioxidantes definidas e órgão vegetal escolhido para extração do OE.....21

Tabela 2 - Testes de atividade antioxidante in vitro e in vivo.22

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1 - Chemical constituents of the essential oils of leaves of *Eucalyptus grandis* and *E. microcorys*..... 60

Tabela 2 - Effect of essential oils from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on clotting time of human citrated plasma induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms. 61

Tabela 3 - Effect of EO from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on DNA from human blood leukocytes.....62

ARTIGO 2

Tabela 1 - Chemical constituents of the essential oils of flowers and leaves of *Lippia alba*.....74

Tabela 2 - Effect of essential oils from *Lippia alba* on clotting time of human citrated plasma induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms.....77

Tabela 3 - Effect of *Lippia alba* EO on DNA from human blood leukocytes...79

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 Metabólitos secundários	18
2.2.1 Óleos essenciais	20
2.3 A cascata da coagulação	24
2.4 Atividade fosfolípásica, hemolítica e genotóxica	27
2.5 Avaliação do potencial genotóxico – teste cometa.....	28
2.6 Peçonhas de <i>Bothrops</i> e <i>Lachesis</i>	30
2.7 Aspectos gerais da <i>Lippia alba</i>	32
2.8 <i>Eucalyptus</i> sp.....	34
3. CONCLUSÃO	36
4. REFERÊNCIAS	37
ANEXO	43
SEGUNDA PARTE- ARTIGOS	48
ARTIGO 1 - Essential oils from <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Eucalyptus microcorys</i>: thrombolysis, hemolysis, clotting, fibrinogenolysis and genotoxic activities modulation.....	48
ARTIGO 2 - Essential oils from <i>Lippia alba</i> (leaves and flower): thrombolysis, clotting, and genotoxic activities modulation.....	67

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como matéria prima para obtenção de substâncias bioativas, especialmente fármacos, é amplamente relatada ao longo do tempo. A pesquisa fitoquímica permite o conhecimento de constituintes químicos de espécies vegetais. Para terapêutica os metabólitos secundários são os alvos e estes são constituídos por: cumarinas, polifenóis (flavonoides, taninos e antraquinonas), alcaloides, triterpenos esteroides (saponinas, glicosídeos cardiotônicos) e óleos essenciais.

Os óleos essenciais são misturas complexas de componentes voláteis, de baixo peso molecular (possuem até 15 átomos de carbono) e possuem em geral aroma agradável. Por causa do modo de extração, principalmente por meio de destilação a partir de plantas aromáticas, contém uma variedade de moléculas distintas. Estas são chamadas terpenos e terpenoides e podem ser classificadas como aromáticas ou alifáticas. Ensaio *in vitro* caracterizam a maioria deles como antioxidantes.

Em células eucariotas os óleos essenciais podem atuar como antioxidantes afetam as membranas celulares internas e organelas tais como as mitocôndrias. Dependendo do tipo e concentração, eles apresentam efeitos citotóxicos. As mudanças na disfunção mitocondrial e potencial redox intracelular induzido por óleos essenciais pode ser associado a sua capacidade de exercer efeitos sobre o metabolismo celular. Estas constatações sugerem que, pelo menos em parte, há efeitos benéficos dos óleos essenciais.

Pesquisas etnofarmacológicas e emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular favorecem a diminuição do tempo gasto no desenvolvimento de novos medicamentos. Testes *in vitro* e *in vivo* podem avaliar preconizar e validar o uso de óleos essenciais e

outros metabólitos de plantas medicinais na terapêutica. Seja ela a terapêutica para doenças infectocontagiosas de base populacional, como a AIDS; ou crônico-degenerativa como Diabetes, Câncer ou Alzheimer. Quando se otimiza o tempo gasto no desenvolvimento de fármacos, reduz o número de mortes evitáveis e amplia os lucros gerados à indústria farmacêutica. Estas são boas justificativas para motivação de centros de pesquisa nesta direção.

No contexto de caracterização fármaco-toxicológica de produtos naturais, peçonhas e toxinas isoladas são ferramentas valiosas uma vez que induzem diversos efeitos e permitem simular a ação de moléculas vegetais sobre a atividade de enzimas animais. Muitas enzimas presentes nas peçonhas, principalmente de serpentes, são altamente homólogas em estrutura e funcionalidade a enzimas presentes no organismo humano.

As diferentes espécies de serpentes, embora possam apresentar peçonhas com composição similar em relação às classes de enzimas presentes, apresentam variações nas concentrações enzimáticas (ex: serinoproteases, metaloproteases, hialuronidases, fosfolipases A_2 e L-aminoácido oxidase), podendo ser empregadas, por exemplo, para a indução de edema, hemorragia, miotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, coagulação e proteólise de substratos específicos.

Inúmeras plantas têm sido descritas como antiofídicas e mais recentemente, as propriedades antiofídicas e, portanto, de inibição sobre enzimas têm sido descritas para óleos essenciais. Alguns estudos reportam produtos naturais como adjuvantes à soroterapia tradicional, enquanto outros exploram as propriedades inibidoras dos compostos vegetais sobre as toxinas visando estimar a ação destes sobre a funcionalidade de enzimas humanas relacionadas a diversas patologias.

Diante deste contexto, propõe-se no presente trabalho, investigar a ação de óleos essenciais de *Lippia* e *Eucalyptus* sobre atividades induzidas por enzimas (fosfolipases A_2 e proteases), presentes em peçonhas de serpentes sobre células e moléculas humanas, que atuam de forma similar a enzimas humanas, buscando assim inibidores enzimáticos com aplicação farmacêutica na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à funcionalidade destas classes de enzimas (ex: PLA_2 relacionada a artrites, câncer, aterosclerose, sepse e doenças neurodegenerativas; proteases relacionadas a doenças metabólicas, inflamatórias e funcionais do trato gastrointestinal, trombooses e demais doenças relacionadas a alterações na homeostasia

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

A diversidade molecular de produtos de origem natural é mais ampla que os de origem sintética. O uso tradicional de plantas por populações de todos os continentes no controle de doenças e pragas pôde ser reforçado pela tecnologia que permitiu isolamento e elucidação estrutural de diversas moléculas. Ao considerarmos as perspectivas de obtenção de novos fármacos é necessário considerar as dificuldades relativas ao isolamento de moléculas de produtos naturais. Atribuir a uma única molécula uma atividade biológica observada é arriscado quando se trata de produto natural. Entretanto alguns representam modelos para síntese de fármacos que, com ajustes moleculares, podem apresentar melhorias em seu desempenho. O aumento de atividade não é o único alvo da semissíntese, mas também alterações no perfil farmacocinético e farmacodinâmico (BAJRACHARYA, 2015).

As plantas produzem muitos e diversificados compostos orgânicos, a grande maioria dos quais não parecem participar diretamente do crescimento e desenvolvimento das mesmas. Estas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, são diferencialmente distribuídas entre grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Suas funções na planta muitas vezes permanecem desconhecidas e estão sendo elucidados com frequência crescente.

Embora ocorra uma ampla e complexa diversidade de vias biossintéticas e estruturas químicas, os produtos naturais têm sido investigados para as mais diversas atividades biológicas. Estas atividades que podem também ser entendidas como aplicabilidade se estendem desde uso como agentes inseticidas, pesticidas, e alelopáticos – na agricultura, por exemplo, até ao uso em produtos alimentícios na tentativa do aumento do tempo de vida útil de

produtos alimentícios por apresentarem atividade antimicrobiana (ANDRADE et al., 2015).

Para aplicações no ramo farmacêutico as atividades investigadas são ainda mais diversas, havendo aplicações na prevenção e tratamento do envelhecimento assim como de uma imensa variedade de doenças com as mais variadas origens, como por exemplo, infecciosa, parasitária, inflamatória e metabólica.

O uso das plantas em cosmetologia fez aparecer uma terminologia específica para designar o ramo que trata do estudo e da utilização de substâncias de origem vegetal empregadas para manutenção e promoção da beleza da pele, a fitocosmética. O fitocosmético tem sido cada vez mais procurado pelo consumidor na busca pelo natural (ANDRADE et al., 2015). Assim pode-se afirmar que produtos naturais têm alimentado a busca de novos medicamentos, cosméticos, conservantes alimentícios e pesticidas entre outros.

Devido às diferenças e propriedades entre a droga bruta, seca, em pó, na forma de tinturas ou extratos secos e os compostos ou moléculas isoladas ou sintetizadas a partir de modelos vegetais, é importante que sejam reconhecidos dois segmentos de mercado: um voltado para as substâncias isoladas e outro para a droga vegetal, contendo compostos de ação sinérgica. Esse reconhecimento requer o delineamento do potencial de cada mercado, assinalando o conhecimento, a ciência e tecnologias próprias de cada um, assim como uma análise detalhada da demanda social. Sendo a indústria farmacêutica uma das grandes financiadoras da pesquisa, principalmente em desenvolvimento de novas drogas a partir de matéria-prima vegetal, há um comportamento de busca por um princípio ativo que seria responsabilizado pela ação farmacológica. É válido afirmar, portanto, que a ausência de uma política para a inovação na área dos medicamentos de origem vegetal (fitomedicamentos) possivelmente seja responsável pelo fato de que apesar de toda produção científica realizada a partir

da segunda metade do século passado, os esforços não resultaram necessariamente em desenvolvimento tecnológico e menos ainda em novos produtos, novos medicamentos. O Brasil tem quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante. Entretanto, muito pouco tem sido realizado para transformar esse potencial em vantagem competitiva, em produtos patentes, principalmente se considerarmos o desenvolvimento como forma de inserção social e de proteção e manutenção desses ecossistemas (ANTÔNIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

Na última década, a química combinatória se tornou a principal fonte de novas entidades químicas envolvidas com a descoberta de novos fármacos. Entretanto, apesar da velocidade intensificada da síntese, a mudança dos métodos tradicionais não resultou num incremento real do número de fármacos ou de modelos atraentes. Os produtos naturais, tradicionalmente têm sido a maior fonte de novos fármacos. Diversos fármacos que se consagraram medicamentos industrializados foram resultantes de sínteses direcionadas para reproduzir a ação das moléculas achadas na natureza. Os compostos naturais, além de diversos, são extremamente específicos nas suas atividades biológicas. Essa característica decorre do fato de que, praticamente, todos eles terem alguma capacidade de se ligar a receptores. As moléculas naturais se diferem bastante daquelas sintetizadas (LIMA, 2007).

É importante ressaltar que esta apreciação crescente dos diversos efeitos biológicos produzidos por produtos naturais tenha requerido uma reavaliação dos possíveis papéis que estes compostos desempenham nas plantas, especialmente no contexto de interações ecológicas.

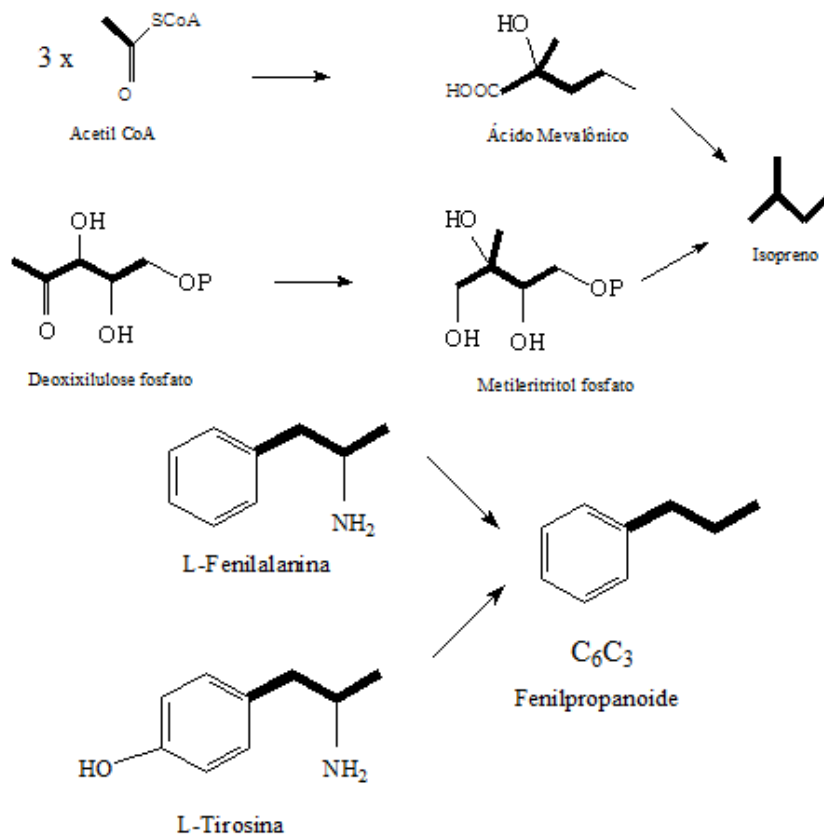
2.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos primários são definidos como os fornecedores de matéria-prima e de energia para formação dos metabólitos secundários, também

definidos como metabólitos especiais. Vegetais, microrganismos e animais apresentam arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Os produtos do metabolismo secundário não são essenciais para o organismo produtor mas, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema. Dentre eles podemos citar os alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, heterosídeos cardíacos, óleos essenciais, ligninas, gomas e mucilagens (GOTTLIEB et al., 1998).

As vias de síntese dos metabólitos secundários são ativadas durante estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causado por limitações nutricionais, estresse hídrico, herbivoria, radiação ultravioleta, altitude, estímulos mecânicos entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A ontogenia, a ontologia e ontogenética parecem interferir na síntese destes metabólitos, e podem sofrer modulação por fatores ambientais. Em estudos de cultura de tecido vegetal *in vitro*, plantas geneticamente iguais produzem diferentes constituintes e em diferentes proporções em seus óleos essenciais frente a diferentes fornecimentos de CO₂ e qualidade de luz (BATISTA et al., 2016). Estes estudos facilitam a compreensão sobre o funcionamento das rotas metabólicas e permitem um melhor entendimento acerca do balanço energético do metabolismo vegetal.

Os metabólitos secundários podem ser sintetizados através da combinação de vários blocos de construção do mesmo tipo, ou usando uma mistura de blocos de construção diferentes (Figura 1). Isso amplia a diversidade estrutural, e, conseqüentemente, faz subdivisões inteiramente baseado em vias biossintéticas. A saber, as vias biossintéticas utilizadas são denominadas via Acetato, via Chiquimato, e Deoxixilulose (DXP).

Figura 1 - Blocos de construção a partir do Acetil-CoA

Fonte: Do autor.

2.2.1 Óleos essenciais

De acordo com a Farmacopeia Europeia 8ª edição, os óleos essenciais (OE) são definidos como: “Produto odorífero, geralmente de uma composição complexa, obtido a partir de uma matéria-prima vegetal botanicamente definida, quer por condução por vapor de água, quer por destilação seca ou por um método mecânico sem aquecimento adequado. Os OE são chamados comercialmente de produtos deterpenizados e desesquiterpenizados, retificado ou privado de algum componente (ASBAHANI et al., 2015). Apresentam na

maioria das vezes densidade menor que a água e são geralmente lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos, não miscíveis em água e os rendimentos de extração podem variar dependendo de espécies e órgãos. “Estes óleos são geralmente separados da fase aquosa por um método físico que não causa mudanças significativas em sua composição química”.

OE podem ser biossintetizados como metabólitos secundários em diferentes órgãos da planta, tais como, flores (ex: jasmim, rosa, violeta e lavanda), brotos (ex: cravo), folhas (ex: tomilho, eucalipto e sálvia), frutas (ex: anis e anis estrelado), galhos, casca (ex: canela), raspas (ex: citrus), sementes (ex: cardamomo), madeira (ex: sândalo), rizoma e raízes (ex: gengibre).

Muitos trabalhos possuem a atividade antioxidante dos OE investigadas, porém nem todos possuem o mesmo órgão vegetal coletado (folha, raízes, partes aéreas, flores, frutos, casca); alguns possuem igualmente métodos de análise antioxidante diferentes. Podem não compartilhar dos mesmos métodos de coleta e secagem do material vegetal, assim como não compartilham os métodos de extração e investigação de atividade antioxidante (Tabela 1).

Tabela 1- Atividades antioxidantes definidas e órgão vegetal escolhido para extração do OE.

Vegetal	Órgão	Autores
<i>Lippia javanica</i>	Folhas	(ENDRIS; ASFAW; BISRAT, 2016).
<i>Artemisia absinthium</i>	Flores e folhas	(RIAHÍ et al., 2013).
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Partes aéreas	(YAGI et al., 2016).
<i>Cyperus rotundus</i>	Rizoma	(YAGI et al., 2016)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Frutos	(BEY-OULD SI SAID et al., 2016).
<i>Eucalyptus globulus</i>	Folhas	(HAFSA et al., 2016).

Fonte: Do autor.

Alguns autores afirmam que a atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de teste. Os modelos de testes antioxidantes variam em diferentes aspectos, portanto, é difícil comparar e

estabelecer uma correlação de um método para outro. Geralmente testes antioxidantes *in vitro* utilizando armadilhas de radicais livres, são relativamente simples de executar. Entre os métodos de eliminação de radicais livres, os autores citam o método de DPPH. Definem este como rápido, simples (isto é, que não estão envolvidos com muitos passos e reagentes) e barato em comparação com outros modelos de ensaio. Por outro lado o ensaio de descoloração do ABTS é aplicável em ambos os antioxidantes, hidrófilos e lipofílicos (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Alguns dos métodos de teste antioxidante *in vitro* e *in vivo* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Testes de atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Atividade de sequestro de DPPH	Capacidade redutora do Ferro no plasma
Atividade sequestradora de óxido nítrico	Glutaciona reduzida (GSH)
Eliminação de peróxido de Hidrogênio	Glutaciona peroxidase (GSHPx)
Ensaio de dieno conjugado	Glutaciona-S-Transferase (GST)
Atividade sequestradora de radicais peroxinitrito	Superóxido Dismutase (SOD)
DMPD (N, N-dimetil-p-fenileno diamina)	Catalase (CAT)
Ensaio descoloração radical ABTS	Atividade transpeptidase c-glutamil transferase (GGT)
Capacidade de absorção de radical Oxigênio (ORAC)	Glutaciona redutase (GR)
Capacidade absorção radical Hidroxila (HORAC)	Peroxidação lipídica (LPO)
Método fosfomolibdênio	Ensaio de LDL

Fonte: Adaptado de ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013.

Alguns OE extraídos das espécies listadas na Tabela 2 possuem estudos que avaliam atividades farmacológicas is como: atividade antiinflamatória (LEYVA-LÓPEZ et al., 2016), antinociceptiva (SIMÕES et al., 2017), anticonvulsivante (SOUTO-MAIOR et al., 2017), antifúngica (IBRAHIM et al., 2017), antimicrobiana (KWON; CHANG; HAN, 2017), leishmanicida

(ISLAMUDDIN et al., 2016), hipoglicêmica (BOUKHRIS et al., 2012), antiviral, antirretroviral e imunomoduladora (KRIFA et al., 2015), antitumoral (DERVIS et al., 2017), genotóxica (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2016), moduladora de expressão de gênica (TEPE; CAKIR; SIHOGLU TEPE, 2016) entre outras.

As atividades antioxidantes detectadas quase sempre demonstram potencial anti-inflamatório, antitumoral, antifúngico, antiviral, etc. Quase que em sua totalidade, as plantas possuem seus óleos essenciais caracterizados, com seus componentes e proporções definidas. Estes OE possuem avaliadas suas propriedades antioxidantes por diferentes métodos, entretanto não possuem suas características biológicas completamente elucidadas. O comportamento antioxidante de compostos fenólicos é de compreensão fácil. Entretanto recentemente pôde-se observar o mesmo para componentes não fenólicos presentes em OE.

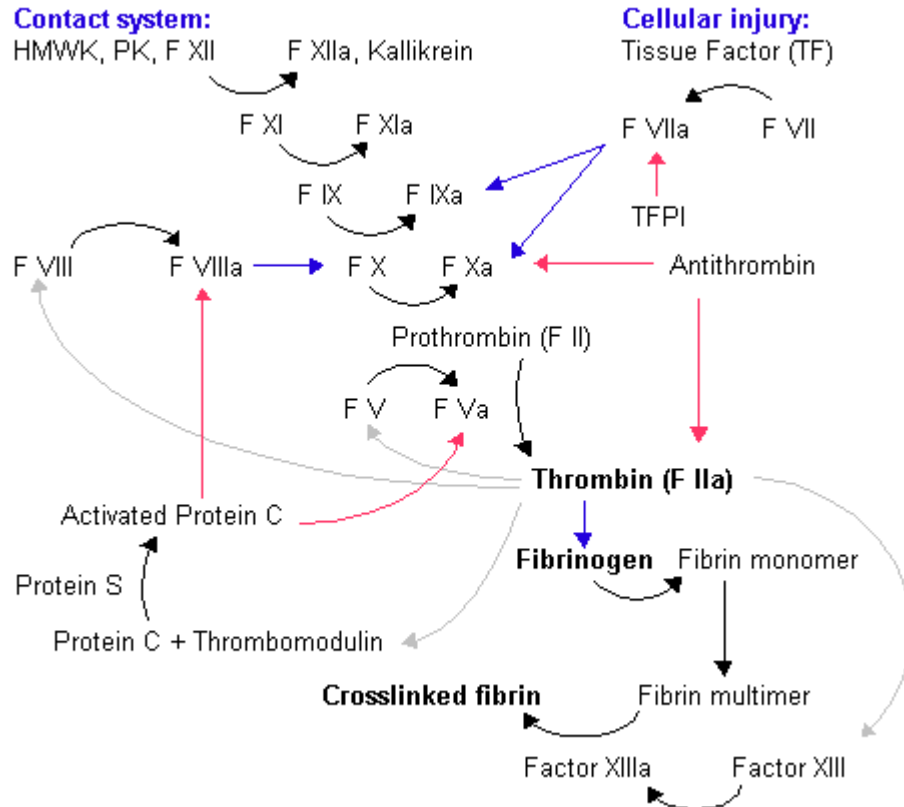
Alguns dos componentes dos OE como, por exemplo, o Carvacrol possuem ampla variedade de propriedades biológicas e farmacológicas. Tais propriedades se justificam pela atividade antioxidante que apresentam de forma isolada ou em proporções diferentes no OE. Testes *in vivo* demonstram que há proteção hepática induzida por pancreatite aguda através de resposta antioxidante do Carvacrol isolado do OE de tomilho (*Thymus vulgaris*). O referido trabalho avalia as enzimas hepáticas Alanina Transaminase (ALT), Aspartato Transaminase (AST) e níveis de Lactato Desidrogenase (LDH) após indução de pancreatite aguda pela ingestão de Ceruleína pelos camundongos. Estas três enzimas costumam ter níveis séricos aumentados em caso de pancreatite, o que não ocorreu na presença do Carvacrol em doses de 50, 100 e 200mg/Kg. Marcadores de estresse oxidativo no fígado foram ainda quantificados em peróxidos de lipídeos medidos como Malondialdeído. As enzimas antioxidantes no tecido que tiveram suas atividades aumentadas na

presença de Carvacrol foram Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Fosfolípídeo-hidroperóxido de glutathiona peroxidase (GSH-Px). O dano oxidativo ao DNA foi medido pela 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), que teve sua expressão diminuída (BAKIR et al., 2016).

Estes achados evidenciam como podem ocorrer modulações enzimáticas *in vivo* diferentes do que se pode alcançar em testes *in vitro*. Entretanto, o desempenho em alterar um comportamento enzimático em um organismo vivo, complexo, parece se dar por um efeito sinérgico entre os diversos constituintes presentes. Mesmo aqueles que estiverem presentes em proporções centesimais parecem participar de forma sinérgica e complementar das atividades dos OE quando investigados quanto a propriedades antimicrobianas e em outras formas terapêuticas como doenças do sistema nervoso, autismo, bronquite crônica e reforço imunológico (HARRIS, 2002; SHUTES, 2016).

2.3 A cascata da coagulação

A coagulação do sangue é apresentada e estudada para fins didáticos em um modelo de cascata, o que evidencia sua ocorrência em meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina (Figura 2). Tal proposta divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X.

Figura 2 - Modelo Clássico da Cascata da Coagulação.

Legenda: HMWK = Cininogênio de Alto Peso Molecular, PK= Precalicroína, TFPI = Inibidor do Fator Tissular. Seta preta= conversão/ativação de fatores. Seta vermelha = ação dos inibidores. Seta Azul= reações catalisadas por fatores ativados. Seta Cinza= várias funções da trombina.

Fonte: CHIKUMAYA (2017).

Há ainda uma proposta de entendimento deste modelo baseada em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Neste novo modelo, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de fator tecidual na corrente sanguínea. O fator tecidual (FT) não é expresso constitutivamente nas células

endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Dessa forma, o FT é exposto na circulação sanguínea pela lesão endotelial e de células vizinhas ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos. Este novo modelo da hemostasia, baseado em superfícies celulares, é capaz de explicar alguns aspectos clínicos do mecanismo hemostático que o modelo clássico da cascata não permite. Este modelo propiciou um melhor entendimento do processo da coagulação *in vivo*, e apresenta maior consistência com as observações clínicas de vários distúrbios da coagulação (FERREIRA et al., 2010).

As Proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. O processo é chamado de clivagem proteolítica é um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvidas na coagulação sanguínea.

Estudos descrevem a atividade dos OE frente à cascata da coagulação. Enquanto alguns OE podem aumentar o tempo de formação do coágulo em testes *in vitro*, outros parecem apresentar efeito pró-coagulante. Os resultados das avaliações indicam a presença de interações dos componentes dos óleos com constituintes do plasma de sangue humano assim como com toxinas (enzimas proteolíticas e coagulantes presentes em peçonhas). Os OE estudados, principalmente àqueles óleos que apresentaram altos teores de sesquiterpenos, também apresentaram ação protetora sobre a proteólise de moléculas de fibrinogênio induzida por peçonhas de serpentes (*L. muta.*, *B. moojeni* e *B. atrox*), quando avaliados em SDS-PAGE, provavelmente por meio de ligação à estrutura do fibrinogênio impedindo o acesso das proteases ofídicas (MIRANDA et al, 2016).

2.4 Atividade fosfolípica, hemolítica e genotóxica

O uso irracional de medicamentos é um grande problema em todo o mundo. OMS estima que mais de metade de todos os medicamentos são prescritos, dispensados ou vendidos de forma inadequada, e que metade dos pacientes não conseguem levá-los corretamente. O uso excessivo, subutilizado ou mal uso de medicamentos resulta em desperdício de recursos escassos e perigos generalizados para a saúde (CHATURVEDI; MATHUR; ANAND, 2012).

A aplicação de produtos naturais como medicamentos está igualmente sujeita a aplicação racional baseando na escolha correta dos princípios ativos, excipientes e veículos, bem como na administração e posologia adequados. O uso de fitoterápicos e suplementos aumentou ao longo das últimas três décadas pelo menos 80% em todo o mundo – principalmente para cuidados de saúde primários. Embora as terapias que envolvem estes agentes mostram potencial promissor quanto a eficácia, um bom número de produtos fitoterápicos permanecem não testados e seu uso é mal monitorado ou permanece sem monitorização alguma. A consequência disso é um conhecimento inadequado de seu modo de ação, potenciais reações adversas, contraindicações e interações com produtos farmacêuticos ortodoxos existentes e alimentos funcionais para promover o uso seguro e racional desses agentes (EKOR, 2014).

Estudos que investigam a toxicidade de produtos naturais e sintéticos iniciam-se em pesquisa básicas como a avaliação de atividades fosfolipásica, hemolítica e genotóxica. A modulação enzimática alterada por componentes de produtos naturais indica possíveis interações dos mesmos *in vitro* e permite fornecer experimentos *in vivo* melhor planejados e maior segurança para saúde humana (MCKIM, 2014).

A fosfolipase é uma enzima que hidrolisa fosfolipídeos em ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. Existem quatro classes principais, denominadas A, B, C e D, que se distinguem pelo tipo de reação que catalisam. A PLA₂ é uma enzima presente, por exemplo, em peçonhas de artrópodes e serpentes. Ela e outras toxinas presentes nas peçonhas podem ser inibidas por diferentes moléculas que variam em sua natureza, incluindo agentes químicos sintéticos ou naturais de origem animal e vegetal. Por exemplo, a heparina sintética de baixo peso molecular, o brometo de p-bromofenacila, a tetraciclina, os anticorpos mono/ policlonais, os flavonoides e alcaloides naturais extraídos de plantas e moléculas provenientes de organismos marinhos são inibidores de PLA₂ ofídicas (EKOR, 2014).

As Fosfolipases A₂ catalisam especificamente a hidrólise da ligação 2-acil éster de glicerofosfolipídeos em membranas celulares, resultando em lisofosfolípides e ácidos graxos tais como ácido araquidônico. Estes metabolitos agem principalmente como precursores de mediadores inflamatórios (eicosanoides), com importância nas vias de sinalização intracelular tais como transmissão neuronal, mitogênese, contração do músculo liso e ativação plaquetária. Por sua importância em eventos inflamatórios, esta família de proteínas também é estudada em doenças autoimunes e inflamatórias (DENNIS et al., 2011; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

2.5 Avaliação do potencial genotóxico – teste cometa

A genotoxicidade ou toxicologia genética é uma especialidade que se ocupa da identificação e estudo da ação de qualquer agente físico, químico ou biológico que produz efeitos tóxicos sobre o material genético. Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de

serem transmitidas, denominam-se *mutações*. As *mutações*, fonte de variabilidade genética de uma população, são fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto nos indivíduos como nos seus descendentes. Nas populações, podem aumentar a incidência de câncer, doenças hereditárias e do coração, bem como aumentar a virulência de patógenos (DORN et al., 2008).

Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas (água, solo, ar); são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas. Compreender os mecanismos de replicação de resposta ao estresse após a indução de estresse genotóxico está emergindo rapidamente como um tema central na sobrevivência celular e doenças humanas (QUINET et al., 2017).

A introdução do conceito de eletroforese de microgel de DNA combinado com microscopia de fluorescência permitiu visualizar a migração de cadeias de DNA de células individuais incorporadas em agarose. Se houver rupturas no DNA carregado negativamente, as superespirais de DNA são relaxadas e suas extremidades quebradas migram para o ânodo durante eletroforese. Se o DNA não estiver danificado, a falta de extremidades livres e o grande tamanho dos fragmentos impede a migração. A determinação da quantidade relativa de DNA que migra proporciona uma maneira simples de medir o número de rupturas de DNA numa célula individual.

O procedimento para o ensaio cometa baseado em eletroforese em gel que pode ser usado para células eucarióticas individuais. É versátil, relativamente simples de executar e sensível. Embora a maioria das investigações faça uso de sua capacidade de medir rupturas de DNA de uma única cadeia, as modificações no método permitem a detecção de quebras de dupla cadeia de DNA, formação de retículos, danos de base e núcleos

apoptóticos. O limite de sensibilidade é de aproximadamente 50 rupturas de cadeia por célula diploide de mamífero. Os danos no DNA e sua reparação em suspensões de células únicas preparadas a partir de leveduras, protozoários, plantas, invertebrados e mamíferos também podem ser estudadas utilizando este ensaio. O método também pode ser usado para medir variações em resposta a agentes danificadores de DNA entre células da mesma população exposta (OLIVE; BANÁTH, 2006).

2.6 Peçonhas de *Bothrops* e *Lachesis*

Entre 2009 e 2013, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu o envenenamento por serpentes entre as doenças tropicais negligenciadas devido ao grande número de acidentes, à complexidade da condição clínica e ao fato de que a população mais afetada é constituída principalmente por trabalhadores de comunidades rurais pobres (WHO, 2012). Especialistas em Toxinologia relatam que a cada ano ocorrem aproximadamente 421.000 casos de ofidismo, dos quais cerca de 20.000 resultam em morte (BAGCCHI, 2015).

O gênero *Bothrops* spp. pertencente a família Viperidae, enquadra serpentes denominadas popularmente de jararacas. É responsável por 90% dos envenenamentos ofídicos no Brasil, e o tratamento padrão é a soroterapia. O soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantan é preparado pela hiperimunização de cavalos com um ‘pool’ de peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* (QUEIROZ et al., 2008). Os envenenamentos são caracterizados por efeitos locais proeminentes, incluindo edema, hemorragia e necrose, que podem levar a incapacidade permanente. Manifestações sistêmicas como hemorragia, coagulopatia, choque e

insuficiência renal aguda, também podem ocorrer (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010).

Há ampla gama de variação na composição destas peçonhas. As peçonhas, particularmente de serpentes Crotalidae e Viperidae, são fontes ricas em serinoproteases e metaloproteases. Os componentes proteicos presentes nestas peçonhas incluem citotoxinas, cardiotoxinas, factores de crescimento nervoso, lectinas, inibidores enzimáticos e várias enzimas, tais como fosfolipase A₂ (PLA₂), metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácidos oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases, etc. (SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017).

Encontra-se em literatura a descrição de diversas serinoproteases como, por exemplo, a BmoosP isolada de peçonha de *B. moojeni*. Esta enzima induz coagulação sanguínea *in vitro* e desfibrilação *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2016). Os autores deste estudo afirmam que esta enzima pode ser usada como cola de fibrina biodegradável e para o tratamento e prevenção de distúrbios cardiovasculares devido à sua capacidade para promover a desfibrilação *in vivo*, diminuindo a viscosidade do sangue e melhorando a circulação sanguínea.

As serpentes pertencentes ao gênero *Lachesis* habitam áreas florestadas tropicais na América do Sul e Central. Elas são popularmente conhecidas como ‘surucucu’ no Brasil (ALVES; ARGÔLO; CARVALHO, 2014; OTERO-PATIÑO, 2014).

Os envenenamentos por *Lachesis muta* são caracterizados por intensa dor local, edema, neurotoxicidade, hipotensão, hemorragia local e alterações sistêmicas. Vários destes sintomas são sugestivos de estimulação parasimpática autônoma (muscarínica) (DIAS et al., 2016). O tratamento com soro antiofídico tem sido regularmente utilizado há mais de um século, entretanto, não neutraliza lesões teciduais locais e hemorragia, levando à morbidade ou deficiência nas vítimas. Assim, inúmeros estudos ainda buscam melhorias na produção e uso

clínico do soro. Santos-Filho e Santos (2017) relatam busca por moléculas que possam ajudar na neutralização de diferentes tipos de fosfolipases A₂ e miotoxinas, visando a complementação da soroterapia convencional.

2.7 Aspectos gerais da *Lippia alba*

O gênero *Lippia* é um dos 41 gêneros de plantas que pertencem a Família Verbenaceae Juss. Compreende cerca de 200 espécies distribuídas por toda a África tropical, bem como na América Central e do Sul. O Brasil estima ser o hospedeiro de 70 a 75% das espécies conhecidas. São usadas mundialmente como alimento, bebidas, temperos e remédios, para tratar problemas gastrintestinais e respiratórios (tosse, resfriados e asma), infecções pulmonares, disenteria e diarreia, como analgésico, anti-inflamatório e antipirético. É também empregada pelas suas propriedades sedativa, carminativa, analgésica, espasmolítica e emenagoga (OMBITO et al., 2014).

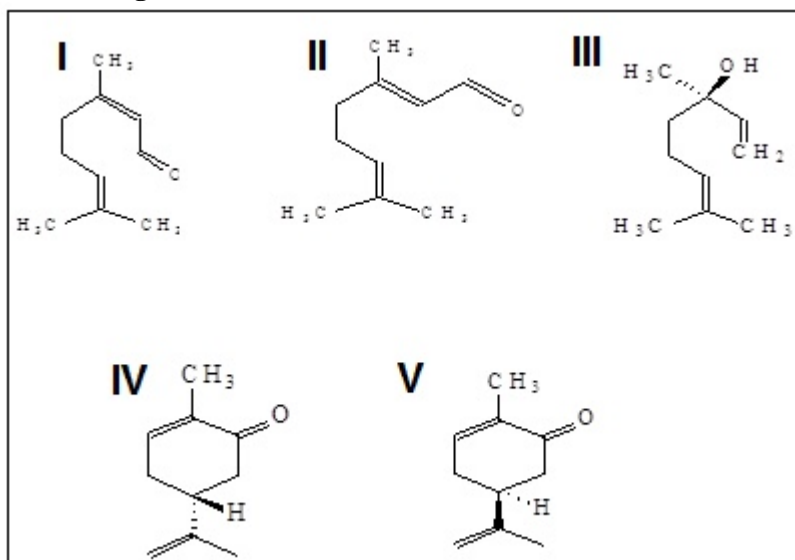
Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é uma erva nativa da América do Sul cujos atributos medicinais foram reconhecidos desde 1882 (HENNEBELLE et al., 2008). As espécies estudadas apresentaram tanto OE quanto óleo fixo, ambos extraídos das folhas de *L. alba*. Para os OE os constituintes majoritários segundo OMBITO et al. (2014) foram geranial e carvenona. Estes autores investigaram a presença de três iridoides, geniposideo, éster metílico e shanzizida e relatam ainda a presença de dois biflavonoides.

Estudos fitoquímicos das espécies de *Lippia* se concentraram na química dos constituintes voláteis, havendo, portanto informações limitadas sobre os metabólitos secundários não voláteis. De acordo com esses autores, os metabólitos não voláteis mais significativos produzidos por espécies de *Lippia* incluem terpenos (alguns sesquiterpenos, di- e triterpenos), flavonoides, fenóis, glicosídeos de iridoides, fenilpropanoides e naftoquinonas. Estes compostos

podem estar presentes na forma glicosilada, nos quais o composto é ligado a uma ou mais porções de açúcar, geralmente a glicose.

A composição de seu óleo essencial apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando à separação em quimiotipos, os quais poderiam apresentar atividades farmacológicas distintas (VALE et al., 2002; KRÜGER, 2010). Os autores relatam três quimiotipos tendo cada um diferente componente majoritário de acordo com local de cultivo. Estes são citral, carvona e linalol (Figura 3), provenientes dos estados do Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo (TAVARES et al., 2005). O óleo foi extraído em fase de floração e em fase de crescimento vegetativo após um ano de cultivo em mesmas condições e os autores constataram que há maior rendimento fora do período de floração.

Figura 3 - Estruturas do Citral, Carvona e Linalol.



Legenda: I. Neral ou Citral B ou Cis-Citral; II. Geranial ou Citral A ou trans-Citral; III. Linalol; IV. S-Carvona; V. R-Carvona.

Fonte: Do autor.

Em estudos *in vitro* a qualidade de luz parece afetar o crescimento e o perfil da produção de OE pela *L. alba*. Os autores relatam diferentes proporções de eucaliptol e linalol quando utilizadas lâmpadas LED azul/vermelho após 40 dias de cultivo. Também Constataram que a qualidade da luz e o quimiotipo interferem de forma positiva no perfil de OE e demais componentes voláteis (BATISTA et al., 2016).

2.8 *Eucalyptus* sp

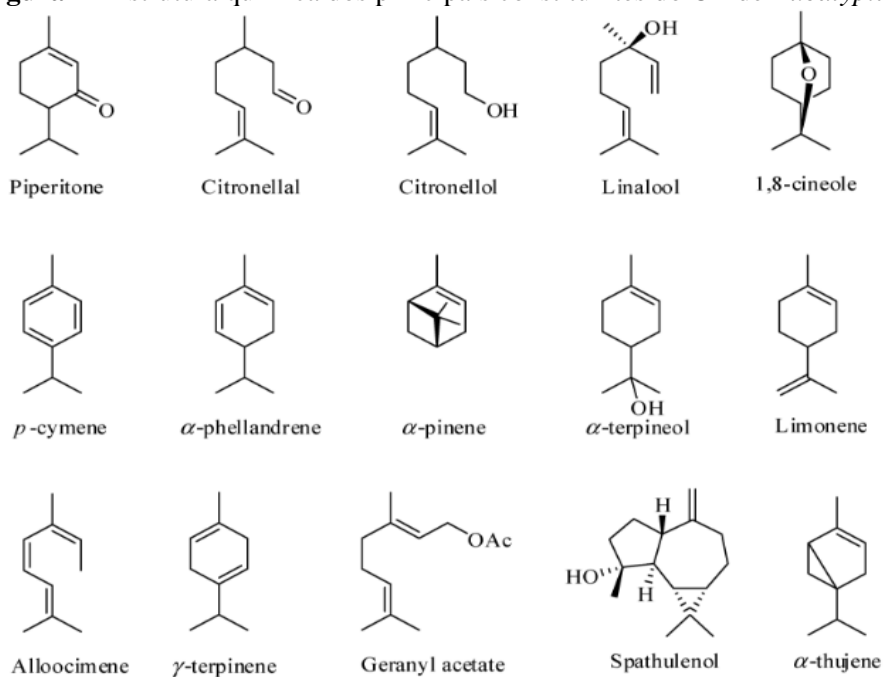
Eucalyptus é um gênero de plantas da família *Myrtaceae* que agrupa as espécies conhecidas pelo nome popular de eucalipto, ainda que o nome se aplique a outros gêneros de mirtáceas como algumas espécies arbóreas dos gêneros *Corymbia* e *Angophora*. São, em termos gerais, árvores e, em alguns raros casos, arbustos, nativas da Austrália e Oceania, onde constituem o gênero dominante da flora. As espécies de eucalipto são cultivadas para fins florestais e têm notável importância econômica (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; MARTÍNEZ et al., 2013; LIMA et al., 2010).

A pasta de celulose produzida a partir deste vegetal leva a fabricação de carvão vegetal, papel e madeira. Assim há grande interesse econômico, embora haja questionamentos sobre a destruição de plantas nativas nos locais de cultivo e diminuição da fertilidade dos solos (PINCELLI; SEIXAS; NUNES, 2014; SPINELLI et al., 2016).

Segundo Bizzo e colaboradores (2009), os benefícios para a saúde do óleo de eucalipto são bem conhecidos e abrangentes, e suas propriedades medicinais incluem propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódicas, descongestionantes, desodorantes, antissépticas, antibacterianas, estimulantes, antifúngicas entre outras. Descrevem o óleo essencial do eucalipto como líquido incolor e com sabor e odor distintivos.

A maioria dos OE de espécies de eucalipto é rica em monoterpenos e muitos têm encontrado aplicações em produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromatizantes de alimentos e perfumes. É obtido de suas folhas frescas e seus constituintes majoritários são α -pineno, cineol e citronelal (Figura 4), entretanto pode apresentar maior variabilidade entre os demais constituintes (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016). Estes autores afirmam encontrar das 900 espécies de *Eucalyptus*, 68 estudadas em 27 diferentes países.

Figura 4 - Estrutura química dos principais constituintes do OE de *Eucalyptus*.



Fonte: Adaptado de BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA (2016).

Parece haver um padrão de oxigenação dos monoterpenos de acordo com a espécie. Das espécies cultivadas no Brasil, há um predomínio de monoterpenos não oxigenados nas espécies *E. salicena*, *E. robusta*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. pilularis*, e *E. urograndis*. As espécies produtoras de óleos

com maior teor de monoterpenos oxigenados são *E. microcorys*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* (FILOMENO et al., 2016). Entre os monoterpenos oxigenados encontrados nos óleos de eucalipto, o mais comercialmente valorizado é o 1,8-cineol, devido às suas propriedades medicinais. Para fins de aplicação medicinal, os óleos devem ter pelo menos 33% de 1,8-cineol. Este é também conhecido como Eucaliptol.

Desta forma torna-se relevante investigar o desempenho dos óleos essenciais de plantas nativas e exóticas como *Lippia* e Eucalipto sobre seu desempenho *in vitro* frente a toxinas presentes em peçonhas e sua atividade na interação com células sanguíneas humanas e seu processo de coagulação.

3. CONCLUSÃO

Os dados obtidos sugerem alto potencial dos óleos avaliados como inibidores enzimáticos, com foco principalmente em serinoproteases e metaloproteases, que atuam em diversos processos relacionados à homeostasia humana. As doses testadas: 0,05 a 1,2 μL não induziram hemólise, e ainda os óleos de *Eucalyptus* spp. apresentaram efeito protetor. Considerando a degradação do DNA, o óleos de *Eucalyptus grandis* apresentaram efeitos semelhantes ao da Doxorubicina enquanto o óleo do *E. microcorys* apresentou menor dano.

Para os óleos de *L. alba* houve proteção DNA no que tange ao dano causado pela peçonha de *L.muta* nas dose de 0,5 a 1,2 μL . O óleo da flor no teste trombolítico promoveu a inibição enzimática de forma pronunciada quando usada a peçonha de *B. moojeni* .

Os produtos naturais são em linhas gerais menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente, mais desejáveis para uso interno e de boa aceitação comercial, sendo os óleos avaliados promissores para compor formulações terapêuticas.

4. REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity, **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21, n.2, p.143–152, abr., 2013.
- ALVES, F. Q.; ARGÔLO, A. J. S.; CARVALHO, G. C. Reproductive biology of the bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v.13, n.2, p.99, dez., 2014.
- ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 1, p.189–194, mai., 2015.
- ANTÔNIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Revista de Saúde Pública**, v.48, n.3, p.541–553, jun. 2014.
- ASBAHANI, A. E. L., et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 83, n.1–2, p 220–243, abr., 2015.
- BAGCCHI, S. Experts call for snakebite to be re-established as a neglected tropical disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p.5313, out., 2015.
- BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133–152, mar., 2015.
- BAKIR, M. et al. The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response, **Cytotechnology**, v.68, n.4, p.1131–1146, ago., 2016.
- BARBOSA, L.; FILOMENO, C.; TEIXEIRA, R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. **Molecules**, v.21, n.12, p.1671, dez., 2016.
- BATISTA, D. S. et al. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.52, n.3, p.276–282, jun. 2016.

BEY-OULD SI SAID, Z. et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits, **Industrial Crops and Products**, v.89, p.167–175, out., 2016.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588–594, 2009.

BOUKHRIS, M. et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. in alloxan induced diabetic rats, **Lipids in Health and Disease**, v.11, n.1, p.81, jun., 2012.

CHATURVEDI, V. P.; MATHUR, A. G.; ANAND, A. C. Rational drug use – As common as common sense?. **Medical Journal Armed Forces India**, v.68, n.3, p.206–208, jul., 2012.

CHIKUMAYA. **Coagulation cascade.png**. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Coagulation_cascade.png>. acessado em: 5 ago. 2017.

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A 2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v.111, n.10, p.6130–6185, out., 2011.

DERVIS, E., et al. In Vitro Incorporation of Radioiodinated Eugenol on Adenocarcinoma Cell Lines (Caco2, MCF7, and PC3), **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v.32, n.3, p.75–81, abr., 2017.

DIAS, L. et al. Pharmacological analysis of hemodynamic responses to *Lachesis muta* (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats. **Toxicon**, v.123, p.25–44, dez., 2016.

DORN, S. B. et al. Some molecular descriptors for non-specific chromosomal genotoxicity based on hydrophobic interactions. **Archives of Toxicology**, v.82, n.5, p.333–338, mai., 2008.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n.4, jan., 2014.

ENDRIS, A.; ASFAW, N.; BISLAT, D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Lippia javanica* leaves from

- Ethiopia. **Journal of Essential Oil Research**, v.28, n.3, p.221–226, mai., 2016.
- FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.5, p.416–421, 2010.
- FILOMENO, C. A. et al. The Chemical Diversity of *Eucalyptus* spp. Essential Oils from Plants Grown in Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v.13, n.12, p.1656–1665, dez., 2016.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374–381, abr., 2007.
- GOTTLIEB, O. R., et al. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.3, n.2, p.97–102, 1998.
- HAFSA, J., et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil, **LWT - Food Science and Technology**, v.68, p.356–364, mai., 2016.
- HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **International Journal of Aromatherapy**, v.12, n.4, p.179–186, dez., 2002.
- HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, n.2, p.211–222, mar., 2008.
- IBRAHIM, T. A., et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Some Coniferous Plants Cultivated in Egypt, **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v.16, n.1, p.328–337, 2017.
- ISLAMUDDIN, M., et al. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.10, p. e0005011, out., 2016.
- KRIFA, M., et al. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil, **Tumor Biology**, v.36, n.7, p.5165–5170, jul., 2015.
- KRÜGER, H. Characterisation of Chamomile Volatiles by Simultaneous Distillation Solid-Phase Extraction in Comparison to Hydrodistillation and Simultaneous Distillation Extraction. **Planta Medica**, v.76, n.8, p.843–846, mai., 2010.

KWON, S.-J.; CHANG, Y.; HAN, J. Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella enterica* and yeasts/molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes, **Food Microbiology**, v.65, p.114–121, ago., 2017.

LEYVA-LÓPEZ, N., et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v.187, p.302–312, jul., 2016.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v.30, n.6, p.1456–1468, dez. 2007.

LIMA, C. G. R. et al. Atributos físico-químicos de um Latossolo do Cerrado brasileiro e sua relação com características dendrométricas do eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.1, p.163–173, fev., 2010.

LIN, L.; DAI, Y.; CUI, H. Antibacterial poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers containing cinnamon essential oil/beta-cyclodextrin proteoliposomes. **Carbohydrate Polymers**, v.178, p.131–140, dez., 2017.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M., et al. Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay, **Food and Chemical Toxicology**, v.98, p.240–250, dez., 2016.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage?. **Acta chimica Slovenica**, v.58, n.4, p.647–59, dez., 2011.

MARTÍNEZ, S. H. et al. Analysis of socio-economic impacts of sustainable sugarcane–ethanol production by means of inter-regional Input–Output analysis: Demonstrated for Northeast Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.28, p.290–316, dez., 2013.

MCKIM, J. M. Food additive carrageenan: Part I: A critical review of carrageenan in vitro studies, potential pitfalls, and implications for human health and safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v.44, n.3, p.211–243, mar., 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of**

Biology and Technology, v. 59, 2016.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v.1, n.1, p.23–29, jun. 2006.

OLIVEIRA, F. et al. Biochemical and functional characterization of BmoosP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.111, p.130–138, mar., 2016.

OMBITO, J. O. et al. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Scientific & Innovate Research**, v.3, n.4, p.460–466, 2014.

OTERO-PATIÑO, R. Snakebites in Colombia. In: **Toxinology**. Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas, p.1-44, 2014.

PIDDE-QUEIROZ, G. et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Molecular Immunology**, v.47, n.16, p.2537–2544, out., 2010.

PINCELLI, A. L. P. S. M.; SEIXAS, F.; NUNES, R. Compactação e fertilidade do solo após colheita do eucalipto utilizando Feller Buncher e Skidder. **CERNE**, v.20, n.2, p.191–198, jun., 2014.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v.52, n.8, p.842–851, dez., 2008.

QUINET, A. et al. DNA Fiber Analysis: Mind the Gap. **Methods Enzymology**, v.591, p.55-82, mai., 2017.

RIAHI, L., et al. Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities, **Industrial Crops and Products**, v.46, p.290–296, abr., 2013.

SANTOS-FILHO, N. A.; SANTOS, C. T. Alpha-type phospholipase A2 inhibitors from snake blood. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.23, n.1, p.19, dez., 2017.

SHUTES, J. Synergism in essential oils and aromatherapy. **The school for aromatic studies**. Disponível em: <https://aromaticstudies.com/synergism-in-essential-oils-and-aromatherapy/> acessado em: 10 abr. 2018.

SIMÕES, R. R., et al. Oral treatment with essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels, **Journal of Ethnopharmacology**, v.200, p.8–15, mar., 2017.

SOUTO-MAIOR, F. N., et al. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide, **Pharmaceutical Biology**, v.55, n.1, p.63–67, jan., 2017.

SPINELLI, R. et al. Techniques and productivity of coppice harvesting operations in Europe: a meta-analysis of available data. **Annals of Forest Science**, v.73, n.4, p.1125–1139, dez., 2016.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.1–5, mar., 2005.

TEPE, B.; ÇAKIR, A.; SIHOGLU TEPE, A. Medicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Origanum onites* (L.): A Review, **Chemistry & Biodiversity**, v.13, n.5, p.504–520, mai., 2016.

VALE, T. G et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v.9, n.8, p.709–714, jan. 2002.

WHO. Expert Committee on Biological Standardization. **WHO Technical Report Series**, n. 964, p.240, 2012 Disponível em: http://www.who.int/biologicals/WHO_TRS_964_web.pdf>. Acessado em: 08 abr. 2017.

YAGI, S. et al. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.9, n.8, p.763–770, ago., 2016.

ANEXO

A. Parecer Comitê de Ética em Pesquisa da UFLA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E *Eucalyptus* sp

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 70589717.4.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.376.107

Apresentação do Projeto:

OK

Objetivo da Pesquisa:

OK

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

OK

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

OK

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências éticas conforme resolução 466/2012

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao Final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e efeitos adversos quando houver.

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037
Bairro: PRP/COEP CEP: 37.204-000
UF: MG Município: LAVRAS
Telefone: (35)3829-5182 E-mail: coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 2.376.107

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_946966.pdf	30/10/2017 13:31:24		Aceito
Outros	CartarespostaaoCOEP.docx	27/10/2017 17:14:07	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	Cartaresposta2aoCOEP.pdf	03/10/2017 15:35:45	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	Comentarioseticosversoafinal.pdf	03/10/2017 15:33:44	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodeconsentimentoversoafinal.pdf	03/10/2017 15:33:10	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TeseCOEPMarianaEsposito.pdf	03/10/2017 15:32:42	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoMariana.pdf	20/06/2017 16:27:35	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	folhaderostoMariana.jpeg	20/06/2017 16:24:33	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaopesquisadorMarianaEsposito.pdf	20/06/2017 16:23:41	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoPRGMariana.jpeg	20/06/2017 16:23:31	Silvana Marcussi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LAVRAS, 10 de Novembro de 2017

Assinado por:
Giancarla Aparecida Botelho Santos
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037
Bairro: PRPCOEP CEP: 37.200-000
UF: MG Município: LAVRAS
Telefone: (35)3829-5182 E-mail: coep@nintec.ufla.br

B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser assinado pelos voluntários da pesquisa:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-COEP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

I - Título do trabalho experimental: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E *Eucalyptus* sp.

Pesquisador responsável: Silvana Marcussi (Docente lotada no DQI).

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Lavras/ Departamento de Química

Telefone para contato: (35) 3829-1622, e-mail: marcussi@dqi.ufla.br

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa de forma totalmente voluntária da Universidade Federal de Lavras.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decida a participar.
- Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.
- Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito, não acarretando qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

As informações contidas neste termo visam firmar acordo por escrito, mediante o qual o responsável pelo menor ou o próprio sujeito objeto de pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação. O TCLE deve ser redigido em linguagem acessível ao voluntário de pesquisa.

II - OBJETIVOS

Avaliar efeitos tóxico-farmacológicos de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis* a ação inibidora dos óleos essenciais de flores e folhas de *Lippia alba* e folhas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus microcorys* sobre os mesmos, *in vitro*. Para tanto, serão realizados testes com moléculas e células obtidas de sangue humano.

III - JUSTIFICATIVA

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, dentre esses compostos cita-se os óleos essenciais, que são amplamente distribuídos nas plantas medicinais utilizadas popularmente para diversos fins como cosméticos e terapêuticos. Mediante este trabalho será avaliado o potencial de alguns óleos em inibir atividades tóxicas induzidas por peçonhas (buscando aplicações dos compostos como complementos para a

Campus Universitário

Fone 35 3829 5182

Caixa Postal 3037
E-mail: coep@nintec.ufla.br
37200-000 Lavras-MG – Brasil

Sítio: http://www.prp.ufla.br/site/?page_id=440

CNPJ: 22.078.679/0001-74



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-COEP

soroterapia tradicional feita com anticorpos) assim como efeitos que possam ser explorados farmacologicamente, como por exemplo, a inibição de enzimas fosfolipases e metaloproteases para fins de tratamento de diferentes tipos de câncer ou processos inflamatórios. Assim, os resultados obtidos podem direcionar para novas aplicações para os compostos avaliados assim como contribuir para avanços no tratamento dos envenenamentos ofídicos, recuperação e processos inflamatórios, de envelhecimento celular e diversas outras patologias.

IV - PROCEDIMENTOS DO EXPERIMENTO

AMOSTRA-

Serão coletados **10 mL** (equivalente a uma xícara de café) **do seu sangue**, por profissional capacitado em laboratórios especializados localizados no centro da cidade de Lavras (Santa Cecília ou Hemocel, com taxas de coleta pagas pela pesquisadora responsável). **Os voluntários serão levados pela própria pesquisadora, do local de recrutamento (Dependências da UFLA) até o local de coleta do sangue e trazidos de volta ao local de recrutamento para continuidade de seus afazeres cotidianos, não havendo, portanto, custo algum, para os voluntários da pesquisa.** A coleta será feita por punção na veia (no braço) realizada com uso de um Vacutainer, da mesma forma que se faz quando realizamos exames de sangue de rotina. Os materiais utilizados para a coleta do sangue serão todos estéreis e descartáveis, as embalagens dos materiais só serão abertas na sua frente, sendo estes devidamente descartados em lixo hospitalar após a coleta do sangue. O profissional responsável pela coleta do sangue usará equipamentos de proteção individual (avental, luvas e máscara) para minimizar o risco de contaminação. Após consentimento em participar da pesquisa, **o sangue do voluntário será coletado uma única vez**, sendo utilizado para realizar todo o estudo mencionado acima com peçonhas e inibidores. Com isso encerra-se sua participação neste estudo. **A pesquisadora responsável buscará auxílio médico, sempre que necessário, antes, durante ou após a coleta do sangue, visto que há a possibilidade do voluntário se sentir mal devido à tensão frente à coleta de sangue e diminuições na pressão sanguínea. Os voluntários terão a garantia de receber uma cópia do TCLE e a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito do procedimento a que será submetido e de outras situações relacionadas com a pesquisa.** Os resultados da pesquisa ficarão à sua disposição caso tenha interesse, e você, voluntário, poderá procurar a responsável pela pesquisa a qualquer momento e terá a garantia de que seu nome será mantido em sigilo, sendo os dados da pesquisa expressos apenas em valores numéricos representando as médias dos dados obtidos em cada ensaio.

ANÁLISES: todas as análises serão realizadas *IN VITRO* após a coleta do sangue. Os testes serão para avaliar os efeitos das peçonhas e dos óleos essenciais das folhas e flores de *Lippia alba* e folhas de *E. microcorys* e *E. grandis* sobre glóbulos vermelhos, moléculas de DNA, trombos e a coagulação sanguínea.

V - RISCOS ESPERADOS

A coleta de sangue poderá causar algumas pequenas manifestações no local da injeção, como um pequeno inchaço, vermelhidão ou formação de mancha roxa, ou seja, sinais comuns em coletas rotineiras de sangue e de baixo risco à saúde do doador. Alguns voluntários poderão sentir mal estar antes, durante ou após a coleta de sangue, devido à diminuição da pressão sanguínea, e, caso isso ocorra, a coleta do sangue poderá ser suspensa e se necessário o docente responsável solicitará atendimento médico para o voluntário. Espera-se obter o mínimo de situações em que os voluntários sintam mal estar, uma vez que, teoricamente, pessoas que se

Campus Universitário

Fone 35 3829 5182

Caixa Postal 3037

Sítio: http://www.prp.ufla.br/site/?page_id=440

E-mail coep@nintec.ufla.br

37200-000 Lavras-MG – Brasil

CNPJ: 22.078.679/0001-74



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-COEP

sentem mal ao ver sangue ou ter seu sangue retirado não irão se voluntariar, além disso, porque as coletas serão feitas na ausência de jejum, a qualquer hora do período da manhã.

VI – BENEFÍCIOS

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto de doutorado da discente Mariana Araújo Espósito, sob a orientação da docente Silvana Marcussi, no qual se pretende obter informações sobre os efeitos dos óleos essenciais supracitados sobre moléculas e células humanas, considerando parâmetros fisiológicos e toxicológicos, visando a comprovação de indicações de uso popular dessas plantas, assim como a obtenção de conhecimentos que permitam sugerir novas aplicações com eficácia e segurança.

VII - RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O responsável pelo menor ou o próprio sujeito tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao atendimento a que está sendo ou será submetido.

VIII – CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA

A pesquisa com o sangue de qualquer voluntário somente será suspensa em casos específicos não previstos que deverão ser considerados à posteriori, como problemas de saúde por parte do pesquisador envolvido. Nesta situação o COEP será consultado visando orientar a continuidade do projeto sob responsabilidade de outros pesquisadores ou mesmo seu cancelamento.

IX - PARTICIPANTE MAIOR DE IDADE

Eu _____, certifico que, tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa exposto acima.

Lavras, ____ de _____ de 20__.

NOME (legível) _____ RG _____

ASSINATURA _____

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da UFLA. Endereço – Campus Universitário da UFLA, Pró-reitoria de pesquisa, COEP, caixa postal 3037. Telefone: 3829-5182.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada com o pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

No caso de qualquer emergência entrar em contato com o pesquisador responsável no Departamento de Química. Telefones de contato: 03538291622 ou 99173-7593

Campus Universitário

Fone 35 3829 5182

Caixa Postal 3037

Sítio: http://www.prp.ufla.br/site/?page_id=440

E-mail coep@nintec.ufla.br

37200-000 Lavras-MG – Brasil

CNPJ: 22.078.679/0001-74

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

**Essential oils from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys*:
thrombolysis, hemolysis, clotting, fibrinogenolysis and genotoxic activities
modulation**

Elaborado de acordo com a norma do periódico*: Current Organic

Chemistry (ISSN: 1875-5348)

Submetido em 13 de junho de 2018.

Title: Essential oils from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys*: thrombolysis, hemolysis, clotting, fibrinogenolysis and genotoxic activities modulation

Mariana Araújo Esposito^a, Pedro Henrique de Souza César^a,
Rafaela Brandão^b, Tatiana Siva de Abreu^a and Silvana Marcussi^{*a}

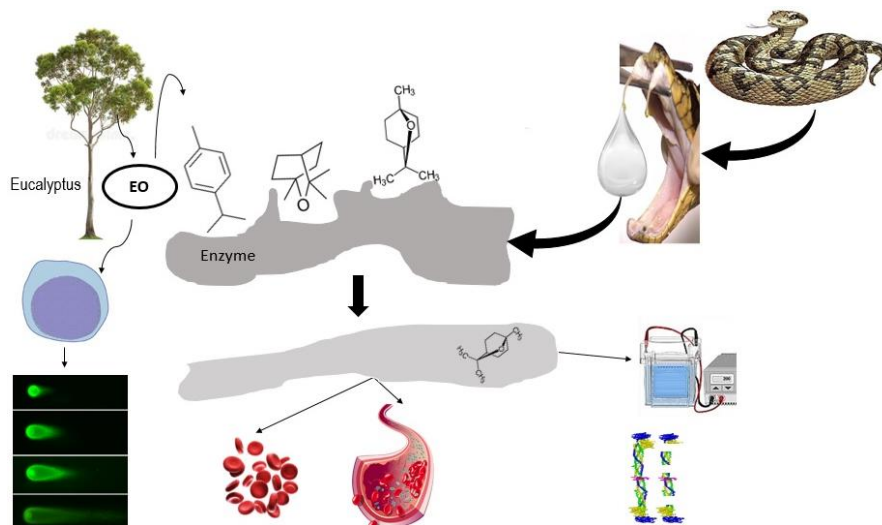


^aBiochemistry Department, Universidade Federal de Lavras, Brazil; ^bEssential Oil Laboratory, Univesidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil

Abstract: Essential oils in plants are produced in limited amounts, however in *Eucalyptus* (genus) they are present in higher quantities. The aim of this study was to evaluate the pharmacological properties of *Eucalyptus grandis* (EG) and *Eucalyptus microcorys* (EM) EO. The major constituent in both EO were 1,8-cineole, followed by ρ -cymene (28,1%) in EG and α -Pinene (25,45) in EM. Both essential oils (0.1 – 1.2 μ L) prevented thrombus dissolution, reduced clotting activity and hemolysis caused by snake venoms. EO protected nucleoids against the genotoxic action induced by *Lachesis muta* venom. The greatest inhibitions obtained in thrombolytic assay were 50% (EM; 0.05 μ L) and 73% (EG; 0.05 μ L) upon lyses of thrombi induced by *B. moojeni* venom and of about 35% to both oils acting on *L. muta* venom. The clotting time was prolonged by different volumes of evaluated oils, being considered significant values between 10 - 27 seconds. In tested volumes EO exercised partial protection on fibrinogenolysis induced by *L. muta* venom. The minimum hemolysis observed after manipulation of erythrocytes solution was significantly reduced in the presence of both OE, being observed lysis values 50% lower than negative control (phosphate buffered saline - PBS). In the comet assay, EM EO was more effective in reducing the fragmentation degree of leukocytes DNA molecules, induced by *L. muta* venom, with arbitrary units values of 66.15, 55.32 and 53.30% lower than positive control. EO volumes used here corresponding to the former mentioned arbitrary units were 3, 6 and 9 μ L, respectively. These oils present wide application potential considering the pharmacological properties observed in this study.

Keywords: *Eucalyptus*, essential oil, snake venom, Comet assay, chemical characterization, enzyme inhibitors.

Graphical Abstract:



1. INTRODUCTION

Eucalyptus are the world's most widely planted hardwood trees. Their outstanding diversity, adaptability and growth have made them a global renewable resource of fiber and energy. *Eucalyptus* also shows the highest diversity of genes for specialized metabolites such as terpenes [1]. *Eucalypt* leaves present high essential oils content (up to 33%), and these oils can have 48 different compounds. Almost all of them present the terpene 1,8-cineole, known as *Eucalyptol*, as the major constituent [2]. Many essential oils from *Myrtaceae* species had their antioxidant property evaluated. Some essential oils compounds such as p-cymene,

carvacrol, cuminaldehyde, and linalool are cited as the responsible ones for antioxidant property [3]. The extraction method may interfere with the antioxidant profile, but there is no doubt that there are antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor and enzymatic modulating properties in these essential oils [4]. Enzymes from snake venoms may act as supporting tool for understanding pharmacological and physiological processes and drug discovery. Phospholipases A2 snake venoms exhibit great homology to human phospholipases, especially in the C-terminal region, posing as valuable tools in the search for anti-inflammatory compounds. The search for natural compounds able to neutralize or reduce neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity, clotting,

hemorrhagic, and edema-inducing effects caused by ophidian accident is a promising goal [5]. Proteolytic enzymes destabilize membrane structure, modifying the flow of ions and intracellular metabolism, thus causing red blood cells to rupture. In addition, inhibition of some snake venoms proteases by natural compounds simulates the anticoagulant and antithrombotic effects of these compounds on animal organisms, since these enzymes act on the factors of the coagulation cascade, as well as exerting a function similar to thrombin, showing high homology with human enzymes [6]. *Eucalyptus microcorys* (EM) is one of the least exploited *Eucalyptus* species in terms of its phytochemical content and biological activity [7]. In opposition to this, *Eucalyptus grandis* (EG) has extensive research on its biological effects. Its essential oils had been tested as larvicidal [8], antibacterial, antiviral, anti-inflammatory [9], antifungal [10], antiasthma [11] and others. Enzyme inhibition studies could contribute to better understand the mechanism of action of these enzymes in order to design novel substrate specificities for catalyzing specific reactions [12]. In our work the chemical compositions of the essential oils of *E. grandis* and *E. microcorys* were evaluated, their performance in the cascade of the coagulation through tests of hemolysis, coagulation, thrombolysis and fibrinogenolysis, as well as, their genotoxic potential through the comet assay.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Plant material and venoms

EG and EM leaves were collected at the Campus of the Federal University of Lavras (Latitude 21 ° 13 'S, Longitude 44 ° 58' W and average altitude of 915 m) in the morning period during September 2016, in days without precipitation. EO extraction and characterization were performed according to Camargo et al. [13]. Essential oils were stored at 4°C and diluted in DMSO: PBS (1: 1). The used venoms were purchased commercially from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). They were weighed (10 mg) and dissolved in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and were previously evaluated in different doses in all the tests to define the minimum doses inducing of each activity.

2.2 Thrombolytic, Fibrinogenolytic, Clotting and Hemolysis test

Blood samples from healthy volunteers were collected without anticoagulant in BD Vacutainer® for thrombolytic test [14]. 100 µL blood were distributed in each well of microplate. After clotting, it was added 30 µL of different samples of snake venom (*Bothrops moojeni* or *Lachesis muta*) with different volumes of essential oils, incubated for 10 minutes at 37°C. After that the samples were placed upon thrombi and left for 24 hours at 37°C in a cell culture chamber. Controls containing only venoms or only oils were also tested. Free thrombi volume were aspirated and quantified. For hemolysis test, 10 mL blood sample was collected in heparin tube, homogenized and centrifuged at 700 g for 5 minutes (Fanem Baby ® I Centrifuge model 206 BL). Afterwards, PBS (2 mM NaH₂PO₄, 3mM Na₂PO₄,

154 mM NaCl, pH 7.4) was added in the same volume of the erythrocytes, and centrifuged at the same conditions. The erythrocytes washing procedure with PBS was performed 3 times. Erythrocytes were diluted to hematocrit of 2%. The negative control was performed with PBS (to quantify mechanical hemolysis) and the positive control was performed with distilled water (to quantify total hemolysis). After incubation of erythrocytes at 2% with different volumes of oils at 37 °C for 1 hour, centrifugation was carried out at 1500 g for 5 minutes. The absorbance was recorded at 412 nm in a spectrophotometer [15]. Fibrinogenolytic and activities were evaluated according to Miranda et al. [16]. The first one by analysis of fragmentation profile of fibrinogen molecules in polyacrylamide gel electrophoresis in reducing conditions (SDS-PAGE). Clotting test was performed with citrated human plasma. The difference of 10 seconds between the observed times in controls and in each treatment was considered significant once the prothrombin activation occurs in 10 to 14 seconds. This study was approved by UFLA Committee of Ethics in Research with Humans under the number 2.376.107.

2.3 Comet assay

To assess DNA damage in human leukocytes we performed the comet assay. Blood aliquots were added with EO at volumes of 3 or 6 μL , remaining at 37 °C for a period of 3 hours in a cell culture chamber. A cell suspension of approximately 106 cells mL^{-1} was used to obtain up to 10,000 nucleotides of leukocytes per slide. Blood of three volunteers was used in independent experiments in which they were

evaluated and classified 300 nucleoids by treatment, totalizing 900 nucleoids by treatment. The 1% low melting point (LMP) agarose, stabilized at 40°C, was used to include the leukocytes previously treated and fix these cells on the slides. The mixtures of 25 μL of each incubation solution plus 75 μL of LMP agarose were homogenized and placed on slides previously covered with 1.5% normal melting point (NMP) agarose. Slides were coverslipped and stored at 4°C for 10 minutes. Then immersed in freshly prepared lysis solution (0.25 M NaCl; 100 mM EDTA; pH 10; 1% Triton X-100; 5% DMSO) for two hours. Then, the slides were kept in the electrophoresis solution (1 mM EDTA; 30 mM NaOH, pH 13) for 20 minutes at 4°C, and submitted to electrophoretic run carried out at 25V, 300mA for 35 minutes. After the run the slides remained in a neutralization solution (0.4M Tris-HCl, pH 7.4) for 30 minutes. The DNA molecules contained in the slides were then precipitated with absolute ethanol. The staining was performed with 40 μL /slide of propidium iodide solution at 2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Comet patterns were analyzed by visual scores and classified by fragmentation levels. For additional positive control, Doxorubicin was used in the concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. The procedures described above were carried out in dark conditions since light irradiation causes death of lymphocytes by apoptosis [17]. Comet standards were analyzed by visual scores [18,19]. The analyzed cells were classified by DNA injury extent in 5 classes: class 0, without damage (damage < 5%); class 1, low level of damage (5- 20 %); class 2, medium level of damage (20-40 %); class 3, high level of damage (40-85 %) and class 4, totally damaged (damage > 85%). The average frequency of

damage was calculated from the sum of the percentages of nucleoids with damage 1, 2, 3 and 4. In order to perform comparative analysis, data were calculated with arbitrary units (AU). The arbitrary units (0-400; being 0 = no damage and 400 = 100% damage) were calculated by the equation (1 x number of nucleoids grouped in class 1) + (2 x number of nucleoids in class 2) + (3 x number of nucleoids in class 3) + (4 x number of nucleoids in class 4).

2.4 Statistics

Statistical analysis was carried out by One-way analysis of variance (ANOVA) test using a R Core Team [20] and the significance of the difference between means was determined by Scott-Knott test at ($P < 5$) significant level. Analysis was carried out in triplicate and mean \pm SD of three parallel measurements.

3. RESULTS

The constituents identified in *Eucalyptus* EOs characterization are presented in Table 1. In both studied *Eucalyptus* the constituent present in higher quantity was 1,8-Cineol, known as Eucalyptol. This compound represented 55.24% of *E. grandis* oil and 57.14% of *E. microcorys* oil. In *E. microcorys*, pCymene was identified in centesimal amounts (0.56%).

The action of *Eucalyptus* EO on thrombi and its effects on thrombolysis induced by snake venoms are presented in Figure 1. In the conditions evaluated the essential oils did not cause thrombi dissolution (Figure 1A).

The thrombolytic activity induced by *Bothrops moojeni* venom was intensified at highest volumes of EOs,

with a more pronounced thrombolytic effect at 0.6 and 1.2 μ L for *E. grandis* EO and 1.2 μ L of *E. microcorys* EO. However, for 0.1 μ L of *E. grandis* oil and 0.05 μ L of *E. microcorys* it was observed a decrease in the action of enzymes (mainly proteases) upon thrombi (Figure 1B).

This effect for *Lachesis muta* venom was more heterogeneous with no relation between the oils volumes evaluated and the percentage of inhibition observed. All doses tested decreased the thrombolytic activity induced by the venom, being 0.1 μ L *E. grandis* EO and 1.2 μ L to *E. microcorys* EO the most efficient doses for enzymatic inhibition (Figure 1C).

The clotting activity induced by *B. moojeni* and *L. muta*. venoms were inhibited by EG and EM EO. A longer coagulation time was observed after incubation of 1.2 μ L of EG with *L. muta*. Clotting time increased from 63 s to 90 s and 74.67 s, respectively. The partial inhibitory effect may be related to the volumes of oils used (chosen based on the limitations of the method to the use of compositions of low polarity), incubation times with the venoms and the variations in composition of the venoms and oils.

Concerning the fibrinolytic activity, the essential oils in the evaluated conditions exercised partial protection on the fibrinogenolysis induced by *B. moojeni* and *L. muta. muta* venoms. It was observed a reduction in α and β chains fragmentation, and consequent reduction on the intensity of bands corresponding to fibrinopeptides, in comparison to electrophoretic profiles obtained for controls containing snake venoms and fibrinogen and only fibrinogen (data not shown).

During manipulation of the samples containing erythrocytes, a mechanical

hemolysis may occur. In this experiment, a small mechanical hemolysis was observed, and that was attenuated by both EO tested. This protection may arise from the fact that the components in these EO may interact with the erythrocytes membrane, increasing its stability and resistance. The test results are presented in Figure 2.

Genotoxicity analysis (Comet assay) are presented in Table 3 and Figure 3 and 4. EG EO showed identical effect to positive controls in all tested doses. Conversely, this does not occur with any of the doses of EM, once this EO caused DNA damage (Table 3). This difference in the behaviors of these two EO can be explained by the presence of the constituents p-cymene, which in EG is much larger, and alpha-pinene, present in a greater proportion in EM.

4. DISCUSSION

The composition of plant essential oils are subject to environmental variations. For example, Soyingbe et al. [21] had described an EG EO composed by α -Pinene (29.6%), p-Cymene (19.8%) and 1,8-Cineole (12.8%) as major constituents. In another work, Santadino et al. [22] identified as major components of EG EO α -Pinene (48.8%), 1,8- Cineole (18.8%) and limonene (2.2%). In our work, the samples analyzed had 4.32 times more Eucalyptol (1,8 – Cineole) than the one from Soyingbe et al. [21] and 2.9 times more than the one from Santadino et al. [22]. Besides no limonene was found here. The only aromatic compound was pCymene, and all of them are monoterpenes, also known as C 10 compounds.

Analyzing clotting time, similar results were observed by Miranda et al. (2016) when evaluating the performance of the essential oils from Asteraceae family plants. In their study all EOs evaluated increased clot formation time compared to the same venoms tested here. Both studies tested same amount of venom (10 μ g) and essential oil volume. Here were tested an EO dosage 24 times smaller than Miranda et al (2016) in order to obtain partial or gradual enzymatic inhibition. The inhibitory effect was observed for all EO dosages evaluated except for 1.2 μ L of EG. The partial inhibitory effect may be related to the volumes of oils used (chosen based on the solubility limitation of the use of low polarity compounds), incubation time with the venoms and variable composition of the venoms.

B. moojeni and *L. muta*. venoms have different constitutions and, consequently, have different mechanisms of action. However, all of them act upon blood clotting cascade inducing coagulation in the absence of calcium, mainly due to the action of proteases. *Eucalyptus* EO was able to modulate enzymatic activity and change snake venoms in vitro performances. These findings suggest possible modulatory interactions between terpenes present in the oils and proteases present in the venoms.

Considering the different coagulation times obtained with different oils and different venoms, it was not possible to detect an inhibition pattern, so that several terpenes may have been responsible for specific interactions with each toxin present in the snake venoms evaluated. Possible mechanisms of inhibition may include chelation of ionic cofactors by

components of the oils, binding of terpenes to catalytic sites present in enzymes, interaction of oils components with hydrophobic amino acids in toxins structures.

These interactions may alter protein three-dimensional conformation, solubility and, therefore, can interfere with their catalytic activity, among others [23,24]. Miranda et al. attribute the enzymatic inhibition observed in their work to sesquiterpenoids content (19.0%) in *Hedychium coronarium* EO, which does not occur with EO samples from the present study, once in *Eucalyptus* EO there is no sesquiterpene components. Transient receptor potential channels (TRP channels) are a group of ion channels located mostly on the plasma membrane of numerous animal cell types. These channels mediate a variety of sensations like the sensations of pain. Caceres et al (2017) clarify that 1,8-Cineole modify inflammatory enzymes, through TRP channels which lead cells to produce less inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6). Eucalyptol also exhibited strong analgesic effects and attenuated mechanical *allodynia*. The same happened with its metabolite: 2-hydroxy-1,8- cineole. The interaction of Eucalyptol with membrane receptors makes strong the suggestion that the membrane modifies and it justifies lower hemolysis in the assay performed [25].

Sharma et al. [26], suggest that geraniol disrupts cell membrane integrity by interfering with ergosterol biosynthesis, and significantly inhibits PM-ATPase, a type of Proton-ATPase. In this work the authors test this monoterpene on yeasts, and attributed to it the activity of membrane lysis and

therefore, fungicidal action. They also reported that lysis occurs only in doses equal or 5 times higher than the Minimum Inhibitory Concentration (MIC: 30 to 130 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Silva et al. [27], tested *Casearia sylvestris* EO on seven different types of red blood cells and found hemolysis in all of them at doses of 0.6 to 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, however in this work the EOs were dissolved in Ethanol: DMSO, which could also have influenced the results of hemolysis. The results of these studies demonstrate that doses below 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, depending on the EO components, can induce pharmacological activities without the undesirable effect of hemolysis.

Dörsam et al. [28] reported that isolated Eucalyptol is weakly genotoxic, inducing oxidative damage in DNA from proficient cells in repair mechanisms without resulting in cell cycle arrest and death. Here it is shown that the EO, mostly with Eucalyptol but not only it, can cause severe damage to lymphocytes DNA and the behavior is quite similar to Doxorubicin (100 μg) ($p < 0,05$).

Some plant species are well described and characterized the antioxidant activities of their EO, being this action one of mechanisms that contribute to antiproliferative properties [29]. The authors suggest that the mechanisms of tumor cell growth control in the presence of EO occurs by apoptosis triggered by mitochondrial death. This mechanism was described for leukemic HL-60 cells after addition of *Artemia vulgaris* L. EO [29]. In this study it was suggested that the major components of the isolated EOs would be responsible for the induction of apoptosis. These components are caryophyllene, α -zingiberene, borneol

and α -curcumene. Except for borneol, all the others are sesquiterpenes.

Similarly, aerial parts of *Salvia bracteata* Banks and *Salvia rubifolia* Boiss had their essential oils extracted and subjected to the Comet assay on human melanoma cells [30]. These research described that *Salvia rubifolia* essential oil presented a higher concentration of sesquiterpene hydrocarbons (41.4%), and it had shown to be more active than the essential oil of *Salvia bracteata*, in reducing cell vitality, altering cell membrane integrity and in inducing genomic DNA fragmentation. Therefore, the results on melanoma cells, observed by them, suggest that the anticancer activity of the essential oils evaluated may be related to active sesquiterpenes acting in synergism. The results from these authors had a solid scientific background, since α -humulene is active against A549, DLD-1 and LNCaP cell lines [31,32] and caryophyllene and α -caryophyllene exhibited antiproliferative activity against K562 cell [33].

5. CONCLUSION

These findings suggest that the inhibitory activity of the essential oil is due to the monoterpene constituents present in both oils analyzed. The doses employed may cause inhibition of the enzymes of the coagulation cascade, increasing coagulation time and formation of the fibrin net, hinder the thrombolytic effect and protect against hemolysis. In tested doses of 0.05 and 1.2 μ L, *E. grandis* oil appears to exert a genotoxic damage such as doxorubicin damage. Meanwhile *E. microcorys* oil is less genotoxic.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

For their support and funding. National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES). National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

6. REFERENCES

1. Myburg, A.A. et al. (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 510, 356-362.
2. Filomeno, C.A. et al. (2016) The Chemical Diversity of *Eucalyptus* spp. Essential Oils from Plants Grown in Brazil. *Chem. Biodivers.* 13, 1656–1665
3. Yangui, I. et al. (2017) Essential Oils of *Myrtaceae* Species Growing Wild in Tunisia: Chemical Variability and Antifungal Activity Against *Biscogniauxia mediterranea*, the Causative Agent of Charcoal Canker. *Chem. Biodivers.* 14, e1700058
4. Bakkali, F. et al. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475
5. Melo, L.L. et al. (2017) Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by

- Bothrops* snake venoms using specific polyclonal anti - BnSP7 antibodies. *Biologicals*, 50, 109-116
6. Kini, R. and Koh, C. (2016) Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. *Toxins (Basel)*. 8, 284
 7. Bhuyan, D.J. et al. (2017) Phytochemical, antibacterial and antifungal properties of an aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* leaves. *South African J. Bot.* 112, 180–185
 8. Lucia, A. et al. (2007) Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 299–303
 9. Elaissi, A. et al. (2012) Chemical composition of 8 *Eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complement. Altern. Med*, 12, 1080.
 10. Zhou, L.-J. et al. (2016) Antifungal Activity of *Eucalyptus* Oil against Rice Blast Fungi and the Possible Mechanism of Gene Expression Pattern. *Molecules* 21, 621
 11. Soyngbe, O.S. et al. (2017) Antiasthma activity of *Eucalyptus grandis* essential oil and its main constituent: Vasorelaxant effect on aortic smooth muscle isolated from normotensive rats. *J. Exp. Appl. Anim. Sci.* 2, 211
 12. Belfeki, H. et al. (2016) Antioxidant and anti-lipases activities in vitro of *Mentha viridis* and *Eucalyptus globulus* extracts. *Ind. Crops Prod.* 89, 514–521
 13. Camargo, K.C. et al. (2017) Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. *Am. J. Plant Sci.* 8, 2871–2877
 14. Cintra, A.C.O. et al. (2012) Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* 60, 70–82
 15. Rangel, M. et al. (1997) Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* 35, 305–9
 16. Miranda, C.A.S.F. de et al. (2016) Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the *Asteraceae* family. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 59
 17. Chen, L. et al. (2015) Edaravone protects human peripheral blood lymphocytes from γ -irradiation-induced

- apoptosis and DNA damage. *Cell Stress Chaperones* 20, 289–295
18. McKelvey-Martin, V.J. et al. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288, 47–63
 19. Collins, A.R. (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261
 20. Team, R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2013) Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>> acessado em: 15 jan. 2017.
 21. Soyingbe, O.S. et al. (2013) The Essential Oil of *Eucalyptus grandis*; W. Hill ex Maiden Inhibits Microbial Growth by Inducing Membrane Damage. *Chin. Med.* 4, 7–14
 22. Santadino, M. et al. (2017) Feeding preference of *Thaumastocoris peregrinus* on several *Eucalyptus* species and the relationship with the profile of terpenes in their essential oils. *Phytoparasitica* 45, 395–406
 23. Oliveira, C.H.M. et al. (2016) Inhibition of proteases and phospholipases A2 from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 2005–2016
 24. Perumal Samy, R. et al. (2012) Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). *Bioinformation* 8, 48–57
 25. Caceres, A.I. et al. (2017) Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of *Eucalyptol*. *Br. J. Pharmacol.* 174, 867–879
 26. Sharma, Y. et al. (2016) Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *J. Mycol. Médicale / J. Med. Mycol.* 26, 244–254
 27. Silva, S.L. da et al. (2008) Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amaz.* 38, 107–112
 28. Dörsam, B. et al. (2015) The *Eucalyptus* oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. *Arch. Toxicol.* 89, 797–805
 29. Saleh, A.M. et al. (2014) In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondriadependent apoptosis in HL-60 leukemic

cell line. BMC Complement. Altern. Med. 14, 226

30. Cardile, V. et al. (2009) Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. J. Ethnopharmacol. 126, 265–272
31. Loizzo, M.R. et al. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and *lauraceae* families against in vitro human tumor models. Anticancer Res. 27, 3293–9
32. Legault, J. et al. (2003) Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. Planta Med. 69, 402–7
33. Lampronti, I. et al. (2006) Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. Int. J. Oncol. 29, 989–95

Figures to Current Organic Chemistry

Table 1. Chemical constituents of the essential oils of leaves of *Eucalyptus grandis* and *E. microcorys*.

Essentialoil	Compound	%	RI
<i>E. grandis</i>	α -Pinene	6,13	933
	ρ -Cymene	28,19	1024
	1,8-Cineole (<i>Eucalyptol</i>)	55,24	1032
	γ -Terpinene	5,85	1058
	α -terpinylacetate	4,59	1346
<i>E. microcorys</i>	α -Pinene	25,45	933
	Camphene	1,30	943
	ρ -Cymene	0,56	1033
	1,8-Cineole (<i>Eucalyptol</i>)	57,14	1032
	α -Fenchol	1,20	1121
	Trans-Pinocarveol	6,77	1142
	Pinocarvone	2,45	1163
	Isoborneol	2,75	1174
α -Terpineol	2,38	1197	

Table 2. Effect of essential oils from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on clotting time of human citrated plasma induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms.

Samples		Clotting time (s)	
		<i>B. moojeni</i> venom	<i>L. muta. muta</i> venom
Control		62.33 ± 2.51	63.00 ± 3.0
Essential oil	(µL)		
<i>E. grandis</i>	0.05	72.6 ± 3.2 ^a	77.6 ± .06 ^a
	0.1	71.6 ± 3.0 ^a	70.3 ± 1.5 ^a
	0.3	56.3 ± 1.5 ^b	69.3 ± 2.5 ^a
	0.6	74.0 ± 1.0 ^a	86.6 ± 1.5 ^a
	1.2	62.6 ± 3.2 [*]	90.0 ± 2.0 ^a
<i>E. microcorys</i>	0.05	76.6 ± 2.1 ^a	70.3 ± 0.6 ^a
	0.1	76.0 ± 2.0 ^a	78.0 ± 2.6 ^a
	0.3	74.33 ± 1.2 ^a	73.6 ± 1.5 ^a
	0.6	65.6 ± 1.2 [*]	76.3 ± 1.5 ^a
	1.2	78.6 ± 1.5 ^a	74.6 ± 2.3 ^a

Data represent means of triplicate and standard derivation. For each treatment of oil plus each venom analyzed, the means followed by the "a" (in anti-clotting action) or "b" (pro-clotting action) letter, differ significantly from control at 5% probability by Scott-Knott Test. * Do not differ significantly from control at 5% probability by Scott-Knott Test.

Table 3: Effect of EO from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on DNA from human blood leukocytes.

Amount	Samples	Damage frequency (%)	Arbitrary units; A ± SD
	C(-)	7,0	28.3 ± 8.02 ^a
100µg	C(+) Doxorubicin	80,8	323.3 ± 2.4 ^b
50µg	C(+) <i>Lachesis muta muta</i> venom	70,5	282.7 ± 33.8 ^b
3 µl		59,8	239.0 ± 1 ^b
6µl	<i>E. grandis</i> (EO)	60,0	240.7 ± 10.4 ^b
9µl		66,0	264.0 ± 9.0 ^b
3µl		23,9	95.67 ± 21.4 ^c
6µl	<i>E. microcorys</i> (EO)	31,6	126.3 ± 14.2 ^c
9µl		33,0	132.0 ± 1.0 ^c

(+)CD: Positive Control Doxorubicin; (+) CL: Positive Control *Lachesis muta* venom, (-) Control: Negative control (PBS); EO: Essential oil. A ± SD: Average of arbitrary units corresponding to triplicates obtained in three independent assay ± Standard Deviation. Each letter differs significantly (p < 0.05) by Skott-Knott Test.

Figure 1. Activity on human blood thrombi. (A) Thrombolytic activity of essential oils from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys*. (B) Effect of essential oils on the thrombolytic activity induced by *Bothrops moojeni* snake venom. (C) Effect of essential oils on the thrombolytic activity induced by *Lachesis muta* snake venom.

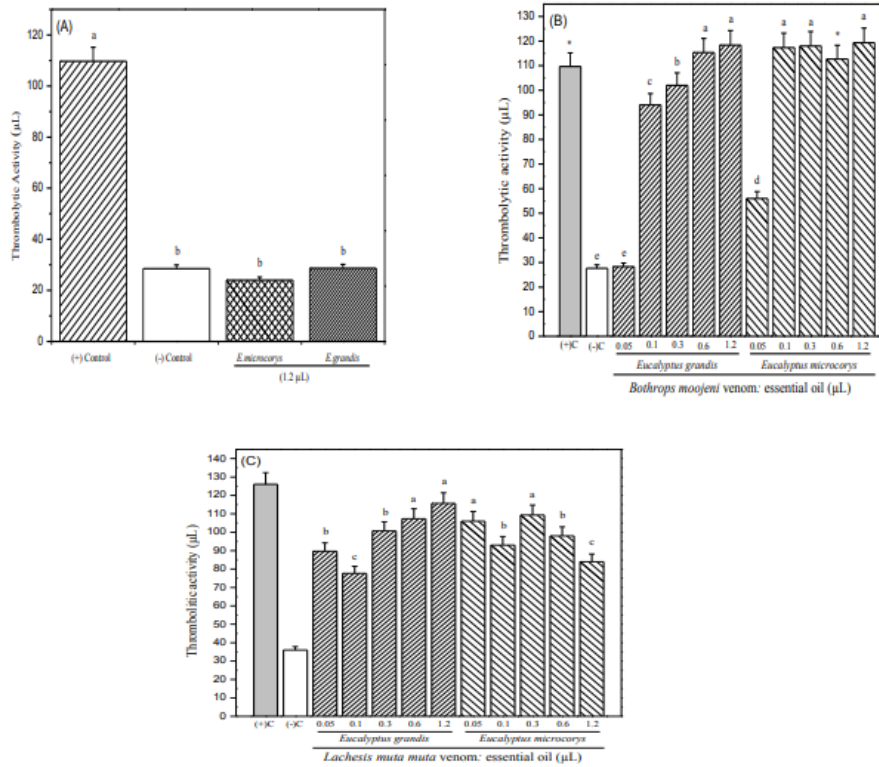
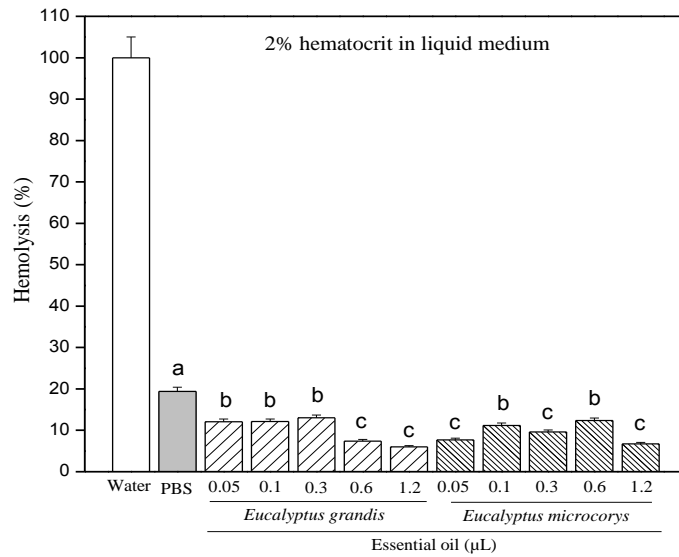
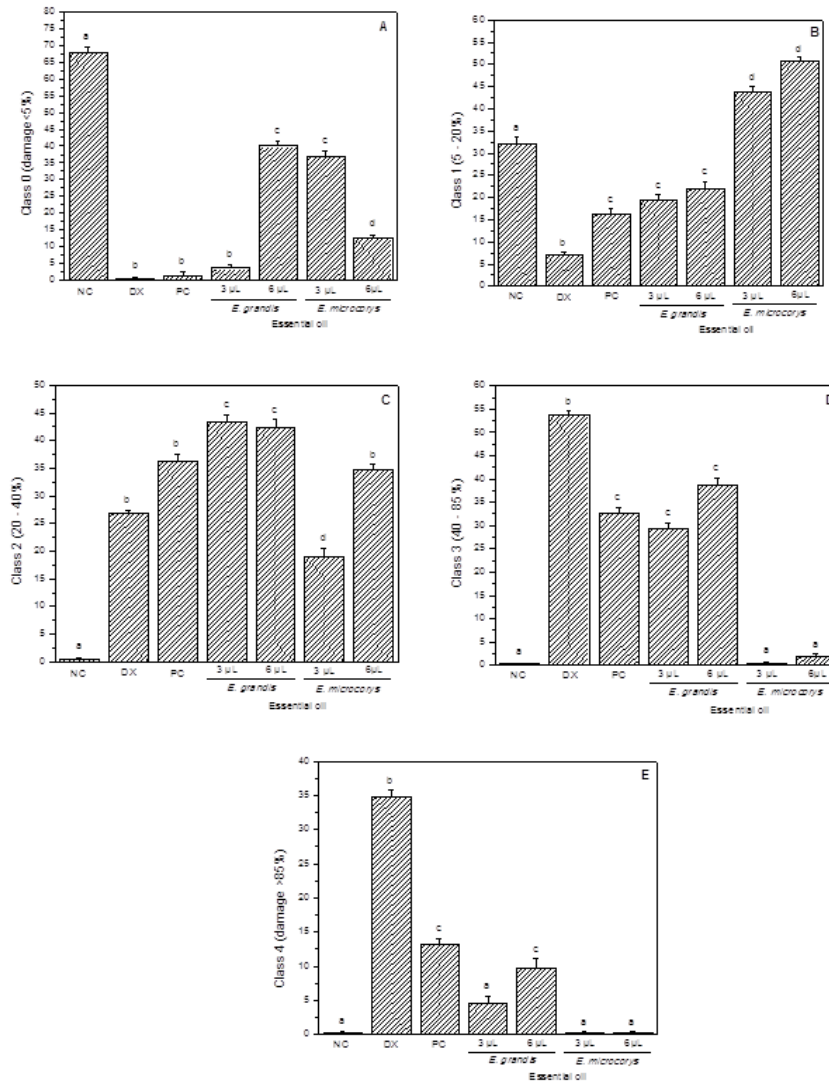


Figure 2. Effect of EO from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on human erythrocytes lyse.



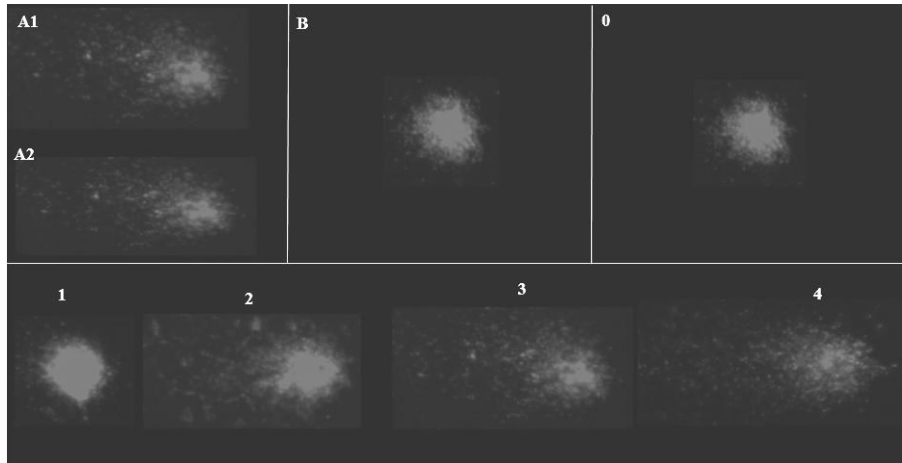
(+)Control: water; (-) Control: PBS. Data represent average of triplicates evaluated to *Eucalyptus grandis* and *E.microcorys* EO at different volumes in three independent experiments. Each letter differs significantly ($p < 0.05$) by Skott-Knott Test.

Figure 3. Effect of EO from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* on DNA from human blood leukocytes. Percentage of nucleoids in the different comet classes corresponding to the varying degradation levels of the DNA molecules.



Data represent average of values obtained from triplicate assays where were evaluated 300 nucleoids/treatment/assay. Comet were classified according to Collins et al. (2004). NC: negative control (PBS); DX: positive control (Doxorrubicin, 100µg); PC: positive control (*Lachesis muta muta* venom, 50µg). Each letter statistically differs (p < 0, 05) using Skott-Knott test.

Figure 4. Comet assay (single cell gel electrophoresis) in human blood leukocytes.
Demonstrative images of scores observed in different treatments. A: class zero;
B: class 1; C: class 2; D: class 3; E: class 4.



A1: + Control *Lachesis muta muta* venom; A2: + Control Doxorubicin; B: - Control (PBS);
0: damage zero; 1: Score class 1; 2: Score class 2; 3: Score class 3; 4: Score class 4.

TERCEIRA PARTE**ARTIGO 2****Essential oils from *Lippia alba* (leaves and flower): thrombolysis, clotting, and genotoxic activities modulation**

*Elaborado de acordo com a norma do periódico Food and Chemical Toxicology (ISSN: 0278-6915)

Mariana Araújo Espósito¹, Mariana Aparecida Braga¹, Tatiana Silva Abreu¹, Mateus William de Faria Eleutério¹, Pedro Cesar Souza¹, Silvana Marcussi^{1*}.

Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CEP: 3037, Lavras 37200-000, Brazil (phone number: +55 (35) 3829-1271, e-mail: marcussi@dqi.ufla.br).

Abstract

Lippia alba (Mill.) NE Brown (Verbenaceae), presents several medicinal uses and its essential oils are investigated under different conditions. The aims of this study were determine the composition of the *L. alba* flower and leaf essential oil (EO) and to evaluate the pharmacological properties through action on proteolytic enzymes present in snake venoms. The major constituent in flower EO were and geranial (49.83%) and neral (32.75%), and to the leaf EO were geranial (38.06%), neral (31.02%) and limonene (18.03%). Flower EO presented protective effect on thrombus dissolution induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms (0.05-1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Leaf EO presented procoagulant effect under the same conditions (0.6-1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). When tested against *L. muta. muta* venom, the protective effect were smaller in both EO. The clotting time was prolonged by the different volumes of both evaluated oils when *L.muta muta* venom was tested and procoagulant effect was observed against *B.moojeni* . In the comet assay, flower EO was more effective in protecting DNA when tested with *L.muta muta* venom, presenting 11.6 – 34.9% damage frequency, compared with 80.3% in Doxorubicin (+Control) and 70.7% for *L.muta muta* venom. When both EO tested by themselves, flower EO presented significantly different to damages in negative control (PBS). However this oil (3 $\mu\text{L mL}^{-1}$) protected DNA from ruptures caused by *L.muta muta* venom inducing significant reduction in arbitrary units values. This study is the first to

present genotoxicity and anti-genotoxicity data using the comet assay to evaluate *L. alba* leaf and flower EO.

Key words: *Lippia alba*, essential oil, snake venom, Comet assay, chemical composition, enzyme inhibitors.

1. Introduction

The genus *Lippia* (Verbenaceae family) includes about 200 species that are abundantly present in Central America, South America and Africa (VILJOEN et al., 2005). *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown is a tropical aromatic shrub widely used in traditional medicine (MATESANZ; GIANOLI; VALLADARES, 2010) and its essential oils (EO) have been studied for various applicabilities, in industry, agriculture and health.

In the Northeast region of Brazil, the presence of three chemotypes, characterized by the production of EO, are reported: myrcene-citral (chemotype I), limonene-citral (chemotype II) and carvone-limonene (chemotype III) (SILVA et al., 2016). Mishra et al. (2010), report the *L. alba* cultivar 'Kavach' as a linalool-rich oil resource. Due to the presence of different compounds *L. alba* oil, they present a difference performances of antioxidant, antimicrobial (VILJOEN et al., 2005), antifungal (MESA-ARANGO et al., 2010), antitumor (MONTERO-VILLEGAS et al., 2018) and anesthetic activities (SOUZA et al., 2018).

Natural products such as vegetal compounds are an excellent alternative source of novel antitumor agents. Caspases (cysteine-aspartic proteases) are a family of protease enzymes playing essential roles in programmed cell death (including apoptosis, pyroptosis and necroptosis) and inflammation. Caspase deficiency has been identified as a cause of tumour development. Due to the results of the cellular inhibitor performance in tumor cell lines and because of

their prominent antioxidant activity, the EO may present aggressive activity on DNA from healthy cells (GOODSELL, 2000) Some plants EO induces cell death through intrinsic (mitochondrial) and extrinsic apoptotic pathway revealing that apoptotic activity was by ROS accumulation. EO induced apoptosis was found to be due to the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), increase in Bax/Bcl-2 ratio (correlated with age and tumor location), release of cytochrome c and activation of the proteases caspases (cleaved form of caspase-3, caspase-8, caspase-9) Some studies have shown an isolated component of the EO – such as citral and 1,8-cineole, and link its effects on the induction of apoptosis by the colorimetric measurement of caspase-3 (CHA et al., 2009; CHA; KIM; KIM, 2010; DUDAI et al., 2005; LIN; DAI; CUI, 2017; PAVITHRA; MEHTA; VERMA, 2017).

The objective of this work was to investigate the inhibitory potential of essential oils extracted from leaves and flowers of *L. alba* against the coagulant and thrombolytic activities induced by *Lachesis muta muta* and *Bothrops moojeni* snake venoms and to evaluate if they exhibit any protective or toxic activity on DNA from human leukocytes.

2. Materials and methods

2.1 Plant material and venoms

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown leaves and inflorescences were collected at the Campus of the Federal University of Lavras (Latitude 21 ° 13 'S, Longitude 44 ° 58' W and average altitude of 915 m) in the morning period during September 2016, in days without precipitation. Exsicta ESAL 23870.

The oil extraction and characterization were performed according to Camargo et al. (2017). Essential oil were stored at 4°C and diluted in DMSO: PBS - phosphate buffered saline (1:1, v:v).

The venoms used as source of enzymes to induce different activities were purchased commercially from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). The venoms were weighed and dissolved in PBS, pH 7.4, to perform the assays.

The venoms were previously evaluated in different doses in order to define the minimum doses inducing adequate for each activity.

2.2 Thrombolytic and Clotting activities

Blood samples from healthy volunteers were collected without anticoagulant in BD Vacutainer® for thrombolytic test (CINTRA et al., 2012), 100 μL blood were distributed in each well of microplate. After clotting, 30 μL of samples (*Bothrops moojeni* or *Lachesis muta muta* venom plus different volumes of essential oils (0.05, 0.1, 0.3, 0.6, and 1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$), incubated for 10 minutes at 37°C) were placed on thrombus and incubated for 24 hours at 37°C in a cell culture chamber. Controls containing only thrombus, and thrombus incubated only with venoms or only with oils were also made. Free thrombus volumes were aspirated and quantified.

Clotting test were performed with citrated human plasma according to Miranda et al. (2016), with modifications in the venoms used to controls and volumes of oils evaluated. The difference of 10 seconds between times observed in controls and in the treatments was considered as significant once the prothrombin activation occurs in 10 to 14 seconds.

This study was approved by the Committee of Ethics in Research with Humans of the UFLA and filed with the number 2.376.107.

2.3 Comet assay

To evaluate damage in DNA from human leukocytes comet assay was performed. Blood aliquots were added with EO at volumes of 3 or 6 $\mu\text{L mL}^{-1}$, remaining at 37°C for a period of 3 hours in a cell culture chamber. A cell

suspension of approximately 10^6 cells mL^{-1} was used to obtain up to 10,000 nucleotides of leukocytes per slide. Blood of three volunteers was used in independent experiments in which they were evaluated and classified 300 nucleoids by treatment, totalizing 900 nucleoids by treatment.

The 1% low melting point (LMP) agarose, stabilized at 40°C , was used to include the leukocytes previously treated and fix these cells on the slides. The mixtures of 25 μL of each incubation solution plus 75 μL of LMP agarose were homogenized and placed on slides previously covered with 1.5% normal melting point (NMP) agarose. The slides were stored at 4°C for 10 minutes and then immersed in lysis solution (0.25 M NaCl; 100 mM EDTA; pH 10; 1% Triton X-100; 5% DMSO) for two hours. Then, the slides were kept in the electrophoresis solution (1 mM EDTA; 30 mM NaOH, pH 13) for 20 minutes at 4°C , and submitted to electrophoretic run carried out at 25V, 300mA for 35 minutes.

After the run the slides remained in a neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) for 30 minutes. The DNA molecules contained in the slides were then precipitated with absolute ethanol. The staining was performed with 40 μL /slide of propidium iodide solution at 2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Comet patterns were analyzed by visual scores and classified according to fragmentation levels. For additional positive control, Doxorubicin was used in the concentration of 100 $\mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ (MARCUSSE et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

The procedures described above were carried out in dark conditions since light irradiation causes death of lymphocytes by apoptosis (CHEN et al., 2015).

Comet standards were analyzed by visual scores according to Collins et al. (1997), with minimal modifications. The cells analyzed were classified by DNA injury extent in 5 classes: class 0, without damage (damage < 5%); class 1, low level of damage (5-20 %); class 2, medium level of damage (20-40 %); class 3, high level of damage (40-85 %) and class 4, totally damaged (damage >

85%). The average frequency of damage was calculated from the sum of the percentages of nucleoids with damage 1, 2, 3 and 4. In order to perform comparative analysis, data were calculated with arbitrary units (AU) as described by Collins et al. (1997). The arbitrary units (0-400; where 0 = no damage and 400 = 100% damage) were calculated by the equation (1 x number of nucleoids grouped in class 1) + (2 x number of nucleoids in class 2) + (3 x number of nucleoids in class 3) + (4 x number of nucleoids in class 4).

2.4 Statistics

Statistical analysis was carried out by One-way analysis of variance (ANOVA) test using a R Core Team (TEAM, 2013) and the significance of the difference between means was determined by Scott-Knott test at ($P < 0.05$) significant level. Analysis was carried out in triplicate and mean \pm SD of three parallel measurements.

3. Results and Discussion

The constituents identified in *L. alba* leaves and inflorescence EOs characterization are presented in Table 1.

Table 1: Chemical constituents of the essential oils of flowers and leaves of *Lippia alba*.

Essential oil %	Compound	RI
Flower		
9.1	ρ -Cimene	1026
0.06	Limonene	1029
5.16	γ -Terpinene	1058
32.75	Neral	1239
49.83	Geranial	1269
2.07	D-Germacrene	1481
1.03	α -Elemol	1550
Leaf		
0.13	α -Thujeno	924
1	Sabinene	972
*	ρ -Cimene	1.025
18.03	Limonene	1.028
5.02	γ -Terpinene	1.057
31.02	Neral	1.238
38.06	Geranial	1.268
3.17	D- Germacrene	1.480
3.52	α -Elemol	1.549

*Traces: (less than 0.1%)

By hydrodistillation technique Stashenko, Jaramillo, Martínez, (2004) found more than 40 constituents in the EO of *L. alba* leaves, with carvone (57%) and limonene (37%) being the major components. They also reported that when they used the Headspace technique, they found limonene (77%) as the major constituent in the same sample analyzed. In that study the carvone presented in the proportion of 14%. This suggests that the method employed interferes with the profile of the results obtained. Here, the leaves did not present carvone and limonene appeared in 18% of the OE.

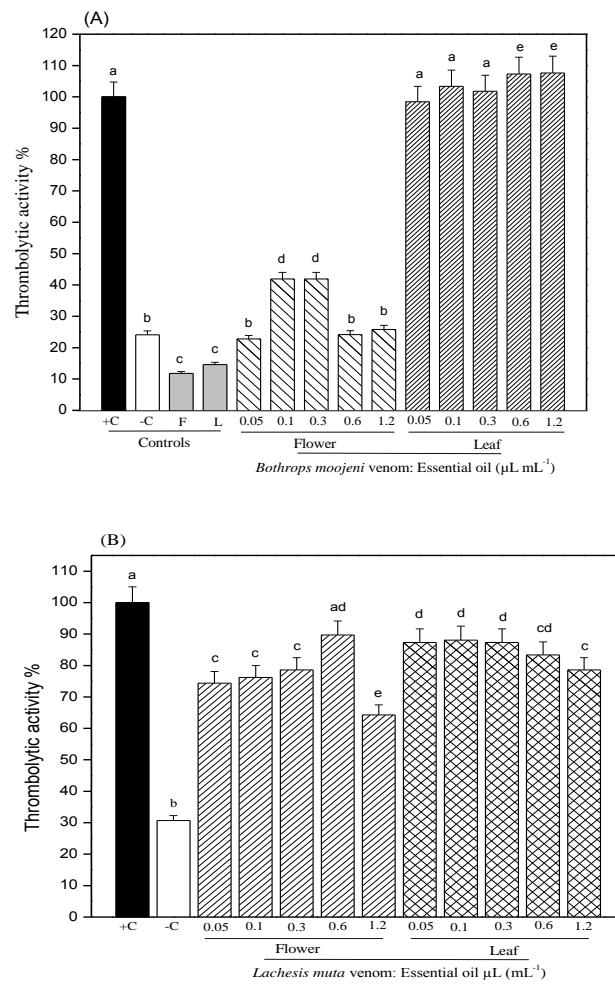
To demonstrate the interference of the plant culture site in the component profile and its proportions in the OEs (TOMAZONI et al., 2016), analyzed

Lippias from 4 different cities of Rio Grande do Sul, Brazil. Its main components were camphor in two of the samples, linalool and citral in the others. In the present study camphor and linalool are not present constituents. The profile of constituents modulates the biological properties performed by the OEs and suggests different enzymatic interactions in the metabolism (BAKKALI et al., 2008). In plant tissue culture three different strains of *Lippia* produced different profile of components and responded differently to changes in CO₂ concentrations. In this study the results support the understanding of the metabolic routes of monoterpene synthesis and the modulation of enzymatic translation/ transcription from environmental effects (BATISTA et al., 2017).

Citral-a (Geranial) and citral-b (Neral) are isomers commonly found in *Lippias*. The presence of this component has sedative, neuroleptic effects and appears to increase the half-life of barbiturates in tests with mice. This property corroborates the traditional use (VALE et al., 2002). Similar to the present work, SOARES et al. (2017) found carvone as the major constituent (61.7%) and attributed to it changes in glucose levels, overall leukocyte count, neutrophils, lymphocytes and eosinophils. The authors reported that this OE causes severe histopathological and hematological changes in the fish *Colossoma macropomum* (tambaqui).

L. alba's EO had different effects on the thrombus induced by the venoms of *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta*. Figure 1 presents the results of the controls (*Lippia* OE, PBS and venoms) and incubated.

Figure 1: Activity on human blood thrombi. (A) Thrombolytic activity of essential oils from *Lippia alba* flower and leaf and activity induced by *Bothrops moojeni* venom. (B) Effect of essential oils on the thrombolytic activity induced by *Lachesis muta* venom.



(+)C: Positive Control: $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *Bothrops moojeni* or *Lachesis muta* venom; (-)C: Negative Control: PBS; *Lippia alba* flower and leaf essential oil (F and L; $1.2 \mu\text{L mL}^{-1}$). Incubated: Venoms + essential oils at different ratios. Each letter statistically differs ($p < 0, 05$) using Skott-Knott test.

Previous incubation of the *L. alba* leaves EO with the *B. moojeni* venom presented a procoagulant activity at the doses of 0.6 and 1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. However, *L. alba* flower EO presented thrombolytic activity at doses of 0.1 and 0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figure 1A). This may be due to the presence of several components such as ρ -cymene in the flowers and limonene in the leaves. *L. alba* OEs presented activity in all the doses tested, being the dose of 1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of OE from flowers more efficient in inhibiting the enzymes present in *L. muta* venom (Figure 1B).

The clotting activity induced by *B. moojeni* and *L. muta. muta* venoms were inhibited by *L. alba* flower and leaf OE (Table 2). The partial inhibitory effect may be related to the volumes of oils used (chosen based on the limitations of the method to the use of compositions of low polarity), incubation time with the venoms and varied composition of the venoms and oils.

Table 2: Effect of essential oils from *Lippia alba* on clotting time of human citrated plasma induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms.

Samples <i>Lippia alba</i> oil ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Clotting time (s)	
	<i>B. moojeni</i> venom	<i>L. muta. muta</i> venom
Control (without oil)	66.66 \pm 2.1	61.33 \pm 2.1
Leaf	0.05	78.6 \pm 1.5 ^a
	0.1	47.6 \pm 1.2 ^b
	0.3	44.0 \pm 2.0 ^b
	0.6	45.6 \pm 1.5 ^b
	1.2	44.3 \pm 0.6 ^b
Flower	0.05	57 \pm 1.2 *
	0.1	65.6 \pm 1.2 *
	0.3	57.0 \pm 1.7 *
	0.6	52.3 \pm 2.5 ^b
	1.2	46.3 \pm 2.5 ^b

Data represent means of triplicate and standard derivation. For each treatment of oil plus each venom analyzed, the means followed by the "a" (in anti-clotting action) or "b" (pro-clotting action) letter, differ significantly from control at 5% probability by Scott-Knott Test. *Do not differ significantly from control at 5% probability by Scott-Knott Test.

The data of *L. alba* OEs in contact with *B. moojeni* venom presented in Table 2 show a procoagulant action previously reported in the literature by Miranda et al. (2014) when evaluating *Hedychium coronarium* essential oil. This can occur due to the structural variability of molecules, mainly of hydrophobic character, present in essential oils. The results suggest that the oils may interact with plasma proteins involved in the coagulation cascade, making them more susceptible to the proteolytic action of the venoms, and as a consequence, accelerate the plasma coagulation. This interaction probably occurs between the individual constituents of the essential oils and proteins, such as thrombin, fibrinogen or fibrin, which are the main targets of the coagulant toxins, thus acting as procoagulants. For *L. muta. muta* the clot formation time was prolonged, and the oils could be considered as potential anticoagulants or inhibitors of coagulant proteases. *L. muta. muta* and *B. moojeni* venoms have different constitutions and, consequently, their toxins have different mechanisms of action.

However, both venoms evaluated act on the blood clotting cascade, inducing coagulation in the absence of calcium, mainly due to the action of serine proteases. EOs were able to modulate enzymatic activity and alter their *in vitro* performance. These findings suggest possible interactions between the terpene compounds present in the oils and proteases present in the venoms. Considering the different coagulation times obtained with the different oils and different venoms, it was not possible to detect an inhibition pattern, so that several terpenes may have been responsible for specific interactions with different toxins present in the evaluated venoms. The enzymatic inhibition can be attributed to the sesquiterpenoid (D-Germacrene and α -Elemol) content present in the *L. alba* OE, since there was an elongation of the coagulation time in *L. muta. muta* venom test. This sesquiterpenoid content was only 3.10% for flower and 6.69% for leaf. A Genotoxicity analyzes (Comet assay) are presented

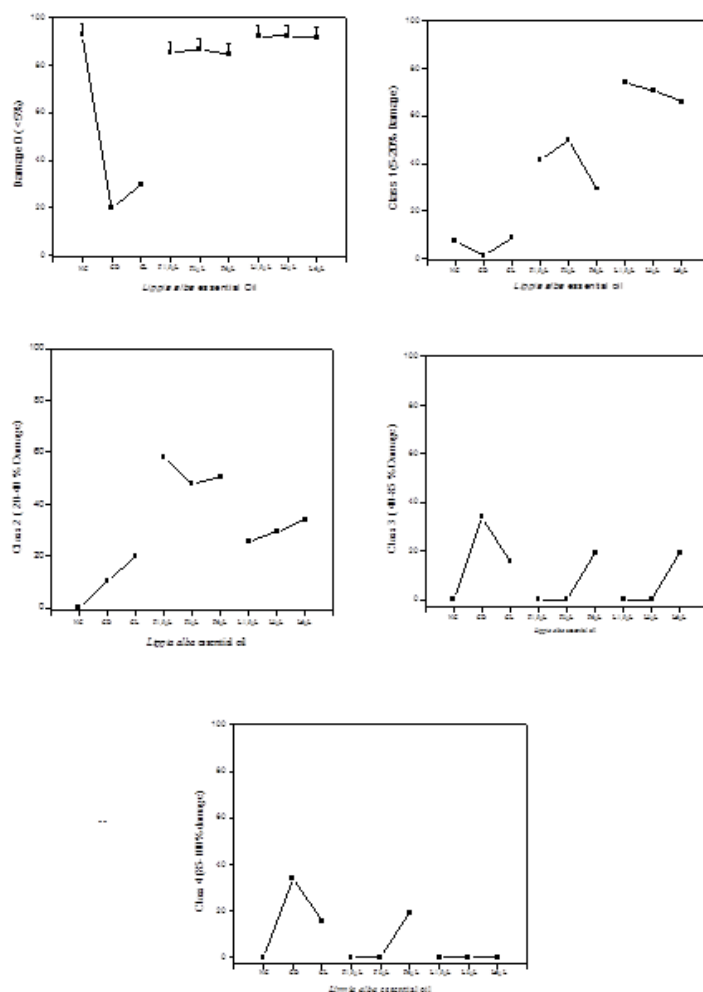
in Table 3 and Figures 2 and 3.

Table 3: Effect of *Lippia alba* EO on DNA from human blood leukocytes.

Amount ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Samples	Damage frequency (%)	Arbitrary units; A \pm SD
	(-) C	7.1	28.3 \pm 8.02 ^a
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	(+) CD	80.3	321.3 \pm 45.4 ^b
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	(+) CL	70.7	282.7 \pm 33.8 ^b
1.5	Flower EO	14.4	57.8 \pm 6.15 ^c
3.0		13.3	53.3 \pm 2.31 ^c
6.0		15.4	61.7 \pm 3.51 ^c
1.5	Leaf EO	7.7	30.7 \pm 4.16 ^a
3.0		7.6	30.0 \pm 3.60 ^a
6.0		8.4	33.0 \pm 5.6 ^a
1.5	<i>L.muta muta</i> + Flower EO	58.8	235.0 \pm 11.31 ^b
3.0		26.8	107.0 \pm 4.24 ^d
1.5	<i>L.muta muta</i> + Leaf EO	14.5	58.0 \pm 1.41 ^c
3.0		11.6	46.5 \pm 6.36 ^c

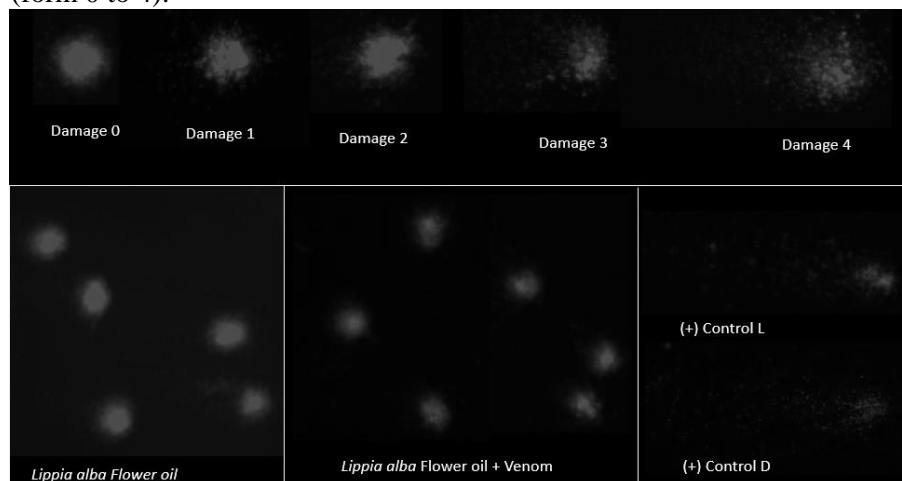
(+) CD: Positive Control Doxorubicin; (+) CL: Positive Control *Lachesis muta muta* venom, (-) Negative control (PBS); EO: Essential oil. A \pm SD: Average of arbitrary units corresponding to triplicates obtained in three independent assay \pm Standard Deviation. Each letter differs significantly ($p < 0.05$) by Skott-Knott Test. * *Lippia alba* flower oil tested 1.5 and 3.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ only because of small amount of oil available.

Figure 2: Effect of *Lippia alba* flower and Leaf EO on DNA from human blood leukocytes. Percentage of nucleoids in the different comet classes corresponding to the varying degradation levels of the DNA molecules.



Data represent average of values obtained from triplicate assays where were evaluated 300 nucleoids/treatment/assay. Comet were classified according to Collins et al. (2004). NC: negative control (PBS); +CD: positive control (Doxorrubicin, $100\mu\text{g mL}^{-1}$); +CL: positive control (*Lachesis muta muta* venom, $50\mu\text{g mL}^{-1}$). O+V: Oil + *L. muta*. Venom. Each letter statistically differs ($p < 0, 05$) using Skott-Knott test.

Figure 3: Comet assay (single cell gel electrophoresis) in human blood leukocytes. Demonstrative images of scores observed in different Damage Classes (form 0 to 4).



(+)CL: Positive Control with *Lachesis muta muta* 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (+) CD: Positive Control with Doxorubicin 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Damage to DNA evaluated by the alkaline comet method is widely used in genotoxicity tests and mechanisms of DNA damage and repair. This assay enables alkaline pH treatment and electrophoresis to detect DNA single- or double-strand breaks, which are alkaline-labile sites, through the alkylation of electronegative DNA groups and cross-links (Collins, 2004). *Lippia's* EO was chemically characterized through GC-MS and then the authors evaluated their anesthetic activity and genotoxicity in fish and mammals (KAMPKE et al., 2018). They reported to the anesthetic activity that there was no difference between the control and treatment neither at 300 mgKg⁻¹ when evaluated by the methods of inhalation or gavage. Higher percentage of damage was found in fish than in mammals, possibly due to the action of the immune system since they detected inhibition of nitric oxide (NO) release (KAMPKE et al., 2018).

Here leaf EO presented damage similar to negative control (PBS). When EOs were tested in combination with venom, they presented a protective role for

DNA. It can be observed (Figure 3) the enzymatic inhibition when these were associated with 1.5 μ L and 3 μ L mL⁻¹ of leafs EO.

If we analyzed the doses tested, in the work of these authors (KAMPKE et al., 2018), mice weight was 32.5 \pm 3.43g (A \pm SD). In terms of amount of oil it means 2.9 to 10.7g. Here with *in vitro* assay and dose of 1.5 and 3 μ L mL⁻¹ caused different effects. It is suggested that *in vitro* assay does not have all the immunological signaling and chemotaxis issues that a xenobiotic agent produces in a living organism.

Highlight, our study is the first to present experimental genotoxicity data using the alkaline comet assay in *L. alba* leaf and flower EO. The alkaline comet provides considerable advantages over conventional cytogenetic methods such as chromosomal aberrations, sister chromatid exchange and micronucleus test used to detect damage in DNA, because for the comet assay, cells need not be mitotically active (ALI; KUMAR, 2008).

The natural inhibitors act on PLA₂s and proteases through different mechanisms, most of them still not completely understood, including binding to specific domains in the enzymes structures and forming complexes with divalent ions (Silva et al., 2008). Several substances have been evaluated regarding their effects against snake venoms and isolated toxins, including plant extracts and compounds from mammals and snakes serum plasma, in addition to poly or monoclonal antibodies and several synthetic molecules. Research involving these inhibitors may be useful to understand the mechanism of action of different classes of enzymes and their role in envenomations caused by snake bite. Furthermore, the biotechnological potential of inhibitors may provide therapeutic molecular models with antiophidian activity to supplement the conventional serum therapy against these multifunctional (OLIVEIRA et al., 2016).

4. Conclusion

The essential oils of *Lippia alba* showed modulatory effects (through inhibition or potentiation) on the biological activities induced by *Lachesis muta muta* e *Bothrops moojeni* venoms, highlighting their anti-genotoxic potential, and modulator of hemostasis-related processes. These results would suggest the benefits of using both oils of preparations as natural source of antioxidants and possible protective action against DNA damage.

Aknowledegment

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

5. References

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity, **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21, n.2, p.143–152, abr., 2013.

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

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446–475, fev., 2008.

BATISTA, D. S. et al. Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.128, n.2, p.357–368, fev., 2017.

CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth, **American Journal of Plant Sciences**, v.8, n.11, p.2871–2877, 2017.

CHA, J.-D. et al. Essential Oil of Artemisia Capillaris Induces Apoptosis in KB Cells via Mitochondrial Stress and Caspase Activation Mediated by MAPK-Stimulated Signaling Pathway. **Journal of Food Science**, v.74, n.9, p.75–81, nov. 2009.

CHA, J.-D.; KIM, Y.-H.; KIM, J.-Y. Essential oil and 1,8-cineole from Artemisia lavandulaefolia induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. **Food Science and Biotechnology**, v.19, n.1, p.185–191, fev., 2010.

CHEN, L. et al. Edaravone protects human peripheral blood lymphocytes from γ -irradiation-induced apoptosis and DNA damage. **Cell Stress and Chaperones**, v.20, n.2, p.289–295, mar., 2015.

CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v.60, n.1, p.70–82, jul., 2012.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.30, n.2, p.139–146, 1997.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, n.3, p.249–261, 2004.

DUDAI, N. et al. Citral is a New Inducer of Caspase-3 in Tumor Cell Lines. **Planta Medica**, v.71, n.5, p.484–488, mai., 2005.

ENDRIS, A.; ASFAW, N.; BISLAT, D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Lippia javanica* leaves from Ethiopia. **Journal of Essential Oil Research**, v.28, n.3, p.221–226, mai., 2016.

GOODSELL, D. S. The Molecular Perspective: Caspases. **The Oncologist**, v.5, n.5, p.435–436, out., 2000.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.59, p.163–171, abr., 2018.

MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v.65, p.9–14, abr., 2013.

MATESANZ, S.; GIANOLI, E.; VALLADARES, F. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1206, n.1, p.35–55, set., 2010.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Antifungal Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Lippia alba* (Miller) N.E Brown Grown in Different Regions of Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n.6, p.568–574, nov., 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. **Journal Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.20, p.1-3, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

MISHRA, R. K. et al. Analysis of Linalool Content in the Inflorescence (Flower) Essential Oil and Leaf Oil of *Lippia alba* Cultivar “Kavach”. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n.1, p.3–7, jan., 2010.

MONTERO-VILLEGAS, S. et al. Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v.30, n.3, p.167–181, mai., 2018.

OLIVEIRA, C. H. M. et al. Inhibition of proteases and phospholipases A2 from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.3, p.2005–2016, out., 2016.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, A.; VERMA, R. S. Induction of apoptosis by

essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, nov. 2017.

PEREIRA, L. L. S. et al. Application of Comet assay to assess the effects of white bean meal on DNA of human lymphocytes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.1, p.103–108, mar., 2012.

SILVA, A. C. C. et al. HS-SPME as an efficient tool for discriminating chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**, ago., 2016.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v.38, n.1, p.107–112, 2008.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v.234, p.49–56, jan., 2017.

SOUZA, C. et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.44, n.1, p.21–34, fev., 2018.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of chromatography. A**, v. 1025, n. 1, p. 93–103, 30 jan. 2004.

TEAM, R. C. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>> acessado em: 15 jan. 2017

TOMAZONI, E. Z. et al. In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n.2, p.999–1010, mai., 2016.

VALE, T. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v.9, n.8, p.709–714, jan. 2002.

VILJOEN, A. M. et al. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.1-2, p.271-277, jan., 2005.