



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MATEUS RAMOS PLUTARCO LIMA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE POR DOSE ÚNICA E DOSES REPETIDAS DE
FORMULAÇÕES DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM.**

FORTALEZA

2022

MATEUS RAMOS PLUTARCO LIMA

AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE POR DOSE ÚNICA E DOSES REPETIDAS DE
FORMULAÇÕES DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Linha de Pesquisa: Terapêutica Clínica e Experimental Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles

Co-orientadora: Profa. Dra. Vilma de Lima

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P789a Plutarco Lima, Mateus Ramos.
Avaliação de toxicidade por dose única e doses repetidas de formulações de dentifrícios fluoretados contendo óleo essencial contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham / Mateus Ramos Plutarco Lima. – 2022.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.
Coorientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.
1. Dentifrícios. 2. Óleos voláteis. 3. Testes de toxicidade. I. Título.

CDD 617.6

MATEUS RAMOS PLUTARCO LIMA

AValiação DA TOXICIDADE E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DE MUCOSA ORAL
DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA
SIDOIDES CHAM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica. Linha de Pesquisa: Terapêutica Clínica e Experimental Aplicada.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Sá Roriz Fonteles(Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza

Prof^ª. Dr^ª Rebeca Bastos Vasconcelos Marinho
Unichristus - Fortaleza

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE) - Fortaleza

Dedico,

À MINHA FAMÍLIA,

Minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Às **minhas orientadoras**, Profa. Dra. **Cristiane Sá Roriz Fonteles** e Profa. Dra. **Vilma de Lima**, por orientarem com tanta atenção, zelo e paciência esta pesquisa. Sou, e sempre serei, eternamente grato por tudo que aprendi.

Aos **animais**, que doaram suas vidas para que essa pesquisa pudesse ocorrer.

Aos **Meus Pais Antônio e Solange**, e **meus irmãos Tiago e Mariana** por todo o apoio e amor incondicional.

A **Profa. Dra. Rebeca Bastos Vasconcelos Marinho** e **Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, por aceitarem o convite de fazer parte da banca avaliadora do Trabalho.

Ao Prof. Dr. Said Fonseca, por contribuir com o trabalho na manipulação das formulações utilizadas na pesquisa

Ao **Programa de pós-graduação em Odontologia da UFC** pela formação educacional e aprendizados.

Ao **Laboratório de Osteofarmacologia (LOF)/Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)**, onde desenvolvi esta pesquisa e conheci a dinâmica do meio científico.

A todos os amigos e colegas do **Laboratório de Osteofarmacologia, Sâmia, Camila, Rose, Mickael, Rafael, Noa e Hélio**, que tanto me ajudaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado

Aos amigos do Grupo de pesquisa a professora Cristiane, **César, Bianca, Henrique, Grisiele e Renata** pelo carinho e acolhimento

Aos **profissionais do Biotério Eduardo Torres**, em especial, **Wesley Ribeiro** e **Augusto César**, por me acolherem e me ensinarem sobre o manejo e respeito com os animais.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** do governo brasileiro, que subsidiou toda essa pesquisa (Edital Universal 428380/2016-6 concedido à Profa. Vilma de Lima)

A todos aqueles que participaram direto e indiretamente da confecção deste trabalho, agradeço muito a todos, sem vocês este trabalho não existiria.

RESUMO

Dentifrícios são materiais cosméticos comumente utilizados na higiene bucal diária. Antes de serem disponibilizados para o consumo, faz-se necessário a realização de testes de segurança para avaliar sua toxicidade, além disso o desenvolvimento de novos produtos com propriedades antimicrobianas têm ganhado cada vez mais espaço, frente ao aparecimento de microrganismos resistentes aos fármacos atualmente disponíveis. Nesse cenário, a associação de óleos essenciais de plantas, com propriedades antimicrobianas a produtos de higiene bucal surge como alternativa promissora para o desenvolvimento de novos produtos no controle da cárie dentária, bem como no controle da doença periodontal e outras infecções orais biofilme dependentes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade por dose única e repetidas de formulações diluídas de dentifrícios fluoretados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (OELS-500: 1% do óleo de *Lippia sidoides* (OELS), 500 ppm de flúor, lauril sulfato de sódio (LSS) como surfactante e xilitol como edulcorante; OELS-1000: 1% OELS, 1000 ppm de Flúor, LSS e eritritol; 1,5OELS-500: 1,5% OELS, 500 ppm de Flúor, LSS e eritritol) em ratos *Wistar* de ambos os sexos. As toxicidades dos dentifrícios foram avaliadas em dose única (fase aguda) e por doses repetidas, durante 28 (fase subcrônica), conforme os protocolos números 423 e 407 estabelecidos pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), respectivamente. Após os ensaios, todos os animais foram submetidos à autópsia para as análises histológicas, dosagens séricas bioquímicas, além de leucograma e variação de massa corporal. Como resultados observamos que na fase de dose única formulação de dentifrício 1,5OELS-500 apresentou os melhores resultados de toxicidade quando comparados ao grupo *naïve* em relação aos parâmetro bioquímicos, a qual foi selecionada para a fase de dose repetida. Na fase subcrônica, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos testes, controle e *naïve* em relação as dosagens bioquímicas. Os resultados sugerem segurança dessas formulações nas fases de estudo analisadas, pois além de não terem sido observadas mortes durante o tempo de experimentação, a maior parte das análises não apresentou alteração dos parâmetros biológicos entre os grupos testes e grupo controle. No entanto, faz-se necessário mais estudos de segurança para avaliação das formulações antes de serem iniciados os testes clínicos em humanos.

Palavras chave: Dentifrícios. Óleos voláteis. Testes de Toxicidade..

ABSTRACT

The development of new products with antimicrobial properties has gained more and more marketing space, due to the emergence of microorganisms resistant to currently available drugs. In this scenario, the association of essential oils to oral hygiene products that are derived from plants and retain antimicrobial properties appears as a promising alternative for the development of new products in the control of dental caries, as well as in the control of periodontal disease and other biofilm-dependent oral infections. Toothpastes are cosmetic products commonly used for daily oral hygiene. Before being made available for commercial purposes and human consumption, safety tests are warranted to evaluate their toxicity. The present study aimed to evaluate the toxicity of single and repeated doses of diluted formulations of fluoride toothpastes containing essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (OELS-500: 1% oil of *Lippia sidoides* (OELS), 500 ppm of fluorine, sodium lauryl sulfate (LSS) as surfactant and xylitol as sweetener; OELS-1000: 1% OELS, 1000 ppm of Fluorine, LSS and erythritol; 1.5OELS-500: 1.5% OELS, 500 ppm of Fluoride, LSS and erythritol) in Wistar rats of both sexes. The toxicity of toothpastes was evaluated in single (acute phase) and repeated doses, during an observation period of 28 days (subchronic phase), according to protocols numbers 423 and 407 established by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), respectively. After the tests, all animals were submitted to autopsy for histological analysis, biochemical serum dosages, in addition to leukogram and body mass variation. As a result, we observed that in the single dose phase, the 1.5OELS-500 dentifrice formulation presented the best toxicity results related to biochemical parameters, when compared to the naïve group. This formulation was selected for the repeated dose phase. In the subchronic phase, no significant differences in biochemical analysis were observed between the test, control and naïve groups. These results suggest the safety of these formulations in the analysed phases of the study, since in addition to not having observed animal deaths during the experimental phase, most of the analysis did not show any change in the biological parameters between the test groups and the control group. However, further safety studies are needed to evaluate the formulations before starting clinical trials in humans.

Keywords: Dentifrices. Oils, volatile. Toxicity Tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Tansaminase Hepática Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Transaminase Hepática Aspartato Aminotransferase
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (do inglês: Bone Morphogenetic
IP	Intraperitonal
LSS	Lauril sulfato de sódio
OE	Óleos Essenciais
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OELS	Óleo Essencial de <i>Lippia sidoides</i> Proteins)
VO	Via Oral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma do teste de toxicidade aguda segundo o <i>guideline</i> 423 da OECD.....	36
Figura 2 – Ganho de peso ponderal durante os 14 dias de observação,	39
Figura 3 – Fotomicrografias de fígados corados com Hematoxicilina-Eosina – Fase Dose única Gráficos referentes às contagens de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos na fase de toxicidade aguda.....	41
Figura 4 – Fotomicrografias de rins corados com Hematoxicilina-Eosina – Fase Dose única	41
Figura 5 – Gráficos referentes às contagens de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos na fase de toxicidade aguda	43
Figura 6 – Gráficos referentes às análises bioquímicas de AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Proteínas Totais na fase de toxicidade aguda	45
Figura 7 – Gráficos referentes às análises bioquímicas de uréia e creatinina na fase de toxicidade aguda	46
Figura 8 – Ganho de peso ponderal durante os 28 dias de observação da fase subcrônica	47
Figura 9 – Fotomicrografias de fígados corados com Hematoxicilina-Eosina – Fase Doses repetidas	48
Figura 10 – Fotomicrografias de rins corados com Hematoxicilina-Eosina – Fase Doses repetidas	49
Figura 11 – Gráficos referentes às contagens de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos na fase de toxicidade aguda 1	50
Figura 12 – Gráficos referentes às análises bioquímicas de AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Proteínas Totais na fase de toxicidade subcrônica	51
Figura 13 – Gráficos referentes às análises bioquímicas de uréia e creatinina na fase de toxicidade subcrônica	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais componentes do óleo essencial de <i>Lippia Sidoides</i>	29
Tabela 2 – Peso relativo dos órgãos de Ratas Wistar tratadas com as formulações A, B e C na dose de 2000 mg/kg	35
Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos de dos ratos avaliados na fase subcrônica.....	40

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	13
1.1.1 HISTÓRICO	13
1.1.2. ÓLEOS ESSENCIAIS	15
1.2 <i>LIPPIA SIDOIDES</i> CHAM.	17
1.3 EDULCORANTES	20
1.4 FLÚOR	21
1.5 ESTUDOS DE TOXICIDADE	23
1.6 TOXICIDADE POR DOSE ÚNICA (AGUDA)	26
1.7 TOXICIDADE POR DOSES REPETIDAS (SUBCRÔNICA)	28
1.8 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE TOXICIDADE	29
2. OBJETIVOS	32
2.1 GERAL	32
2.2 ESPECÍFICOS	32
3. METODOLOGIA.....	33
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
3.2 DESENHO	33
3.3 FORMULAÇÃO DOS DENTIFRÍCIOS	33
3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LIPPIA SIDOIDES</i>	33
3.5 ANIMAIS	34
3.6 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO	35
3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE POR DOSE ÚNICA (AGUDA)	35
3.8 ENSAIO DE TOXICIDADE POR DOSE REPETIDAS (SUBCRÔNICA)	36
3.10 ANÁLISE DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS	37
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	39
4.1 AVALIAÇÃO DE VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL NA FASE AGUDA	39
4.2 EFEITO DO OELS NA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS NA FASE AGUDA	39
4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS NA FASE SUBCRÔNICA	40
4.3 EFEITO DO OELS NO LEUCOGRAMA NA FASE AGUDA	41
4.4 EFEITOS DO OELS NOS PARÂMETROS HEPÁTICOS NA FASE AGUDA	43
4.5 EFEITO DO OELS NOS RINS NA DA FASE AGUDA	45

4.6 AVALIAÇÃO DE VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL NA FASE SUBCRÔNICA	45
4.7 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS NA FASE SUBCRÔNICA	46
4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS NA FASE SUBCRÔNICA	47
	47
4.8 EFEITO DO OELS NO LEUCOGRAMA NA FASE SUBCRÔNICA	48
4.9 EFEITOS DO OELS NOS PARÂMETROS HEPÁTICOS NA FASE SUBCRÔNICA	49
4.10 EFEITO DO OELS NOS RINS NA DA FASE SUBCRÔNICA	51
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1.INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

1.1.1 Histórico

O ser humano utiliza plantas como forma de medicamento para prevenção e tratamento de comorbidades desde o princípio da história das primeiras civilizações humanas. A fitoterapia é um campo da medicina que usa plantas para tratar doenças ou como agentes promotores de saúde. O uso tradicional de produtos naturais geralmente preserva a composição original e a integridade da planta de origem, na utilização para fins medicinais desta como um todo, ou de uma porcentagem desejada de seus componentes minimamente processados. (HEISLER *et al.*, 2015).

Alguns documentos relatam que os primeiros recursos terapêuticos eram fabricados a partir de plantas. Muitas vezes, os experimentos para testar a eficiência desses produtos eram realizados a partir do método de tentativa e erro, procedimento que ocasionava muitos fracassos e acarretava mortes. Em outras situações, os experimentos funcionavam e resultavam na melhora dos sintomas ou até mesmo na cura para determinadas doenças, podendo, porém, em alguns casos, produzir severos efeitos colaterais (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018).

Com o tempo, o ser humano passou, então, a descobrir os efeitos das propriedades biológicas das plantas de maneira empírica. A observação da natureza e do comportamento dos animais teve importância nesse processo, pois a percepção de que determinados animais ingeriam algumas plantas específicas em momentos de comorbidades facilitou esse processo de seleção de plantas para tratamentos (LI; WENG, 2017). Conforme o homem foi se desenvolvendo e aprendendo através do processo de evolução, ele foi compreendendo quais plantas poderiam ser utilizadas para medicar determinadas doenças. Dessa forma, algumas sociedades primitivas, que se tornariam grandes civilizações no futuro, passaram a deter o conhecimento do uso de plantas medicinais (TANDOM, 2017).

Existem relatos de civilizações milenares, como os chineses e os egípcios, que descreviam, de forma escrita, documentos, os quais serviam como guias médicos e

farmacêuticos (FERREIRA *et al.*, 2014). A primeira obra escrita, a qual era utilizada como referência para a utilização de plantas medicinais, que se tem registro, data de 2800 A.C., trata-se de um documento chinês intitulado *Pen Ts'ao* (“A Grande Fitoterapia”) escrito pelo imperador chinês Shen Nung. Nesse texto estão descritas 365 ervas, com propriedades medicinais que eram usadas através de inspirações taoísta de *Pan ki*, o Deus da criação. Na mesma época, na Índia, duas obras também relatavam o uso de plantas como tratamento medicinal – a *Veda* (Aprendizado) e a *Ayurveda* (Aprendizado de Longa Vida) (SUJARWO ET AL., 2016).

A civilização egípcia também se destacava por sua medicina e uso de produtos de origem natural para o tratamento de doenças. Documentos datados de 1500 a.C., descreviam informações sobre 811 prescrições e 700 drogas, escritos em uma obra chamada “*Ebers Papyrus*”. Dentre os produtos de origem natural, encontravam-se extratos de plantas, venenos de animais, propriedades de metais como cobre e chumbo. Algumas destas plantas são utilizadas até os dias atuais, como é o caso da *Ginseng* (*Panax spp.*) e a *Ephedra spp.* (SHOJA *et al.*, 2015).

As civilizações gregas e romanas desenvolveram o conhecimento sobre a utilização das plantas a partir do contato com outras civilizações mais antigas. *Pendamius Dioscorides*, que era médico do imperador Nero, publicou uma obra intitulada, *De Materia Medica*, que foi utilizada durante vários séculos tanto pelos gregos como por outras civilizações, como os romanos, os turcos e os árabes. A obra continha 1000 drogas descritas, dentre elas, cerca de 600 eram plantas, como a cicuta (*Canium maculatum*), o cânhamo (*Cannabis sativa*), o cólquico (*Colchicum autumnale*). Havia também o registro do desenvolvimento de anestésicos a partir de mandrágora (*Mandragora officinarum*) e de ópio (ALVES, 2013).

No mesmo período histórico, Plínio, o Velho, desenvolveu uma doutrina que acreditava que para cada doença ou comorbidade, existiria uma planta específica que poderia ser usada para o tratamento. Ele foi o autor da obra *Historia Natural*, que continha 37 volumes com várias menções, descrições e usos para plantas medicinais (BHATTARAM *et al.*, 2002)

1.1.2. Óleos Essenciais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que aproximadamente 80% da população do planeta faz uso de conhecimento prático tradicional em relação à atenção primária em saúde e, quase 90% deste número, utiliza de conhecimento básico em fitoterapia, destacando -se o Brasil nessa prática (BRASIL, 2006).

Os avanços da tecnologia para lidar com a problemática do surgimento de microrganismos, cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais, têm motivado a busca por novas substâncias de origem natural, com eficácia maior ou igual as dos medicamentos habitualmente utilizados (VERAS *et al.*, 2014). Além disso, os medicamentos atualmente disponíveis apresentam uma série de efeitos adversos e novas estratégias são necessárias para melhorar o tratamento (RATES, 2001). Este fato tem estimulado a busca por novos agentes antimicrobianos atóxicos e naturais, que podem ser encontrados em plantas. Óleos essenciais podem ser extraídos de diversos órgãos das plantas tais como flores, sementes, folhas, entre outras estruturas. Vários autores citam que muitos desses óleos possuem atividades antimicrobianas, bem como propriedades antivirais, antimicóticas, antiparasitárias e inseticidas (PEDROI *et al.*, 2018). Assim, o surgimento da fitoterapia despertou o interesse pelos efeitos de extratos vegetais para o controle de placa bacteriana e outras doenças orais (LOBO *et al.*, 2014).

Os Óleos Essenciais (OE) têm sido foco de estudos há várias décadas. Trata-se de líquidos oleosos aromáticos e que podem ser obtidos de diferentes órgãos das plantas, utilizando diferentes técnicas de extração (BURT, 2004; GUENTER, 1948). Esses óleos consistem em uma mistura de constituintes voláteis, agindo como um mecanismo de defesa contra microrganismos, predadores ou mudanças climáticas (BAKKALI *et al.*, 2008). Vários autores citam que muitos desses óleos possuem atividades antimicrobianas, propriedades antivirais (BISHOP, 1995), antimicóticas (AZZOUZ E BULLERMAN, 1982), inseticidas (KONSTANTOPOULOU *et al.*, 1992) e antiparasitárias (PANDEY *et al.*, 2000). Há também relato da ação desses óleos contra bactérias orais (KARYGIANNI *et al.*, 2016). Nesse cenário, OE têm ganhado destaque entre os agentes naturais com atividades antimicrobianas (BASSOLÉ E JULIANI, 2012).

Existem mais de 3000 OE conhecidos, dentre os quais cerca de 300 são utilizados pelas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas (BASSOLÉ E

JULIANI, 2012). Vale ressaltar que medicamentos, materiais, preparações e produtos naturais à base de plantas, contendo sementes, folhas, flores, galhos ou outras partes vegetais, (usadas como ingredientes ativos) são utilizados há mais de 2000 anos para manter a higiene bucal e para prevenir inflamações (VARGHESE *et al.*, 2012; PALOMBO *et al.*, 2011).

O Brasil é um país com uma ampla biodiversidade de plantas. Ele é considerado o maior país no que diz respeito à megadiversidade, tanto em relação ao número de espécies quanto à prevalência delas em toda a extensão do seu território (ALBAGLI, 2001). Essa grande disponibilidade e variedade podem fornecer componentes para a produção e fabricação de produtos originados de recursos vegetais como os fitoterápicos e os fitofármacos. Por conta da variedade dos biomas, muitos deles só são encontrados no Brasil, o País é destaque e tende a se desenvolver como um dos principais produtores no desenvolvimento de medicamentos e produtos de origem vegetal (VILLAS BOÂS; GADELHA, 2007). Esses produtos são formados por micromoléculas de baixo peso molecular, que possuem complexas estruturas, marcantes atividades biológicas e que normalmente são encontrados em concentrações baixas em plantas específicas (POSER; MENTZ, 2004).

O óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*), também conhecida como alfazema, que é amplamente encontrada no sul do país, possui propriedades calmantes para o sistema nervoso central, causando efeitos relaxantes, antiestresse e sedativos. Essas propriedades se devem principalmente aos constituintes principais desse óleo que são o linalol e linalil acetato (BUCHBAUER, 1991). Lee *et al.* (2006) demonstraram que o óleo essencial de lavanda melhorou a qualidade de sono e ajudou no combate à insônia nas mulheres.

Outra planta que possui um óleo essencial com propriedades terapêuticas é o hortelã- pimenta (*Mentha piperita*), conhecido popularmente como menta, planta de origem inglesa, mas que é bastante cultivada no Brasil. Ela possui propriedade antisséptica importante, atuando principalmente contra *Escherichia coli*. O óleo dessa planta também já demonstrou propriedades terapêuticas no combate a problemas digestivos (CAPELLO *et al.*, 2007), à acne e a dermatites (NEUWRTH, CHAVES E BETTEGA, 2015) .

Já o óleo essencial de boldo-do-chile (*Peumus boldus*) demonstrou forte ação no controle de *Candida albican*. Essa planta é amplamente distribuída em todo o território brasileiro e populamente utilizada para o controle de dor abdominal, flatulência e como hepatoprotetor (LIMA *et al.*, 2006)

1.2 *Lippia sidoides* Cham.

O alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham., Verbenacea) é uma arvoreta ou subarbusto que comumente encontra-se em regiões com vegetações próprias de clima semi-árido. As caatingas do Nordeste Brasileiro são exemplos de biomas onde facilmente encontramos plantas dessa espécie. A *Lippia sidoides* Cham. pode alcançar até 2 metros de altura e seu tronco chega a até 8 cm de diâmetro. É comum ela se apresentar com vários ramos, nos quais encontramos folhas com propriedades aromáticas, que possuem tamanhos variados e grosso-serreadas, podendo chegar até 8cm de comprimento, sua forma é ovalada e lanceolada, além disso, elas possuem pequenos pelos revestindo-as e podem possuir pontos glandulosos na porção superior (MATOS E OLIVEIRA, 1998).

As folhas possuem odor aromático semelhante ao timol e sabor picante que é perceptível nas folhas frescas, características o que conferiram a arvoreta o nome de alecrim-pimenta, na linguagem popular. Suas flores são pequenas de tonalidade branca ou amarelada e distribuídas em inflorescências de formato semelhante a pirâmides ou globos partindo de um pedúnculo longo, normalmente, menor que as folhas (MATOS E OLIVEIRA, 1998).

O gênero *Lippia* (Verbenacea) engloba quase 200 espécies, que podem estar distribuídas em diversas regiões do mundo incluindo a América do Sul (AGUIAR *et al.*, 1984). A *Lippia sidoides*, um arbusto muito encontrado no Nordeste do Brasil, contém um óleo essencial rico em timol e carvacrol, que são substâncias com atividade antimicrobianas (BOTELHO *et al.*, 2009).

O óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) apresentou potencial atividade gastroprotetora e anti-inflamatória tópica quando utilizado em diferentes concentrações, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Acredita-se que o maior representante, o timol, seja o responsável pelas propriedades biológicas do OELS, mas isso ainda não havia sido comprovado, pois o óleo essencial pode conter substâncias menores que também podem ser responsáveis pelas atividades biológicas. O óleo essencial de *Cordia verbenaceae*, por exemplo, contém 4,64% de α -humuleno, que é responsável pela atividade anti-inflamatória (DE CARVALHO *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007).

Em estudo feito em 2002 por Costa *et al.*, os pesquisadores analisaram os componentes químicos do óleo de *Lippia sidoides cham.* através do método de análise espectroscópica encontrando um total de 13 constituintes principais: oleanólico, metil-3,4-diidroxibenzoato, lapachenol, tecomaquinona I, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, quercetina, luteolina, glucoluteolina, lippisidoquinona, taxifolina e isolariciresinol.

Estudos identificaram haver propriedades anti-inflamatórias tóxicas e gastroprotetoras no óleo essencial, extraído da folha de *Lippia sidoides* (OELS), testado em camundongos, na presença de doses variadas de 10, 50 e 100 mg/kg. No entendimento dos autores, esses efeitos devem-se à propriedade antioxidante do timol (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Nesse mesmo ano, Fontenelle *et al.* (2007) publicaram resultados da análise por cromatografia gasosa do OELS, onde os autores verificaram seus principais componentes como o p -cimeno, E-cariophileno, mirceno, γ -terpineno e constataram – o timol – como o principal componente do óleo (59,65%). A grande concentração de Timol e Carvacrol encontrada no OELS, revela um OE, de amplo uso na medicina tradicional brasileira, especialmente, pelas comunidades locais pobres do Nordeste, para cortes na pele, picadas de insetos e dor de garganta (LEMOS *et al.*, 1990).

Os OE são ricos em timol e carvacrol, que são substâncias com atividade antibacteriana (BOTELHO *et al.*, 2009), eles são isômeros e fazem parte do grupo dos terpenos que correspondem a uma classe de substâncias químicas que se derivam do metabolismo secundário dos vegetais, cuja origem vem de unidades de isopreno (C_5H_8) que possui em sua maior parte forma de estrutura cíclica. O timol que também é conhecido como 2-isopropil-5-metilfeol se caracteriza como um monoterpene tenco como seu isômero o carvacrol, eles possuem odor agradável- e são solúveis em alguns solventes orgânicos (LIMA *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que esta planta, rica

nesses terpenos, possui atividade inseticida contra *Lutzomyia longipalpis*, vetor de leishmaniose visceral (MACIEL *et al.*, 2009), ação larvicida contra *Aedes aegypti* (COSTA *et al.*, 2005), atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi* (BORGES *et al.*, 2012) e propriedade anti-inflamatória em camundongos (VERAS *et al.*, 2012). Estudos in vitro de *L. sidoides* também revelaram atividade antifúngica contra *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* (FONTENELLE *et al.*, 2007) e atividade antibacteriana contra *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Yersinia enterocolitica* (CASTRO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Alguns estudos já demonstraram que o timol e o carvacrol possuem efeitos sinérgicos em relação às suas propriedades antimicrobianas (VALE *et al.*, 2021; SOUSA SILVEIRA *et al.*, 2020). Uma mistura timol-carvacrol foi altamente eficaz em redução da *S. mutans* na saliva, mas sua eficácia não foi superior ao OELS nas formulações de enxaguante bucal e gel com o maior percentual de redução de *S. mutans*, demonstrando uma estreita associação entre a eficácia antimicrobiana deste óleo essencial e da ação de seus principais constituinte, timol e carvacrol. Estes resultados confirmaram que o OELS apresenta um espectro antibacteriano, principalmente, gram-positivo e uma ação limitada contra bactérias gram-negativas (BERTINI *et al.*, 2005). Além disso, estudos realizados com os principais constituintes do OELS, timol e carvacrol, demonstraram uma excelente atividade antimicrobiana destes compostos contra patógenos envolvidos no processo de cárie dentária (LOBO *et al.*, 2011). Uma mistura timol-carvacrol foi altamente eficaz em redução da *S. mutans* na saliva, mas sua eficácia não foi superior à *Lippia sidoides* nas formulações de enxaguatório bucal e gel com o maior percentual de redução de *S. mutans*, demonstrando uma estreita associação entre a eficácia antimicrobiana deste óleo essencial e da ação de seus principais componentes. Estes resultados confirmaram a *Lippia sidoides* como tendo um espectro antibacteriano, principalmente, gram-positivo, além de uma ação limitada contra bactérias gram-negativas (LOBO *et al.*, 2014).

Em uma pesquisa realizada, verificou-se que um enxaguatório bucal preparado com o óleo essencial dessa planta reduziu o crescimento de bactérias-placa em humanos e alterou a resposta clínica e histológica no periodonto de cães com gengivite marginal (MONTEIRO *et al.*, 2007). O óleo essencial dessa planta também possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e gastroprotetoras (FREIRES *et al.*, 2015), e o OELS

contém constituintes voláteis, os quais estão relacionados a uma ação biológica intrínseca e, portanto, poderiam ser empregados na produção de formulações clínicas para uso odontológico.

1.3 Edulcorantes

Edulcorantes também conhecidos como adoçantes são substâncias de origem natural ou artificial que proporcionam aos alimentos um gosto doce. Eles normalmente, apresentam baixo ou nenhum valor energético, são utilizados para pessoas que têm intolerância a açúcares ou estão em dietas com baixo teor calórico. (GARCIA-ALMEIDA E CASADO FDEZ, 2013). Nos últimos 35 anos observamos um aumento da utilização de adoçantes pouco calóricos substituindo o uso de açúcar em alimentos e bebidas industrializados (ANDERSON, 2012).

Essas mudanças acompanham a tendência mundial de maior consumo em alimentos processados e modificados com o objetivo de realizar uma dieta com menos calorias e baixo teor de gordura e de açúcar. Assim, alimentos com edulcorantes apresentaram um crescimento exponencial no consumo em relação àqueles que apresentavam açúcares convencionais como ingrediente. Essa pressão da indústria, frente às mudanças no consumo e padrão alimentar, acelerou o processo de testes para salientar a eficácia e a segurança destes adoçantes a fim de transmitir informações claras aos consumidores (GARCIA-ALMEIDA E CASADO FDEZ, 2013).

A descoberta do xilitol ocorreu no final do século XIX. Ele é um edulcorante, que pode ser encontrado na natureza em alguns vegetais e frutas como abóbora, couve-flor, ameixas e morangos. É um álcool de açúcar com cinco carbonos ($C_5H_{12}O_5$), com peso molecular de 152,15 g/mol. É muito utilizado como adoçante na fabricação de produtos doces sem açúcar, devido ao seu sabor e ao tempo de doçura ser equivalente ao da sacarose; além disso, possui menos de dois terços das calorias da maior parte dos açúcares disponíveis (UR-REHMAN *et al.*, 2015).

Outra propriedade interessante é que o xilitol é anticetogênico e não requer insulina para entrar nas células, tornando-se, desse modo, uma excelente fonte de energia para os diabéticos. (HOREKI E TAKAGI , 2012; PETERSON, 2013). Ele se

caracteriza por ser o mais doce dentre todos os polióis (MITCHELL, 2008). O xilitol ganha certo destaque na área odontológica em virtude de seus benefícios referentes ao controle e à diminuição de risco de cárie dentária (JANAKIRAM, KUMAR E JOSEPH, 2017). Existem três mecanismos que são usados para explicar essa ação frente à doença cárie. O primeiro, refere-se à substituição da sacarose cariogênica pelo xilitol; o segundo, relaciona-se ao fato do xilitol estimular a salivagem e o terceiro mecanismo, alude-se à questão do xilitol possuir efeitos inibitórios específicos sobre o *Streptococcus mutans*, que é a principal bactéria envolvida no processo de formação da cárie (MÄKINEN, 2016; SALLI *et al.*, 2019).

O eritritol também pertence à família dos polióis ou álcoois de açúcar ((2R,3S)-butan-1,2,3,4-tetrol) (BILLAUX *et al.*, 1991). Os polióis são formados a partir de processos de hidrolização de grupos aldeídos em carboidratos. Os polióis são abundantes na natureza, sendo encontrados em alimentos fermentados como o molho de soja, além de frutas e vegetais como uvas e cogumelos (BERNT, 1996). O eritritol possui apenas quatro átomos de carbono, portador, desse modo, do menor peso molecular entre todos os álcoois de açúcar, o que irá implicar em algumas diferenças em suas propriedades físicas e químicas; além disso, por ser uma molécula simétrica, ele irá existir em apenas uma forma, a mesoforma (MOON *et al.*, 2010).

O eritritol também forma cristais anidros que possuem um sabor doce que alcança entre 60 a 80% em relação à doçura da sacarose, contudo, ele possui a vantagem de não deixar sabor residual, podendo ser facilmente misturado a açúcares de sabor mais intenso (COCK, 2012). No entanto, o eritritol demanda um alto custo para a sua fabricação quando comparado a outros edulcorantes de sabor mais intenso como xilitol, essa característica faz com que ele não se configure como o adoçante de primeira escolha para a indústria. A principal vantagem do eritritol é o fato de ele poder melhorar a sensação na boca, podendo mascarar certos sabores indesejados de edulcorantes mais fortes como adstringência e efeitos irritantes orais (REGNAT, MACH, MACH-AIGNER, 2018).

1.4 Flúor

O flúor é um dos elementos mais abundantes encontrados no planeta. Ele está presente na água, solos e no ar e é caracterizado por ser o mais eletronegativo dos

halogênios. Ele possui grande capacidade de reagir com elementos químicos formando compostos orgânicos e inorgânicos (MURRAY, 1986).

O primeiro estudioso a relacionar o efeito do flúor no controle de cárie dentária foi Frederick McKay no início do século XX. McKay era um dentista americano que relatou suas observações na comunidade de Colorado Springs onde descreveu que as crianças que viviam lá possuíam “dentes manchados” juntamente com uma prevalência de cárie mais baixa do que a de outras regiões dos Estados Unidos. Ele então suspeitou, que essas alterações observadas na comunidade, poderiam ser desencadeadas pela presença de algum elemento químico, encontrado na água que as pessoas consumiam nessa região. Em 1931, Churchill, um químico americano, confirmou essa tese, ao detectar que a água de Bauxite, Arkansas, possuía 13,7 ppm de flúor, o que também causava manchamento dos dentes e diminuição da prevalência de cárie. O manchamento era causado devido à grande quantidade de flúor presente na água (NARVAI, 2000).

Atualmente, sabe-se que o flúor é de fundamental importância para controle e prevenção de cárie. Ele pode ser considerado, juntamente com ações de prevenção em saúde, como a primeira linha de defesa para o aparecimento da cárie dentária. A *Food and Drug Administration* (FDA) tem o flúor como o único composto reconhecido para a prevenção desta doença nos Estados Unidos, contudo ainda existem produtos que contêm flúor e que não são reconhecidos pela FDA para a proteção e prevenção de cárie (PARK E KIM, 2002).

Políticas públicas em saúde, a partir do século XX, começaram o processo de fluoretação das águas para as comunidades. Dessa forma, a água se configurou, como a principal fonte de flúor para a população em relação ao controle da doença. As outras fontes, em que o flúor é encontrado, são nos produtos odontológicos de higiene pessoal como dentifrícios e enxaguantes bucais (CAREY, 2014).

Há mais de 50 anos, a utilização diária de cremes dentais fluoretados é recomendada como método efetivo de controle e prevenção de cárie. Durante esse período, ocorreram várias alterações em relação às recomendações de uso em crianças e grávidas devido ao risco de ingestão, pois poderia gerar contaminação ou fluorose dentária. Conforme a criança cresce, ela fica mais capaz de cuspir o excesso de pasta durante a escovação, o que não ocorre com crianças menores de 5 anos, as quais tendem a engolir o dentifrício durante a escovação.

Diante desse fato, FDA recomenda a utilização de pequenas quantidades (do tamanho aproximado de um grão de ervilha) de dentifrícios fluoretados em crianças menores de 6 anos e a consulta ao dentista para que este oriente em relação ao uso em crianças menores de 2 anos. Várias organizações recomendam o uso de uma fina camada em crianças dessa idade ou do tamanho aproximado de um grão de arroz (WRIGHT et al., 2014).

O flúor apresenta-se, em relação à concentração em dentifrícios, nas versões com alta (1055-1450ppm) ou com baixa (250-550 ppm) concentração, ambas oferecem boa margem de segurança, desde que utilizadas na quantidade correta e que seja evitada a deglutição do produto. Dependendo da quantidade de pasta que a criança ingerir durante a escovação, a pasta de dente pode representar até 25 % da dose sistêmica total para crianças com idade entre 2 e 6 anos (SCHER, 2011). A ingestão média de flúor do creme dental foi estimada em aproximadamente 11,5 µg/kg pc/dia para crianças e 1,4 µg/kg pc/dia para adultos (EFSA 2013).

1.5 Estudos de Toxicidade

A história dos estudos de toxicidade tem início com Paracelsus (1493-1541), médico e astrólogo suíço que nasceu no século XV, considerado, portanto, o pai da toxicologia. Ele conseguiu demonstrar efeitos inofensivos e benéficos das toxinas e demonstrou relações dose-resposta para efeitos de várias drogas. No século XVIII, Mathieu Orfila, um médico nascido na Espanha, conseguiu determinar a relação de venenos com suas respectivas propriedades biológicas, demonstrando danos a órgãos específicos causados pelas toxinas. Orfila, muitas vezes, é citado como o pai da toxicologia moderna. Os métodos de seleção toxicológica e metodologias desenvolvidas por ele serviram de base para o desenvolvimento de novos estudos toxicológicos a partir do início do século XX (HUNTER, 2008).

Os testes de toxicidade podem ser definidos como a determinação dos efeitos de um material ou produto sobre determinado grupo de organismos escolhidos sobre condições específicas (ENVIRONMENT CANADA, 2007). Estes testes devem ser controlados de modo que os organismos devem ser submetidos à exposição da

substância em diferentes graus de concentrações a fim de determinar parâmetros de maneira precisa, como, por exemplo, a dose letal mediana (DL_{50}) ou uma concentração de efeito mediana (EC_{50}) (HODSON, ADAMS e BROWN, 2019). A DL_{50} se refere a quantidade de uma substância química, que quando é administrada por via oral, em uma única dose, indicada em massa da substância por massa de animal, irá causar a morte de 50% dos animais expostos dentro de um período de observação de 14 dias (EATON E GILBERT, 2008)

A utilização de animais em estudos toxicológicos iniciou-se a partir de 1920, por John Willian Trevan, que sugeriu o uso de teste de dose letal de 50% (DL_{50}) a fim de determinar a dose letal de produtos químicos específicos. Após a introdução do conceito de DL_{50} , o cientista John DAriza sugeriu um método de avaliação para testar a irritação ocular e dérmica, utilizando coelhos, o qual foi bastante utilizado para testar efeitos de produtos cosméticos e farmacêuticos tanto nos olhos quanto na pele (PARASURAMAN, 2011).

Os estudos de toxicidade de produtos datam desde a década de 1950, período em que, inicialmente, tínhamos um conhecimento científico primitivo sobre as substâncias e seus efeitos danosos à saúde. O intuito principal dos testes de toxicidade era o de fornecer um entendimento das respostas biológicas de determinadas substâncias sobre os órgãos e tecidos dos seres vivos. Desse modo, poderíamos compreender de forma ágil e econômica sobre os riscos e consequências da exposição aos agentes ambientais aos quais estamos rodeados, avaliando assim o risco para a saúde da população (KREWSKI *et al.*, 2009).

Na antiguidade, a principal fonte de tratamento para problemas de saúde era a natureza. Todas as drogas derivavam de origem vegetal, animal ou mineral. Existem relatos de documento históricos que já descreviam as propriedades curativas e características de plantas que datam de 2800 A.C. Atualmente, uma boa parte da população acredita no potencial dos produtos naturais como agentes de controle, prevenção e tratamento de enfermidades (TYLER, 1996).

Muitas vezes os produtos naturais são tidos como um meio natural e econômico para tratar doenças crônicas podendo ser associados aos medicamentos industrializados (TROVAR e PETZEL, 2009). No Brasil, uma parte da sociedade acredita que, por serem de origem natural, esses produtos não oferecem perigo. No entanto, essa crença,

concomitantemente com o uso popular não fornece informações científicas suficientes para afirmar se determinada planta possui riscos e/ou danos para a saúde. Essa falta de informação pode acarretar um problema de saúde pública, pois o uso indiscriminado de produtos naturais, sem evidências científicas experimentais, podem causar danos hepáticos, problemas no trato gastro-intestinal e até aumento do risco de câncer (SCHENKEL, 1990).

Existem plantas que possuem substâncias que oferecem riscos à saúde como, por exemplo, o apiol e o safrol, que acabam gerando efeitos hepatotóxicos, ou, ainda, as saponinas que podem causar lesões renais. Já as plantas ricas em lactonas sasquiterpênicas, ou as do tipo furanocumarinas, podem causar reações de dermatite (VEIGA, 2005). Outros efeitos, prejudiciais e preocupantes, que podem ser mencionados são os teratogênicos, embriotóxicos e abortivos. Algumas plantas têm a capacidade de atravessar a barreira placentária e podem acabar gerando alguns desses efeitos no feto (BRASIL, 2002).

Em uma revisão feita por Rodrigues *et al.* (2011) os autores listaram uma série de plantas com propriedades tóxicas durante a gravidez e concluíram que para a maioria das plantas medicinais não havia dados em relação à segurança para o seu uso durante a gestação. Os dados existentes encontrados eram, muitas vezes, incompletos e contraditórios, o que reforça a necessidade de mais estudos de toxicidade para o embasamento do uso seguro desses produtos naturais (RODRIGUES *et al.*, 2011).

No Brasil, a maior parte das plantas, que são consumidas e utilizadas como tratamento para algumas comorbidades, não apresentam uma descrição e comprovação de suas propriedades farmacológicas ou de testes toxicológicos, configurando seu uso como um risco para a população, a qual, muitas vezes faz o uso indiscriminado dessas plantas com base o conhecimento empírico (CASTRO, 2006). Existem várias causas que influenciam ou podem contribuir para a toxicidade das plantas: a contaminação por metais pesados, a época do ano em que a planta foi colhida, os microrganismos, os pesticidas, os diferentes processos para extração, dentre outros (LIMA, 2009).

Em 22 de junho de 2006, foi publicado o decreto nº 5.813 pela Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Esse decreto listou uma série de diretrizes para o incentivo à pesquisa e para o desenvolvimento de fármacos a partir de fitoterápicos ou plantas medicinais, com intuito de que eles possam ser disponibilizados com segurança,

eficácia e qualidade a toda a população, investindo, assim, na biodiversidade do Brasil, que é uma das maiores do mundo (BRASIL, 2006). Assim, os estudos de toxicidade pré-clínicos se tornaram fundamentais para fornecer segurança aos pesquisadores e, por consequência, à população, avaliando o grau de toxicidade nos animais testados nessa fase do estudo (CASTRO, 2006)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que os efeitos tóxicos e farmacológicos observados nos animais, em especial, nos roedores, possuem forte valor de evidência e de aplicabilidade para a espécie humana. Devido a esse fato, a indústria farmacêutica, química e alimentícia faz uso constante dos testes de toxicidade em animais, com o intuito de avaliar a eficácia e segurança do uso de novos produtos (WHO, 1978).

No Brasil, a Resolução RE Nº 90, de 16 de março de 2004, dispôs sobre a regulamentação e parametrização dos testes de toxicidade em fitoterápicos, com o objetivo de indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos. Esta resolução especifica que os estudos devem ser feitos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. Além disso, também especifica qual os animais que devem ser utilizados, bem como o sexo, espécie grupos (controle e tratado), idade dos animais, via de administração e a dose (BRASIL,2004).

1.6 Toxicidade por dose única (aguda)

A finalidade do ensaio de toxicidade aguda é de avaliar se determinada substância pode possuir um potencial danoso ao ser humano, a partir deste teste, será possível qualificar e determinar o grau de letalidade e de efeitos tóxicos para que possa ser classificado quanto ao seu risco conforme às legislações reguladoras vigentes de cada país (VALADARES, 2006).

O ensaio de toxicidade aguda foi descrito pela primeira vez por Trevan (1927), o qual tinha como objetivo definir a dose letal de uma substância que seria capaz de matar

metade dos animais de determinado grupo teste. Essa dose foi posteriormente definida como dose letal 50% (DL₅₀). Décadas depois, este teste passou a ser utilizado e exigido para avaliar a segurança de fármacos e produtos antes de serem distribuídos à população (TREVAN, 1927).

Por muito tempo, o teste da DL₅₀ foi utilizado como o principal método de avaliação de toxicidade aguda, era um procedimento necessário e exigido para avaliar a segurança de produtos por órgãos de regulação. A Food and Drug Administration (FDA), agência reguladora americana, responsável pela proteção e promoção da saúde pública, através do controle e supervisão da segurança alimentar, de suplementos dietéticos, de produtos de tabaco, de vacinas, de prescrição de medicamentos, de transfusões de sangue, de dispositivos médicos, cosméticos e alimentos para animais exigia este teste desde a década de 1970, antes da liberação de algum produto ou fármaco ao público consumidor (KLAASSEN e WATKINS, 2001).

Contudo, este método demandava o uso de uma grande quantidade de animais, chegando até 100 roedores por grupo, e, em alguns casos, era realizado em duas espécies diferentes, normalmente ratos e camundongos (BOTHAM, 2002). Com o passar dos anos e com aprimoramento da ciência e das diretrizes éticas de preservação e uso dos animais em laboratório, além de fatores econômicos, observou-se uma maior preocupação com a redução do número de animais a serem utilizados nas pesquisas, o que levou aos toxicologistas reavaliarem os métodos para aplicação do teste de toxicidade aguda (PAUMGARTTEN *et al.*, 1989).

A partir do trabalho de Russell e Burch, de 1959, a questão dos três Rs passaram a ter uma maior aplicação em todo o planeta, em especial em pesquisas que envolviam ensaios de segurança e de toxicidade de novos produtos e substâncias. Essa diretriz tem por finalidade otimizar pesquisas envolvendo o uso de animais gerando menos gastos, mão de obra e melhorando o manejo e bem-estar dos animais durante o experimento. Os três Rs se referem a *Refinement, Reduction, and Replacement* (refinamento, redução e substituição).

O refinamento diz respeito a toda estratégia e procedimento que vise diminuir o sofrimento e desgaste do animal durante o experimento. A redução visa desenvolver novas técnicas que sejam embasadas cientificamente a fim de que a pergunta do experimento seja respondida, utilizando o menor número de animais possíveis. A

substituição é a aplicação de novos métodos que não fazem o uso de animais sencientes durante o protocolo experimento. Essa substituição pode ocorrer através da utilização de tecidos derivados dos animais ou de animais não sencientes (PURCHASE et al., 1998). Assim, em 2002 o teste que utilizava DL₅₀ passou a não ser mais empregado, dando espaço a testes que aplicavam dosagem fixa, testagem “*up and down*” e por classe. os quais foram estabelecidos pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (BOTHAN, 2004).

O teste de toxicidade por dose fixa (OECD 420) envolve a testagem de cinco animais de forma sequencial, determinando previamente a escolha de cinco doses fixas. Esse protocolo utiliza como critérios para toxicidade a observação dos sinais vitais dos animais e avalia a quantidade de animais que foram a óbito como parâmetro para definir a segurança do produto. Já o método “*Up and down*” (OECD 425) pretende determinar a DL₅₀, testando em sequência os animais individualmente, assim, a dose de cada animal seguinte será ajustada para mais ou para menos a partir dos efeitos tóxicos observados no animal anterior.

O teste de toxicidade por classe (OECD 423), também emprega a metodologia de dose fixa, no entanto, o objetivo final é avaliar o número de animais mortos a cada concentração da substância utilizada e, a partir desse número, determinar a segurança da substância e sua DL₅₀ (RISPIN *et al.*, 2002).

1.7 Toxicidade por doses repetidas (subcrônica)

Os estudos de toxicidade subcrônica têm como objetivo definir quais são as doses de exposição de determinada substância que irão causar efeitos tóxicos não observáveis. O teste de toxicidade fornece informações sobre o efeito de exposições frequentes, por via oral, de determinada substância. Ele pode determinar a necessidade, ou não, de estudos toxicológicos mais longos. Esse teste é fundamental para a caracterização da toxicidade da substância de ensaio, indicando a relação dose-resposta e a determinação do efeito adverso não observado Nível (NOAEL) (OECD, 2008). Também é avaliado a ação da substância por uma exposição repetida e prolongada (28

dias) nos órgãos dos animais que mais são afetados por efeitos tóxicos, assim como o grau de comprometimento deles (FAUSTMAN et al., 1994).

A justificativa para a seleção de um teste subcrônico deve ser baseada na duração clínica da medicação, na natureza e no grau da exposição e na estratégia geral do teste. A principal via de administração desse tipo de estudo é oral, através da técnica de gavagem, mas existem também estudos que optam por injeção intraperitoneal da droga, isso irá depender do tipo de substância utilizada (BOUTRAND, 2019).

A substância teste deve ser administrada regularmente em um horário específico. Os animais não devem variar muito em relação ao seu peso, devendo estar em uma faixa de $\pm 20\%$. Em relação à idade, normalmente são utilizados animais de 5 a 6 semanas para este tipo de teste e, normalmente, seu peso se encontra entre 180 à 220 gramas. Os animais são divididos em um grupo controle e em um grupo que receberá uma alta dose da substância. Pode ser incluído um grupo satélite (*naïve*) durante o experimento (PARASURAMAN, 2011).

Durante o período de administração são observados, diariamente, os sinais de toxicidade e de comportamento dos animais e a averiguação do grau de sofrimento deles segundo a escala de Grimace. Quando possível, os animais que morrerem durante o estudo ou que tiveram de ser eutanasiados devem ser submetidos à necrópsia e a coleta dos órgãos. Além disso, os animais que sobreviverem devem ser eutanasiados e, em seguida, serão submetidos à necropsia para coleta de sangue e de órgãos (OECD, 2008).

1.8 Marcadores bioquímicos de toxicidade

Em estudos de toxicidade existem órgãos que se tornam mais suscetíveis às ações das substâncias, tanto por conta de sua função no corpo, bem como pela estrutura celular e vascular que esses órgãos possuem. Dentre estes órgãos, o fígado é um dos mais sensíveis aos efeitos tóxicos.

Qualquer substância administrada de maneira oral e que será posteriormente absorvida por via gastrintestinal irá, em um primeiro momento, ser transportada para o fígado, por meio da veia porta hepática. Desse modo, qualquer agente tóxico terá de passar pelo fígado, antes de ser disposto na corrente sanguínea, fazendo desse órgão um

dos mais importantes em análises bioquímicas para esses tipos de estudo (CORNELIUS, 1980)

O fígado possui uma série de enzimas que apresentam diversas funções importantes no processo de eliminação de substâncias tóxicas e de digestão. Dentre elas, temos a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), a fosfatase alcalina (FA) e a gama glutamiltransferase (GGT). O aumento dessas enzimas na corrente sanguínea normalmente está relacionado a processos de lesões hepáticas. O crescimento dessas enzimas pode causar danos às membranas hepatocelulares como colestase, hipoperfusão, inflamação, hipóxia, necrose e excesso de depósitos de glicogênio. Em especial, o aumento de ALT e AST está relacionada com desordens celulares agudas (MOTA, 2003).

As enzimas estão presentes em basicamente todas as reações químicas do corpo, portanto, elas são encontradas em praticamente todos os órgãos e tecidos. As aminotransferases têm sido usadas como índices de lesões hepáticas há algumas décadas. A enzima AST, atua na catalisação de transaminação reversível do aspartato em 2-cetoglutarato para o oxalato e glutamato, sendo encontrada em quase todos os tecidos. Já a ALT é encontrada no fígado, catalisando a transferência do grupo amino da alanina, ficando apenas o ácido pirúvico. Quando ocorrem alterações hepáticas ocasionadas por infecções virais, esteatose, cirrose e toxicidade por substâncias, essas duas enzimas se apresentam aumentadas (KAPLAN, 2002).

A fosfatase alcalina sérica está presente tanto no fígado quanto nos ossos, portanto, o aumento dessa enzima está normalmente relacionado com desordens hepatobiliares e ósseas. Ele pode ser causado por obstrução do fluxo biliar, hepatite, cirrose, consumo de alimentos gordurosos e exposição a substâncias tóxicas. Nos casos de obstrução extra-hepática o aumento de enzima se deve por conta da indução por colestase (HENRY, 2008).

Outro órgão que é fundamental na identificação de toxicidade por testes bioquímicos é o rim. Este órgão está relacionado com o processo de filtração sanguínea, a fim de eliminar substâncias nocivas como a amônia, uréia e ácido úrico. A creatinina sérica é um composto que pode ser utilizado para avaliar o processo e ritmo de filtração glomerular. Alterações nos níveis de creatinina podem indicar depleção da função renal (KISZTAJN, 2007).

A creatinina é um subproduto não enzimático da creatina e fosfocreatina. Ela é constantemente produzida pelo tecido muscular esquelético. Se trata de uma molécula pequena que não circula ligada a proteínas plasmáticas, que é facilmente filtrada pelos rins no nível glomerular e, em seguida, excretada em quantidade, que vai variar de acordo com o grau de lesão renal, ou seja, quanto maior a taxa de creatinina, maior será o nível de insuficiência renal (HUIDOBRO, TAGLE E GUZMAN, 2018)

A uréia é o subproduto final do metabolismo do nitrogênio nos humanos e é gerada pelo fígado por meio do ciclo da uréia. Sua excreção ocorre, principalmente, pela via renal através da urina, podendo também ser excretada por outros fluidos corpóreos como a saliva, o suor, e, também, o sangue. Em indivíduos saudáveis, as concentrações de uréia vão variar de acordo com fatores diversos como ingestão de proteínas e nível de hidratação. Em condições normais, o nível de uréia na urina varia de 7 a 20 mg/dL, aumentando bastante em condições patológicas como insuficiência renal. A uréia e a creatinina são dois biomarcadores importantes na avaliação de situações como doenças renais ou desordens hepáticas (PUNDIR, JAKHAR E NARWAL, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as toxicidades (aguda e subcrônica) de 3 diferentes formulações de dentifrícios fluoretados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. em roedores.

2.2 Específicos

- Avaliar em ratos machos e fêmeas os efeitos de 3 diferentes formulações de dentifrícios, por meio de análises macroscópicas e/ou histológicas do fígado, rins, coração, baço e pulmão; dosagens bioquímicas; leucograma e variação de massa corpórea;

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada segundo as Normas de Pesquisa em Saúde estabelecidas pela UFC e pelo Conselho Nacional em Saúde – Resolução Nº 466 de 2012. O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, seguindo as orientações da National Center for the Replacement & Reduction of Animals in Research e aprovado com o número de protocolo 1102011220.

3.2 Desenho

O desenho do estudo foi uma pesquisa experimental *in vivo* em animais.

3.3 Formulação dos dentifrícios

As formulações dos dentifrícios foram preparadas no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para a preparação das formulações, foi realizada a pesagem do óleo essencial a fim de se obter a diluição adequada para cada formulação, que, em seguida, foi dissolvida numa solução aquosa com lauril sulfato de sódio, juntamente com os edulcorantes e o flúor. Para a homogeneização da solução, foi feita a agitação da mistura em agitador magnético. Para o ensaio de toxicidade aguda, foram avaliadas três formulações de dentifrícios contendo flúor, surfactante, edulcorante e óleo Essencial de *Lippia sidoides* Cham. A formulação dos 7

- **1,5OELS-500:** 1,5% OELS, 500 ppm de Flúor, LSS e eritritol..

3.4 Óleo Essencial de *Lippia sidoides*

Para a produção das formulações dos dentifrícios, foi utilizado o óleo essencial puro da marca NatEssential® (Fortaleza-CE, Brasil). Segundo a análise de

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa fornecida pelo fabricante os principais constituintes do óleo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial de *Lippia sidoides*

PICO	Tempo de retenção	Teor (%)	Probabilidade de acerto (%)	Composto
1	11.892	1.67	93	ALPHA-THUJENE
2	15.324	2.28	96	MYRCENE
3	16.917	1.67	94	ALPHA-TERPINENE
4	17.405	15.77	93	PARA CYMENE
5	19.430	3.51	96	GAMMA-TERPINENE
6	33.449	61.87	96	M-THYMOL
7	40.808	12.24	97	TRANS-CARYOPHYLLENE
8	47.876	1.00	90	CARYOPHYLLENE OXIDE

Legenda: somente os principais componentes foram mencionados > 1%

3.5 Animais

Para a avaliação da toxicidade aguda, foram utilizadas 41 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas e 12 ratos wistar machos, com idade entre 8 a 10 semanas de vida, e pesando entre 180-220 gr. Os animais provenientes do Biotério Central, Campus do Pici, foram mantidos no Biotério Professor Eduardo Torres da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Fortaleza (CE). Os animais foram selecionados aleatoriamente, marcados para permitir a identificação individual.

3.6 Condições de alojamento e alimentação

Todos os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número máximo de 3 animais em cada uma delas, sob as mesmas condições ambientais com controles dos ciclos claro/escuro e térmico adequados. Os animais passaram por um período de cinco a sete dias de adaptação e mantidos em temperatura controlada ($23\pm 2^\circ\text{C}$), obedecendo a ciclos claro/escuro de 12 horas (período claro das 7:00 h da manhã às 19:00 h da noite). Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental.

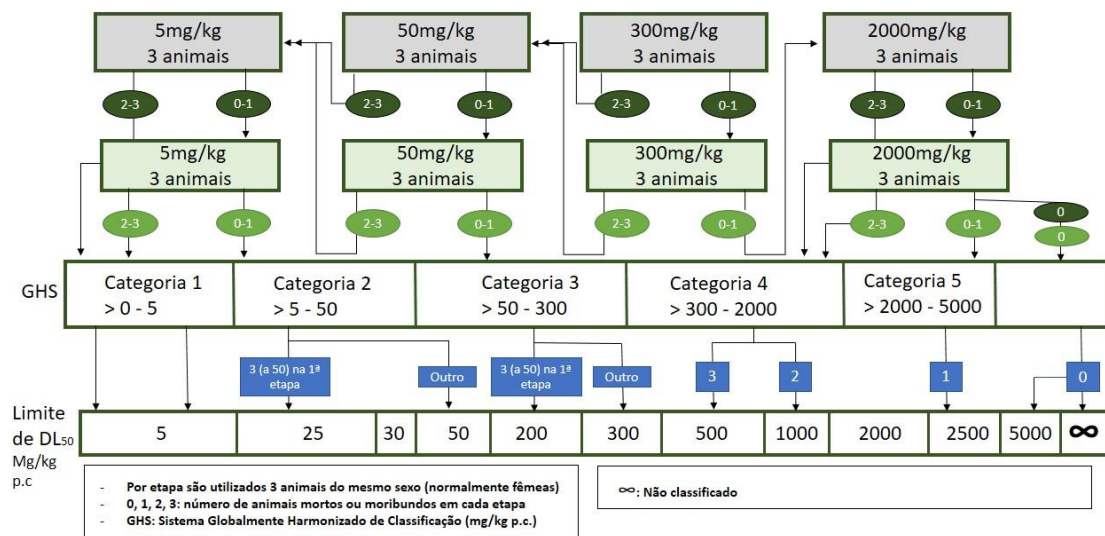
3.7 Ensaio de toxicidade por dose única (aguda)

O teste de toxicidade aguda em dose única foi realizado seguindo as diretrizes do *guideline* 423 definido pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Foram avaliadas 3 formulações de dentifrícios consistindo, assim, em três grupos testes e um grupo controle. Assim, 24 ratas Wistar fêmeas, foram divididos em 4 grupos (n por grupo=6) correspondendo a cada uma das formulações do dentifrício e um grupo com animais *naïve*.

As formulações foram administradas por gavagem utilizando cânula apropriada, uma única vez, seguindo o fluxograma estabelecido pelo *guideline* 423 (Figura 1). A dose estabelecida para o início do teste foi a de 2000 mg/kg devido a estudos prévios já terem demonstrado que o óleo de *Lippia Sidoides* isolado não demonstrou toxicidade aguda na dose de 300 mg/kg. Após a administração, os animais foram observados para registro de sinais vitais e de comportamento aos primeiros 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas e depois com 24 horas.

Em seguida, os animais foram monitorados diariamente, registrando os sinais de variação de peso e de comportamento, por 14 dias, bem como os sinais de toxicidade ou de mortes. Diariamente, foram observadas as características dos animais, nomeadamente o aspecto de pelos, olhos e mucosas, segundo a escala de Grimace. A partir desta, foi realizado o desfecho humanitário, por exsanguinação com anestesia prévia (75 mg/kg de cetamina + 10 mg/kg xilazina IP), quando observado sofrimento excessivo dos animais. As informações sobre as alterações no padrão de alimentação e no peso corporal foram tabulados diariamente.

Figura 1: Fluxograma do teste de toxicidade aguda segundo o *guideline* 423 da OECD



Fonte: Adaptado da OECD (2002)

3.8 Ensaio de toxicidade por dose repetidas (subcrônica)

Para a análise de toxicidade subcrônica, foram seguidas as diretrizes estabelecidas pelo guideline 407 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008). Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos (6 machos e 6 fêmeas, por grupo), divididos em um grupo *naïve* (n=5), um grupo controle (n=12) em que foi administrada solução salina a 0,9%, um grupo teste (n=12), com o qual foi utilizada a formulação contendo 1,5% OLS, 500 ppm de Flúor, LSS e eritritol na concentração de 300 mg/kg.

Nos dois grupos, em que foram realizadas as gavagens (controle e teste), as administrações ocorreram diariamente, no mesmo horário, durante 28 dias. Durante as aplicações, foram observadas, diariamente, a ocorrência de sinais clínicos de toxicidade e de mortes. Diariamente a ração dos animais foi pesada para observar se houve alguma alteração no consumo alimentar durante o experimento. Semanalmente, os animais foram pesados a fim de se avaliar a variação de massa corpórea.

3.10 Análise dos parâmetros sistêmicos

As amostras sanguíneas foram coletadas por exsanguinação, utilizando seringa descartável e agulha hipodérmica. Foi avaliado o leucograma com a contagem total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer, assim como as contagens diferenciais de neutrófilos, linfócitos e monócitos empregando esfregaço sanguíneo corado com hematoxilina-eosina e observados através de microscópio óptico. Para a avaliação das funções hepática e renal o sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos em uma rotação de 3000 rpm. Após centrifugação e obtenção de soro, os parâmetros bioquímicos foram analisados por dosagens de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); proteínas totais, fosfatase alcalina, ureia e creatinina, utilizando kits Labtest®.

3.11 Análise e processamento histológico dos órgãos

Foram feitos os processamentos histológicos de fígados e rins com coloração em HE a fim de se obter as lâminas para análise em microscópio óptico, para avaliar a presença de alterações histopatológicas. Os parâmetros utilizados na avaliação dos fígados foram: Infiltração de células inflamatórias; Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos; Hiperplasia de células de Kupffer; Degeneração balonizante dos hepatócitos; Congestão vascular portal e da veia centrolobular; Hemorragia sinusoidal; Fibrose; Necrose de hepatócitos. Já os parâmetros empregados para os rins foram: Tumefação do epitélio tubular; Congestão glomerular intersticial; Vacuolização isomérica do epitélio tubular; Células inflamatórias intersticiais; Presença de cilindro-hialino; Presença de fibrose.

3.12 Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos escores foram tabulados no software GraphPad Prism® (San Diego, CA, EUA), versão 9.2 para macOS, 2021. Além disso, foram

calculadas as médias e os erros padrões dos grupos, sendo considerado estatisticamente significativo quando os resultados demonstraram nível de significância $< 0,05$. Foi testada a normalidade dos dados (Teste de Kolgomorov-Smirnov). Os dados que se encaixaram numa curva de normalidade foram comparados mediante ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação de variação da massa corporal na fase aguda

Na avaliação de toxicidade aguda das formulações OELS-500, OELS-1000 e 1,5OELS-500 em ratas Wistar, na dose de 2000 mg/kg, não foi observada morte de nenhum dos animais, com exceção de uma rata do 1,5OELS-500 que foi eutanasiada no segundo dia de aplicação do produto, devido ao sofrimento excessivo causado por pneumonia por aspiração da formulação, durante a administração por gavagem. Nesse caso, foi realizado, posteriormente, o desfecho humanitário. Os animais não demonstraram alterações em relação ao seu comportamento durante os 14 dias de observação, nem sinais de sofrimento segundo a escala de Grimace. Foi observado ganho ponderal em todos os grupos (Figura 2).

Figura 2: Variação de massa corporal durante os 14 dias de observação

+

Legenda: Os grupos tratados com as formulações A, B e C e o grupo controle naïve foram eutanasiados no dia 14. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (5- 6 ratas por grupo). Dentifrício A: 1% do óleo de Lippia sidoides (OELS), 500 ppm de flúor, lauril sulfato de sódio (LSS) como surfactante e xilitol como edulcorante; Dentifrício B: 1% OELS, 1000 ppm de Flúor, LSS e eritritol.; Dentifrício C: 1,5% OELS, 500 ppm de Flúor, LSS e eritritol.; não houve diferença estatística entre os grupos. [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]

4.2 Efeito do OELS na avaliação macroscópica dos órgãos na fase aguda

As médias e desvios padrões dos animais tratados com as formulações contendo OELS estão apresentados na tabela 3. Não houve diferença significativa entre os grupos, o que sugere que nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelas diferentes formulações. Ademais, os órgãos avaliados não apresentaram alterações macroscópicas.

Tabela 2: Peso relativo dos órgãos de Ratas Wistar tratadas com 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500), 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000), e 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500) na dose de 2000 mg/kg.

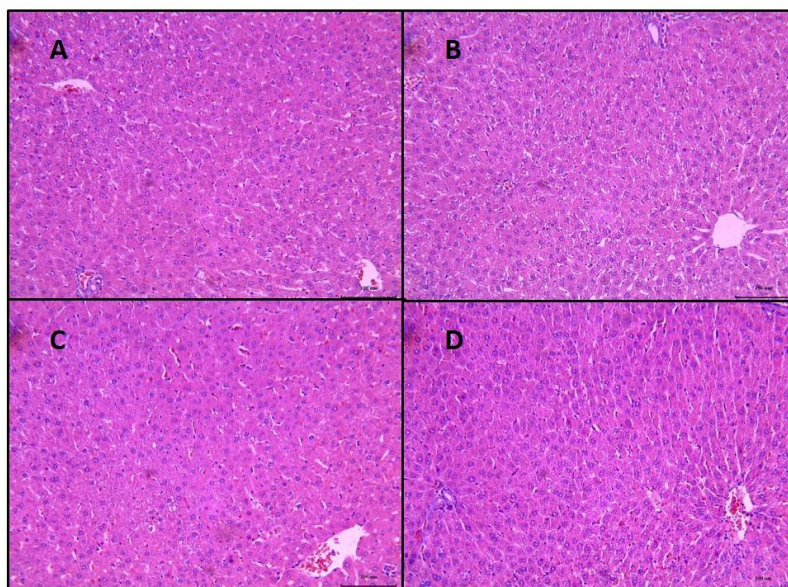
Órgão	<i>Naïve</i>	OELS-500	OELS-1000	1,5OELS-500
Fígado	0,043 ± 0,002	0,040 ± 0,002	0,043 ± 0,003	0,043 ± 0,002
Rim	0,004 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,000
Coração	0,003 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,000
Baço	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,000
Pulmão	0,004 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,000

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]

4.7 Avaliação histológica dos órgãos na fase subcrônica

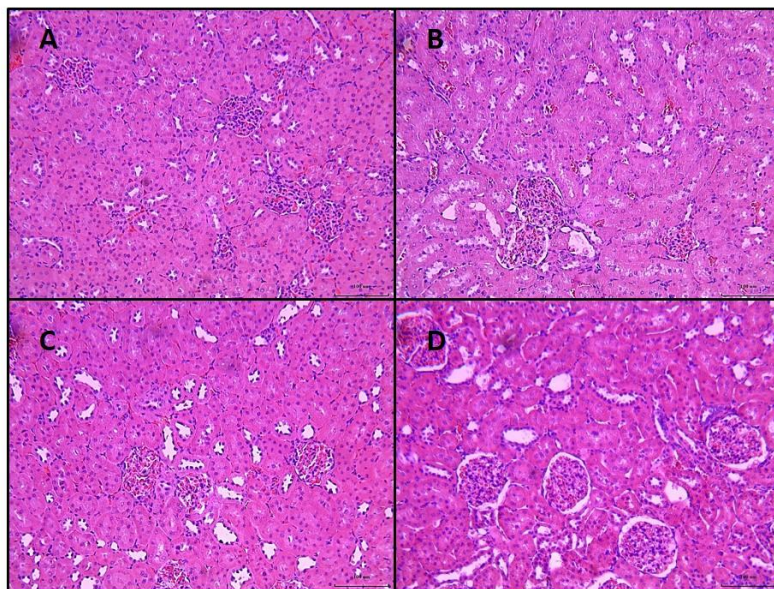
Não foram observadas alterações nas análises histológicas das lâminas de rins e fígados quando comparados os grupos *naïve*, com os testes tratadas com 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500), 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000), e 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500) na dose de 2000 mg/kg. como é possível observar nas figuras 3 e 4.

Figura 3: Fotomicrografias de fígados corados com Hematoxilina-Eosina – Fase Dose única



Legenda: A: *Naïve*; B: 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500); C: 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000); D: 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500); Coloração de hematoxilina-eosina; 100x;

Figura 4: Fotomicrografias de rins corados com Hematoxilina-Eosina – Fase Dose única

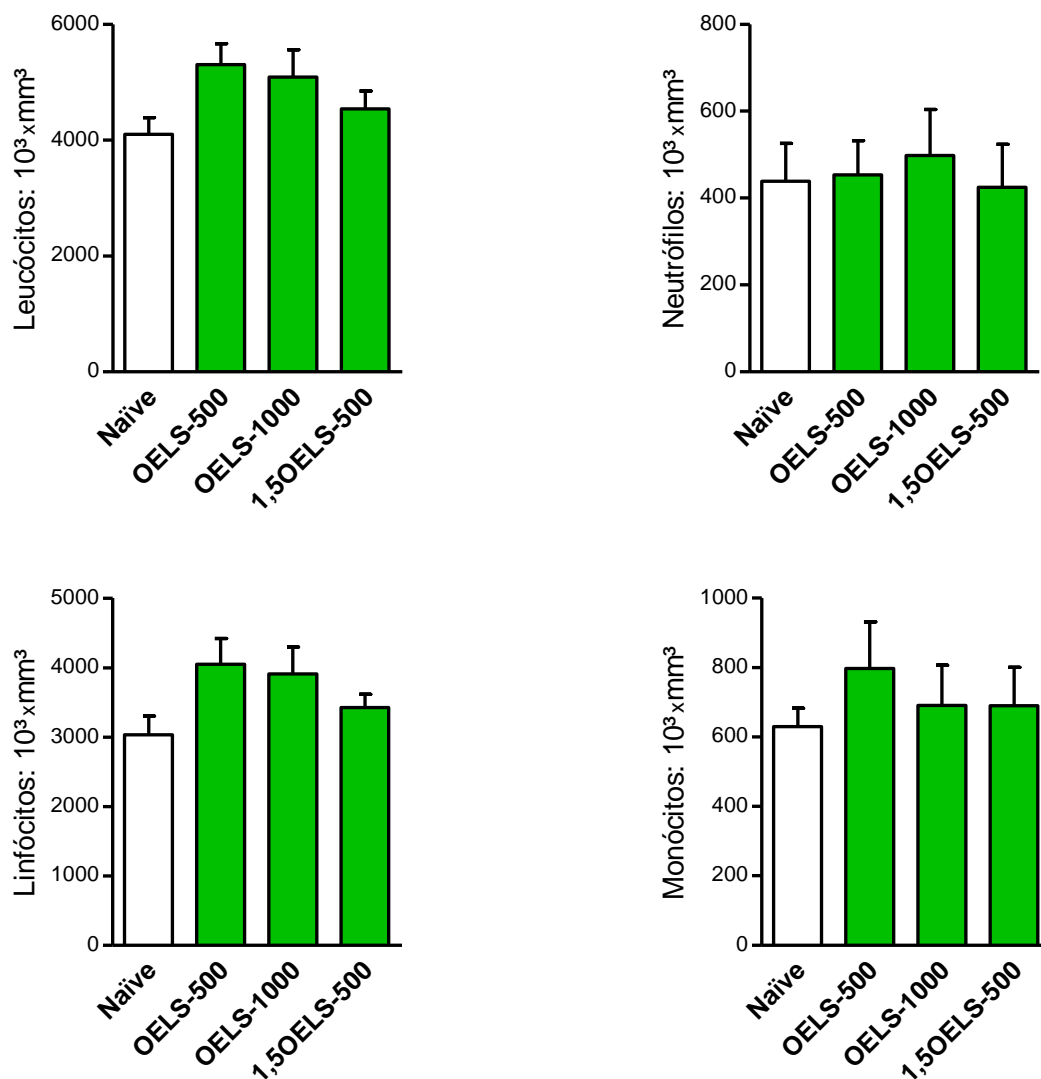


Legenda: A: *Naïve*; B: 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500); C: 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000); D: 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500); Coloração de hematoxilina-eosina; 100x;

4.3 Efeito do OELS no leucograma na fase aguda

A avaliação hematológica não demonstrou diferenças significativas na contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer entre os grupos testes e o controle. A contagem diferencial de linfócitos, neutrófilos e monócitos também não demonstrou diferença significativa para nenhuma das contagens entre o grupo controle e os grupos testes (Figura 5). Essa análise sugere que não houve aumento das células de defesa em relação a uma possível resposta imunológica durante a administração das diferentes formulações..

Figura 5: Gráficos referentes às contagens de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos na fase de toxicidade aguda



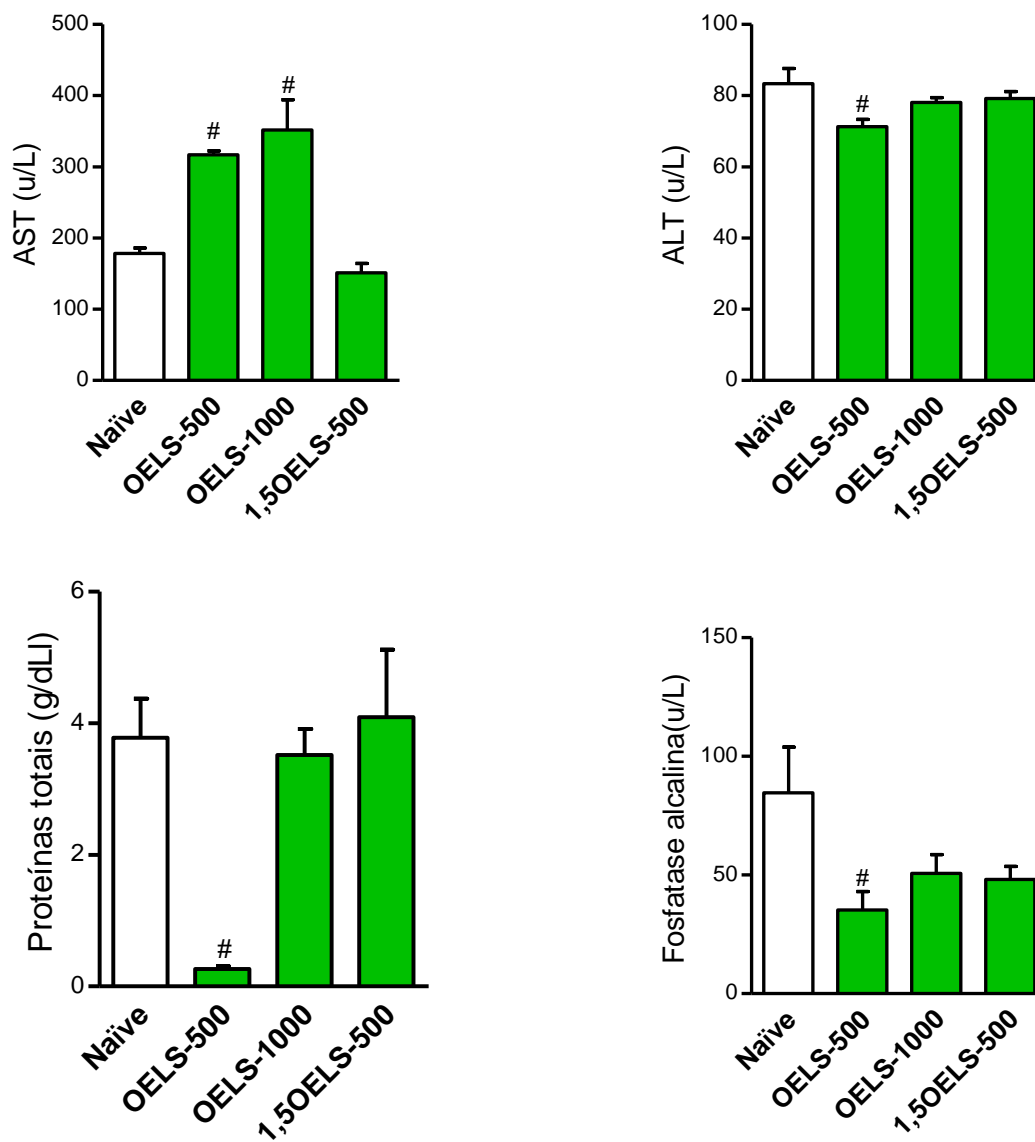
Legenda: Os grupos tratados com 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500), 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000), e 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500) na dose de 2000 mg/kg e o grupo controle naíve foram eutanasiados no dia 14. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n=5-6$ ratas grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni].

4.4 Efeitos do OELS nos parâmetros hepáticos na fase aguda

Avaliação dos parâmetros hepáticos demonstrou um aumento dos níveis das dosagens séricas de AST nas formulações OELS-500 e OELS-1000, nesse caso, foi observada diferença significativa com o grupo controle ($p < 0,05$), como apresentado na figura 6, indicando uma possível indicação maior risco de lesão hepática para essas formulações. Em relação à dosagem de ALT foi observada uma diminuição nas formulações A e B em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), que pode ser visto na figura 6.

Foi observada uma redução dos valores de Fosfatase Alcalina entre os animais que receberam OELS-500 comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Houve um aumento na dosagem de proteínas totais para os grupos OELS-1000 e 1,5OELS-500 quando comparados ao controle ($p < 0,05$).

Figura 6: Gráficos referentes às análises bioquímicas de AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Proteínas Totais na fase de toxicidade aguda

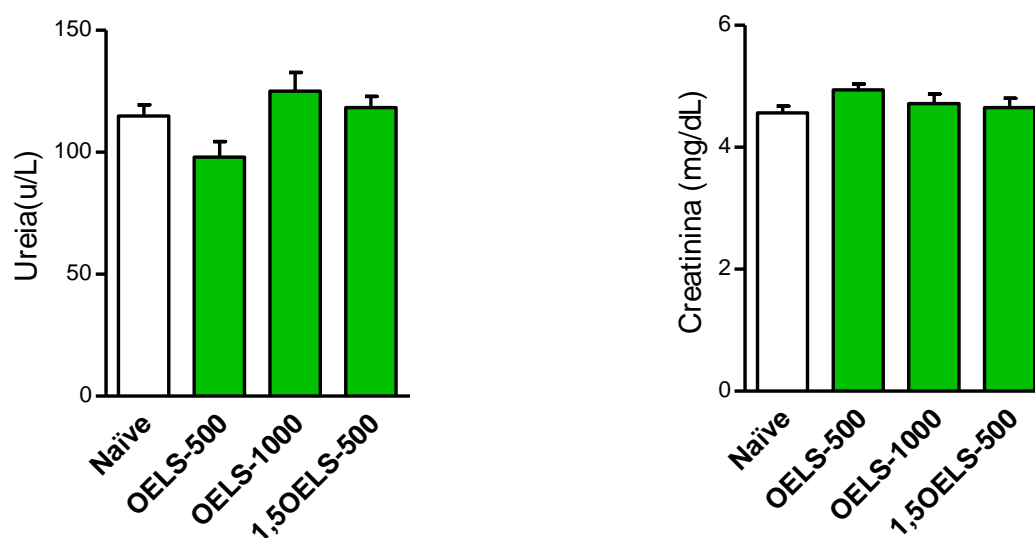


Legenda: Os grupos tratados com 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500), 1% do óleo de *Lippia sidoides* + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000), e 1,5% do óleo de *Lippia sidoides* + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500) na dose de 2000 mg/kg e o grupo controle naïve foram eutanasiados no dia 14. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n=5- 6 ratas grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. #: p<0,05 em relação ao naïve.

4.5 Efeito do OELS nos rins na da fase aguda

As dosagens de uréia e creatinina não diferiram entre os grupos testes e controle como podemos observar na figura 7 ($p < 0,05$), indicando que não houve alteração nos parâmetros de funções renais durante a administração das formulações.

Figura 7: Gráficos referentes às análises bioquímicas de uréia e creatinina na fase de toxicidade aguda



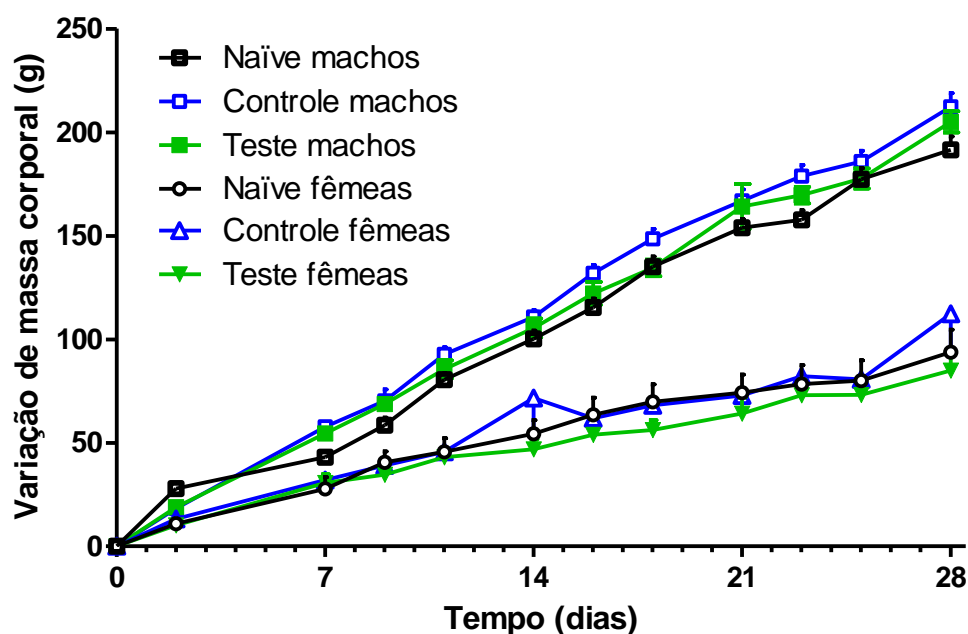
Legenda: Os grupos tratados com 1% do óleo de Lippia sidoides + 500 ppm de flúor + xilitol (OELS-500), 1% do óleo de Lippia sidoides + 1000 ppm de flúor + eritritol (OELS-1000), e 1,5% do óleo de Lippia sidoides + 500 ppm de flúor + eritritol (1,5OELS-500) na dose de 2000 mg/kg e o grupo controle naïve foram eutanasiados no dia 14. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n=5-6$ ratas grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni].

4.6 Avaliação de variação da massa corporal na fase subcrônica

Na análise de toxicidade subcrônica da formulação 1,5 OELS-500 na concentração de 300 mg/kg não foi observada morte de nenhum dos animais, com

exceção de uma rata do grupo teste no 24º dia de experimento. O animal foi encontrado morto na caixa na manhã do dia citado e foi descartado do estudo. Os animais não demonstraram alterações de comportamento durante os 28 dias de experimentação nem sinais de sofrimento, segundo a escala de Grimace. Foi observado o ganho ponderal em todos os grupos, como podemos observar na figura 8.

Figura 8: Variação de massa corporal durante os 28 dias de observação da fase subcrônica



Legenda: Os grupos testes, controle e o grupo controle *Naïve* foram eutanasiados no dia 28. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (5- 6 animais por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos. [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]

4.7 Avaliação macroscópica dos órgãos na fase subcrônica

As médias e desvios padrões dos animais tratados com as formulações testadas encontram-se expressos na tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos *naïve*, teste e controle. Esses dados sugerem que nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelo tratamento com a formulação 1,5 OELS-500. Não foi observado nenhuma alteração macroscópica nos órgãos avaliados.

Tabela 2: Peso relativo dos órgãos de dos ratos avaliados na fase subcrônica

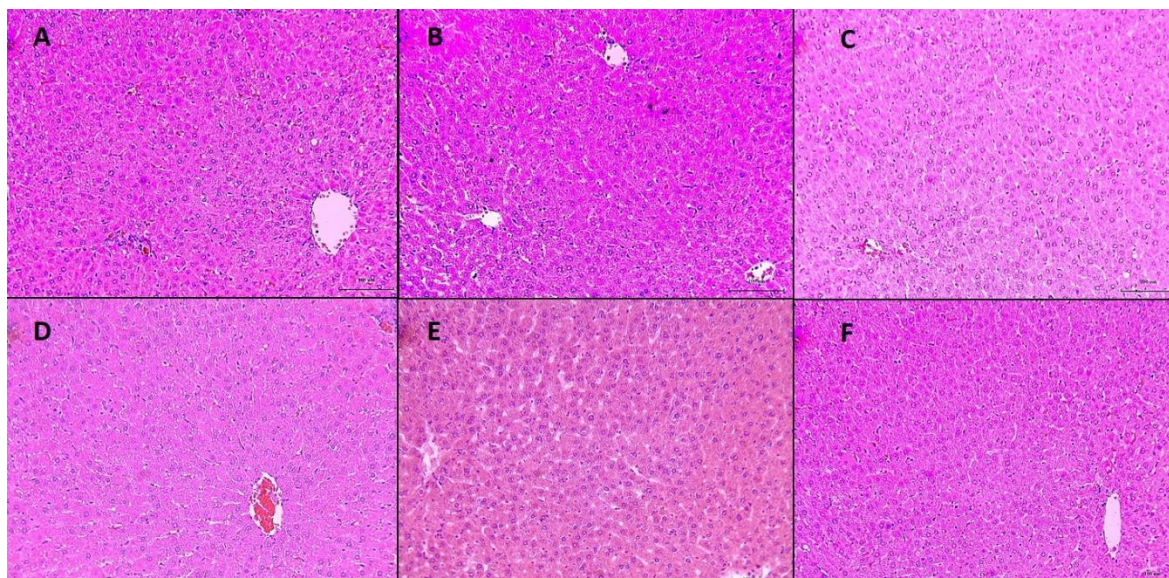
Órgão	Naïve		Controle		Teste	
	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas
Fígado	0,0481 ± 0,0036	0,0429 ± 0,0031	0,0401 ± 0,0013	0,0400 ± 0,0016	0,0408 ± 0,0016	0,0405 ± 0,0025
Rim	0,0049 ± 0,0004	0,0043 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0004	0,0048 ± 0,0002	0,0042 ± 0,0004
Coração	0,0031 ± 0,0002	0,0035 ± 0,0001	0,0032 ± 0,0002	0,0037 ± 0,001	0,0032 ± 0,0003	0,0033 ± 0,0002
Baço	0,0027 ± 0,0002	0,0030 ± 0,0004	0,0029 ± 0,0002	0,0031 ± 0,0005	0,0035 ± 0,0007	0,0031 ± 0,0004
Pulmão	0,0041 ± 0,0007	0,0045 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0002	0,0046 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0002	0,0047 ± 0,0002

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]

4.7 Avaliação histológica dos órgãos na fase subcrônica

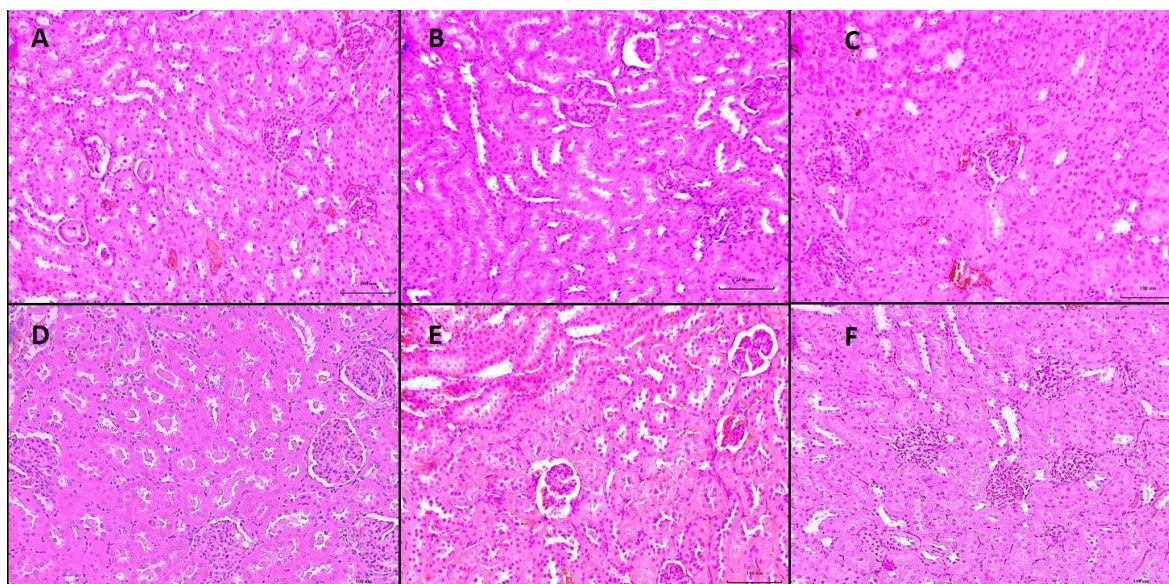
Não foram observadas alterações nas análises histológicas das lâminas de rins e fígados quando comparados os grupos *naïve*, controle e teste, como é possível observar nas figuras 9 e 10.

Figura 9: Fotomicrografias de fígados corados com Hematoxilina-Eosina – Fase Doses repetidas



Legenda: A:*naïve* fêmeas; B:Controle fêmeas; C: Teste fêmeas; D: *naïve* machos; E: Controle machos F: Teste machos. Coloração de hematoxilina-eosina; 100x;

Figura 10: Fotomicrografias de rins corados com Hematoxilina-Eosina – Fase Doses repetidas

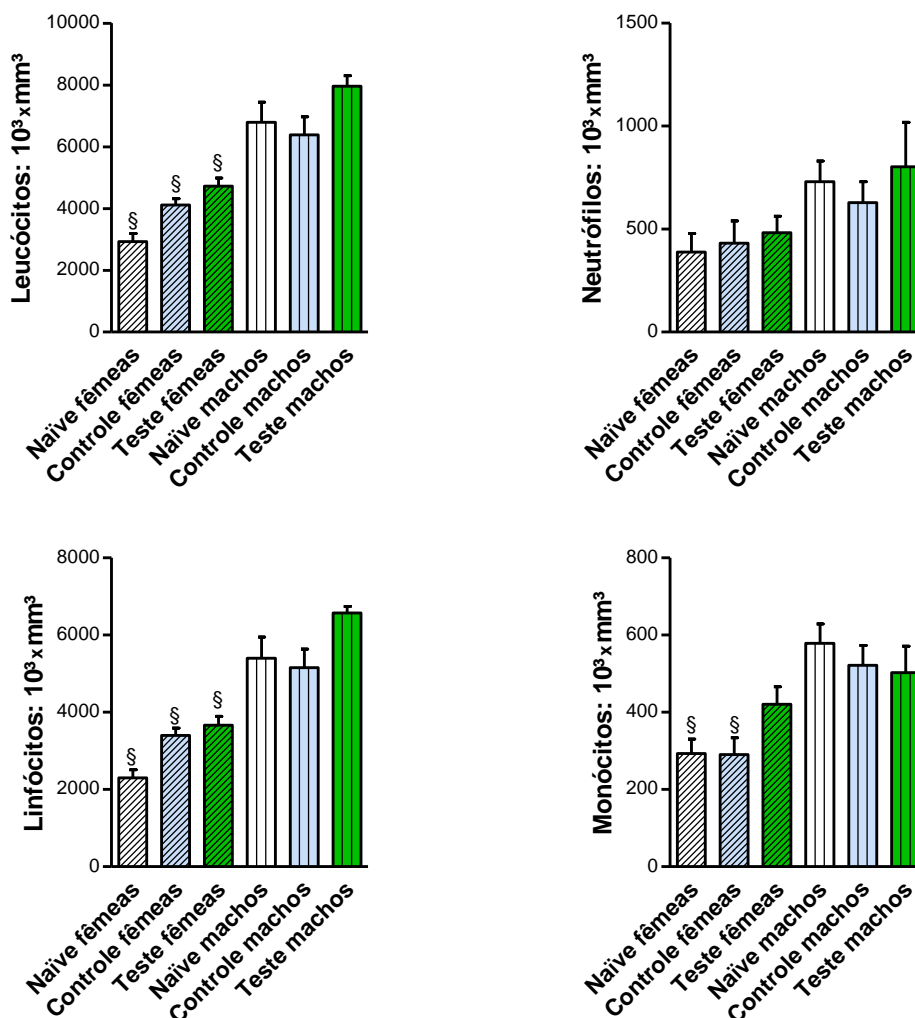


Legenda: A:*naïve* fêmeas; B:Controle fêmeas; C: Teste fêmeas; D: *naïve* machos; E: Controle machos F: Teste machos. Coloração de hematoxilina-eosina; 100x;

4.8 Efeito do OELS no leucograma na fase subcrônica

A contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer, linfócitos e monócitos diferiram significativamente entre os grupos *naïve*, controle e teste quando comparados entre machos e fêmeas. A contagem diferencial de neutrófilos não demonstrou diferença significativa em nenhum dos grupos analisados (Figura 11).

Figura 11: Gráficos referentes às contagens de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos na fase doses repetidas

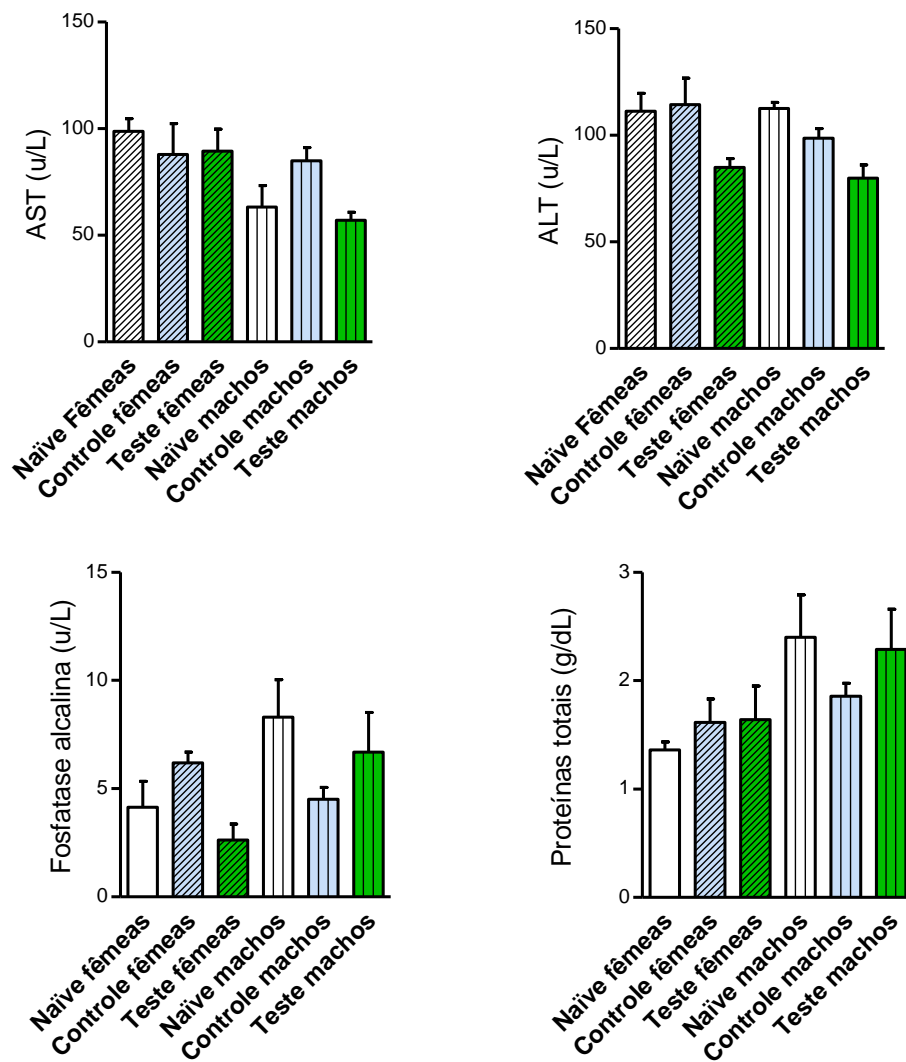


Legenda: Os grupos testes, controle e o grupo controle *Naive* foram eutanasiados no dia 28. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (5- 6 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. #: $p < 0,05$ em relação ao *naive*. *: $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados §: $p < 0,05$ em relação aos sexos.

4.9 Efeitos do OELS nos parâmetros hepáticos na fase subcrônica

As dosagens séricas de AST, ALT, fosfatase alcalina e proteínas totais não evidenciaram nenhum potencial de toxicidade subcrônica, sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) como podemos observar na Figura 12

Figura 12: Gráficos referentes às análises bioquímicas de AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Proteínas Totais na fase doses repetidas

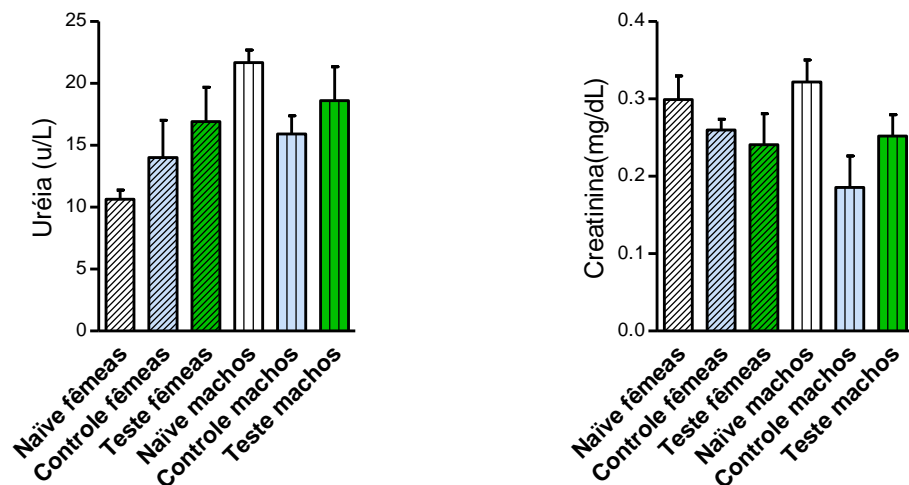


Legenda: Os grupos testes controle e o grupo *Naive* foram eutanasiados no dia 28. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (5- 6 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni].

4.10 Efeito do OELS nos rins na da fase subcrônica

As dosagens séricas de uréia e creatinina não evidenciaram nenhum potencial de toxicidade subcrônica, sem diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$) como podemos observar na Figura 13

Figura 13: Gráficos referentes às análises bioquímicas de uréia e creatinina na fase de doses repetidas



Legenda: Os grupos testes controle e o *Naive* foram eutanasiados no dia 28. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (5- 6 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni].

5. Discussão

O presente estudo buscou responder se formulações de dentifrício contendo OELS ofereceria segurança antes de ser administrado em estudos clínicos. Para desenvolver novas drogas e produtos cosméticos é essencial a realização de testes de segurança para avaliar a tolerância e toxicidade no intuito de considerar a possibilidade da geração de produtos comerciais contendo OELS. Acredita-se que a utilização de OE nas formulações de dentifrícios pode fornecer uma alternativa viável, simples e economicamente atrativa para a prevenção da cárie dentária e doença periodontal.

Os óleos essenciais extraídos a partir de uma variedade de plantas podem ser considerados fontes promissoras de moléculas bioativas eficazes contra microrganismos relacionados à cárie, particularmente *S. mutans* (FREIRES et al., 2015), dentre outros tais como *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Yersinia enterocolitica* (CASTRO et al., 2011).

Quando se observa-se o leucograma, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as 3 formulações da fase aguda quando comparadas ao grupo *naïve*. Esse achado é semelhante ao estudo de Fontenelle *et al* (2007) que também não encontrou diferenças estatísticas no leucograma entre os grupos analisados quando avaliou a toxicidade aguda do OELS ainda que fosse em uma concentração maior do que a utilizada no presente estudo (3000 mg/kg). Já na fase de toxicidade subcrônica podemos observar alterações significativas na análise do leucograma. Na contagem de linfócitos totais, leucócitos e monócitos observamos um aumento significativo nos parâmetros dos machos quando comparamos com as fêmeas. A maioria dos estudos que avaliam os efeitos sobre os parâmetros hematológicos testando a influência do OELS ou de timol e de carvacrol, não observaram relação entre a administração dessas substâncias e o aumento na contagem de células de série branca.

Essa diferença observada entre machos e fêmeas é condizente com o que observamos em estudo que avaliam parâmetros hematológicos em ratos dividindo-os por sexo. No estudo de Jacob Filho *et al.* (2018), que buscou apresentar parâmetros hematológicos normais de ratos jovens e idosos distribuindo os animais em sete grupos experimentais com 1, 2, 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idade.

Ao analisar as amostras de sangue retiradas das caudas, os valores hematológicos normais foram determinados para cada faixa etária. E foi possível

observar diferenças significativas entre os sexos em relação aos parâmetros leucocitários, em especial quando os animais iam envelhecendo.

Em outro estudo semelhante realizado por Melo *et al.*, (2012) também é possível observar essas diferenças nos valores hematológicos referentes ao leucograma, quando comparados os sexos de ratos Wistar. Em relação ao parâmetro de leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$), por exemplo, os ratos machos apresentam média de $9,7 \pm 2,21$ e as fêmeas de $8,3 \pm 2,01$. No parâmetro de porcentagem de neutrófilos os machos também apresentaram média superior ao das fêmeas. Contudo, ao observar a porcentagem de linfócitos a média das fêmeas, ($71,7 \pm 7,21$) foi ligeiramente superior a dos machos ($70,0 \pm 7,37$), o que apresenta resultados diferentes ao encontrados nesse estudo em que observamos uma porcentagem maior de linfócitos nos machos.

Alguns óleos vegetais essenciais são usados para tratar e gerenciar diferentes doenças, bem como danos ao fígado. De fato, muitas pesquisas foram feitas sobre alguns desses óleos, relatando que esses componentes têm ação hepatoprotetora. Jafari *et al.*, (2018) avaliou essa propriedade quando induziu hepatotoxicidade em ratos utilizando dióxido de nano titânio (nano-TiO_2) e dividiu os animais em quatro grupos sendo um controle, um grupo que recebeu apenas nano-TiO_2 , e outros dois grupos, nos quais foi induzido a hepatotoxicidade, mas também foi administrado o timol (nano-TiO_2 + timol [10 mg/kg] e nano-TiO_2 + timol [30 mg/kg]).

Nos grupos que receberam o timol foi observada uma melhora significativa dos parâmetros histológicos e bioquímicos hepáticos induzidos pelo nano-TiO_2 , essa ação protetora foi atribuída às propriedades antioxidantes desse terpenóide. O timol também demonstrou atividade contra a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4) em camundongos. O CCl_4 induz lesão hepática por desalogenação redutiva do citocromo P-450 no radical livre triclorometil e, em seguida, esse radical forma o peróxido de triclorometil, outro radical livre que irá induzir a formação de radicais de lípidios que irão iniciar a peroxidação dos lípidios levando às lesões no fígado.

Os resultados do estudo demonstraram que o timol diminui a lesão hepática induzida por CCl_4 em camundongos, como evidenciado pela diminuição significativa na atividade sérica de ALT e peroxidação lipídica, bem como por meio das avaliações histopatológicas que evidenciaram a redução das lesões (ALAM *et al.*, 1999).

Com base nos resultados do estudo realizado, pode-se inferir que o OELS, por ser rico em timol, também pode ter induzido efeitos hepatoprotetores nos animais testes em que nos parâmetros bioquímicos indicativos de lesão hepática na fase subcrônica, não foi possível observar variações significativas em relação aos grupos avaliados.

No ensaio de fase aguda, a formulação do OELS-500, que continha, 1% do óleo de OELS, 500 ppm de flúor, LSS como surfactante e xilitol como edulcorante, apresentou resultados que indicavam sinais de lesão hepática quando comparados às outras formulações. A principal diferença da formulação OELS-500 para a OELS-1000 e 1,5OELS-500, era a presença de xilitol, em que nas outras duas últimas, o edulcorante presente era o eritritol.

Embora o xilitol tenha uma boa margem de segurança em relação sua toxicidade para os mamíferos, ele já demonstrou efeitos hepatotóxicos em cães que receberam doses de 1g/kg ou 4g/kg diluído em meio aquoso. Quando comparados ao grupo controle, que não recebeu a solução de xilitol, foi observado aumento dose dependente da ALT e a AST plasmáticas em cães sugerindo dano hepático (XIA, HE E YU, 2009).

O xilitol tem muitas propriedades desejáveis para os seres humanos, incluindo a indução de muito pouca liberação de insulina, o que o torna um substituto de açúcar preferido para indivíduos que estão sob dietas com baixo teor de carboidratos a fim de reduzir seu índice glicêmico (HOREKI E TAKAGI , 2012; PETERSON, 2013). Já foi demonstrado em ratos que o xilitol é metabolizado, principalmente, no fígado, por meio da via das pentoses fosfato, produzindo o metabólito intermediário, ribose-5-fosfato, antes 50 de ocorrer a transformação em glicose, onde todo esse processo irá requerer ATP para que ocorra.

Quando uma grande quantidade de xilitol é absorvida na circulação sanguínea, o ATP nos hepatócitos é esgotado, levando à necrose dos hepatócitos e, assim, elevando a ALT e AST plasmáticas (VINCENT, VAN DER BERGHE E HERS., 1989). Esse mecanismo de lesão hepática é o que pode ter sido o fator causal para as alterações dos parâmetros hepáticos da formulação que continha xilitol (OELS-500) quando coparada com o grupo naïve.

A formulação OELS-1000 que continha a maior quantidade de flúor (1000ppm) também apresentou uma diferença significativa em parâmetros bioquímicos hepáticos na fase aguda quando comparada ao grupo naïve. O flúor é amplamente utilizado na

fabricação de dentifrícios e de produtos cosméticos odontológicos, além de ser adicionado à alimentação como agente no controle de cárie. O fígado é o principal órgão de transformação material do corpo, tornando-se o primeiro e principal órgão a indicar sinais de agentes tóxicos. O flúor, como substância exógena, pode afetar o metabolismo do fígado, além de reduzir sua capacidade de desintoxicação causando a diminuição da albumina plasmática, o que pode levar ainda a uma série de sintomas, como distúrbios metabólicos e alteração da homeostase do organismo (WANG et al., 2020).

Um estudo feito em 2018 demonstrou que a exposição do fígado ao flúor induziu danos na ultraestrutura e morfologia do fígado, além de aumentar os níveis de interleucina 17A (IL-17A) ativando a via IL-17A (Zhao et al., 2018). Os resultados dessa pesquisa indicaram que a via IL-17A pode desempenhar um papel essencial no processo de dano hepático induzido por flúor. Contudo, o mecanismo intracelular específico da via IL-17A na lesão hepática induzida por flúor não foi bem elucidado (ZHAO et al., 2022)

Existe uma preocupação recente da medicina em relação ao risco de nefrotoxicidade induzida por produtos de origem vegetal e fitoterápicos. Esses efeitos foram por muito tempos ignorados por se acreditar que por virem de origem natural esses medicamentos não possuem efeitos colaterais no organismo (LUYCKX, 2012). Hoje se observa um aumento significativo pelo interesse do uso desses medicamentos fitoterápicos.

No ano de 2012, o aumento do mercado de medicina chinesa teve um aumento de 20% quando comparado ao ano anterior, o que enfatiza ainda mais a importância de estudos de avaliação de toxicidade dessas drogas e de órgãos responsáveis pelo controle de qualidade e de distribuição destes produtos como a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (OMS, 2013).

Algumas das substâncias que podemos citar como responsáveis por causar efeitos tóxicos encontrados em plantas são os ácidos aristolóquicos e outros alcalóides vegetais. Além disso, antraquinonas, glicosídeos de ervas e flavonóides também são possíveis causadores de toxicidade renal. A nefrotoxicidade associada aos óleos essenciais e fitoterápicos podem levar a sintomas e quadros clínicos graves como: nefrolitíase, síndrome de Fanconi, rabdomiólise, e, em alguns casos, carcinoma

urotelial. Existem diversos fatores que podem aumentar ou contribuir para o risco de nefrotoxicidade nos fitoterápicos, alguns que podemos citar são: processamento ou armazenamento incorreto; a toxicidade intrínseca das próprias plantas; a contaminação por metais pesados, as interações entre fitoterápicos e medicações ou administração da dosagem incorreta do fitoterápico.

Atualmente não se sabe a incidência exata de lesão renal devido a suas propriedades nefrotóxicas dos fitoterápicos. Além disso, a exposição desses produtos que possuem ácido aristolóquico pode aumentar o risco de futuros cânceres uroepiteliais, o que deve ser olhado com atenção, pois se configura como um risco de saúde pública. Em nosso estudo não observamos sinais de toxicidade renal em nenhuma das fases avaliadas (YANG et al., 2018).

Na avaliação dos efeitos das formulações tanto na fase aguda quanto na fase subcrônica sobre a função renal, resultados semelhantes foram observados na avaliação de toxicidade feita por Fontenelle et al. (2007). Nesse estudo os autores avaliaram o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. em relação à sua atividade antifúngica, in vitro, contra *Candida* spp e *Microsporum canis*, no intuito de avaliar seus efeitos toxicológicos agudos e subcrônicos, in vivo e determinar seus constituintes químicos.

A administração de 3000mg/kg no ensaio de toxicidade aguda e de 117, 95 mg/kg/ dia durante 30 dias não demonstraram nenhum sinal de alterações nos parâmetros bioquímicos de uréia e creatinina. Em nosso estudo trabalhou-se com uma dosagem de 2000 mg/kg para a fase aguda e de 300 mg/kg na fase sub-crônica da formulação contendo o óleo essencial de *Lippia sidoides* e, também, não foram observadas alterações nesses parâmetros bioquímicos.

Já em um estudo feito por Baldissera et al. (2018) foi observada danos renais por toxicidade quando administradas doses de 10 mg/kg, 20 mg/kg e 40 mg/kg de timol em ratos Wistar machos. Sendo o timol um dos principais componentes do óleo essencial de *Lippia sidoides* pode-se fazer uma associação entre o efeito do OELS nos rins com o timol. Nesse estudo, os autores observaram que a ingestão de 40 mg/kg de timol inibe severamente a atividade citosólica e mitocondrial da creatinina quinase e piruvato quinase, enzimas importantes para a manutenção da homeostase bioenergética entre os locais de geração de ATP e utilização de ATP em tecidos com alta demanda energética, como fígado e rim. Além disso, a ingestão de altas doses de timol prejudicou a

comunicação entre as isoenzimas de creatinina quinase, o que inibe as tentativas de regenerar ATP ou facilitar o transporte creatinina quinase para melhorar a utilização e o consumo de ATP intracelular. Além disso, a inibição das atividades renais de creatinina quinase e piruvato quinase parece ser mediada pela oxidação renal de lipídios e grupos tiol, bem como pela redução da capacidade antioxidante renal.

O timol, também parece exercer atividade protetora para os rins em algumas situações. Hosseinimehr et al., (2015) investigaram o efeito protetor do timol como composto natural contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina pela captação renal quantitativa de ^{99m}Tc -DMSA e compararam seu efeito com a histopatologia em camundongos. Os exames histopatológicos mostraram um efeito protetor do timol contra a nefrotoxicidade da cisplatina em camundongos. Os resultados mostraram que o timol atenua significativamente a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em camundongos, essa propriedade do timol pode indicar efeito semelhante nos animais do presente estudo já que não foi observada lesões renais em nenhum dos parâmetros observados.

Em outro estudo semelhante ao de Hosseinimehr et al.,(2015) para avaliação de nefro toxicidade, demonstrou a atividade protetora do timol, carvacrol e associação dessas duas substâncias sobre a função renal. O carvacrol é o segundo principal constituinte do OELS depois do timol. Os autores observaram que a administração oral de timol 20 mg/kg, e/ou carvacrol 15 mg/kg, durante 14 dias antes da injeção de cisplatina, restaurou a função renal e e diminuiu os parâmetros de estresse oxidativo.

O timol foi mais nefroprotetor que o carvacrol e, também, foi observado que uma combinação de timol e carvacrol teve um efeito nefroprotetor sinérgico que pode ser atribuído a atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas (EM et al., 2015).

A associação de timol e carvacrol demonstra efeitos sinérgicos em relação a efeitos nefroprotetores, esses dois terpenóides são os principais constituintes do OELS. Esses efeitos são condizentes com os achados desse estudo, em que não foi possível observar efeitos nefrotóxicos ainda que na administração mais concentrada das formulações.

6. Conclusão

Conforme os resultados obtidos em modelo animal de toxicidade por dose única e doses repetidas podemos concluir que a formulação de dentifrício contendo a maior concentração de OELS (1,5% OELS, 500 ppm de Flúor, LSS e eritritol.) apresentou poucos efeitos significativos de toxicidade. Os resultados sugerem segurança dessas formulações nas fases de estudo analisadas, pois além de não terem sido observadas mortes durante o tempo de experimentação, As análises bioquímicas, de leucograma e análises macroscópicas e histológicas dos órgãos avaliados não demonstraram sinais de toxicidade. Faz-se necessário, no entanto, mais estudos de segurança antes de as formulações serem administradas em estudos clínicos

REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, M. L. B. A.; MATOS, F. J. A.; MOURA, V. R. A atividade antibiótica de plantas da flora nordestina. **Ciência e Cultura**, v. 36, n. 7 Suplemento 547, 1984.
2. ALAM, K. *et al.* The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. **Pharmacological research**, v. 40, n. 2, p. 159-163, 1999.
3. ALBAGLI, S. AMAZÔNIA: Fronteira geopolítica da biodiversidade. **Revista Parceiras Estratégicas.**, n.12, p.6-19, 2001.
4. ALVES, Lucio F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.
5. ANDERSON, G. Harvey *et al.* The use of low-calorie sweeteners by adults: impact on weight management. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 6, p. 1163s-1169s, 2012.
6. AZZOUZ, Muftah A.; BULLERMAN, Lloyd B.. Comparative Antimycotic Effects of Selected Herbs, Spices, Plant Components and Commercial Antifungal Agents¹. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 45, n. 14, p. 1298-1301, 1 dez. 1982. International Association for Food Protection.
7. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008. Elsevier BV.
8. BALDISSERA, Matheus D. *et al.* Tissue oxidative damage mediates impairment on phosphotransfer network during thymol intake: Effects on hepatic and renal bioenergetics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 296, p. 83-88, 2018.
9. BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor; JULIANI, H. Rodolfo. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2 abr. 2012. MDPI AG.
10. BERNT, W. O. *et al.* Erythritol: a review of biological and toxicological studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. S191-S197, 1996.

11. BERTINI, Luciana Medeiros et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.
12. BHATTARAM, Venkatesh Atul et al. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine**, v. 9, p. 1-33, 2002.
13. BILLAUX, M. S. *et al.* Handbook of sweeteners. 1991.
14. BISHOP, Chris D.. Antiviral Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*(Maiden amp; Betche) Cheel (Tea Tree) Against Tobacco Mosaic Virus. **Journal Of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 641-644, nov. 1995. Informa UK Limited.
15. BORGES, Andrezza Raposo; AIRES, Juliana Ramos de Albuquerque; HIGINO, Taciana Mirely Maciel; MEDEIROS, Maria das Graças Freire de; CITÓ, Antonia Maria das Graças Lopes; LOPES, José Arimatéia Dantas; FIGUEIREDO, Regina Celia Bressan Queiroz de. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 132, n. 2, p. 123-128, out. 2012. Elsevier BV.
16. BOTELHO, Marco Antonio *et al.* Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 9, p. 1214-1219, 2009.
17. BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. *n.* v.43 **Suppl:S**, p.27-30, 2002.
18. BOTHAM, Philip A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in vitro**, v. 18, n. 2, p. 227-230, 2004.
19. BOUTRAND, Jean-Pierre (Ed.). **Biocompatibility and performance of medical devices**. Woodhead Publishing, 2019.
20. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Brasília, DF, 2006.
21. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução- RE nº90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre guia para a realização de estudos de toxicidade pré-

- clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil; Brasília, D.F., 16 mar. 2004**
22. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **A fitoterapia no SUS eo Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde, 2006.
 23. BRASIL. Resolução SES no1757, de 18 de fevereiro de 2002. Contra-indica o uso de Plantas Mediciniais no Âmbito do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, 20 fev. 2002, v.27, n.33. Parte I.
 24. BUCHBAUER, Gerhard; JIROVETZ, Leopold; JÄGER, Walter. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 46, n. 11-12, p. 1067-1072, 1991.
 25. BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods.:a review. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 94, n. 3, p. 223-253, ago. 2004. Elsevier BV.
 26. CAPPELLO, G. *et al*. Peppermint oil (Mintoil®) in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective double blind placebo-controlled randomized trial. **Digestive and liver Disease**, v. 39, n. 6, p. 530-536, 2007.
 27. CAREY, Clifton M. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 14, p. 95-102, 2014.
 28. CASTRO, C.E *et al* . Antimicrobial activity of Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) essential oil against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 13, n. 3, p. 293-297, 2011 .
 29. CASTRO, D. L. L. Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no Distrito Federal. 2006. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.
 30. CORNELIUS, Charles E. Liver function. In: **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press, 1980. p. 201-257.

31. COSTA, J.G.M. *et al.* . Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 15, n. 4, p. 304-309, Dec. 2005
32. COSTA, Sônia Maria O. *et al.* Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.
33. DE CARVALHO JR, P. M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. **Journal of ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 297-301, 2004.
34. DE COCK, Peter. **Erythritol. Sweeteners and sugar alternatives in food technology**, p. 213-241, 2012.
35. EATON, David L.; GILBERT, Steven G. Principles of toxicology. **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**. CD Klaassen (ed), p. 11-34, 2008.
36. EFSA, NDA. Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2013. Scientific opinion on Dietary Reference Values for fluoride. **EFSA Journal 2013**; 11 (8): 3332, 46 pp. 2013.
37. Environment Canada. 2007. Biological test method: Acute lethality test using rainbow trout. **Report EPS1/RM/09**. Ottawa, Ontario, Canada.
38. FAUSTMAN, Elaine M. *et al.* Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 23, n. 4, p. 478-486, 1994.
39. FERNANDES, Elizabeth S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.
40. FERREIRA, T. S. *et al.* Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.
41. FONTENELLE, R. O. S. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

42. FREIRES, Irlan et al. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.7329-7358, 22 abr. 2015.
43. GARCIA-ALMEIDA, J. M.; CASADO FDEZ, Gracia M.^a; GARCIA ALEMAN, J.. Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. **Nutr. Hosp., Madrid** , v. 28, supl. 4, p. 17-31, jul. 2013 .
44. GUENTHER, Ernest; ALTHAUSEN, Darrell. **The essential oils**. New York: Van Nostrand, 1948.
45. HEISLER, Elisa Vanessa *et al.* Uso de plantas medicinais no cuidado à saúde: produção científica das teses e dissertações da enfermagem brasileira. **Enfermería global**, v. 14, n. 3, p. 390-417, 2015.
46. HENRY, J.B. Diagnóstico clínico: tratamento por métodos laboratoriais. 20 ed. Manole: São Paulo, 2008.
47. HODSON, Peter V.; ADAMS, Julie; BROWN, R. Stephen. Oil toxicity test methods must be improved. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 38, n. 2, p. 302-311, 2019.
48. HOSSEINIMEHR, Seyed Jalal *et al.* Protective effects of thymol against nephrotoxicity induced by cisplatin with using 99mTc-DMSA in mice. **Renal failure**, v. 37, n. 2, p. 280-284, 2015.
49. HUIDOBRO E., Juan Pablo; TAGLE, Rodrigo; GUZMAN, Ana María. Estimation of glomerular filtration rate with creatinine. **Rev. méd. Chile, Santiago** , v. 146, n. 3, p. 344-350, Mar. 2018 .
50. HUNTER, Philip. A toxic brew we cannot live without: micronutrients give insights into the interplay between geochemistry and evolutionary biology. **EMBO reports**, v. 9, n. 1, p. 15-18, 2008.
51. JACOB FILHO, Wilson *et al.* Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. **The Aging Male**, v. 21, n. 2, p. 145-148, 2018.
52. JAFARI, Abbas *et al.* Hepatoprotective effect of thymol against subchronic toxicity of titanium dioxide nanoparticles: biochemical and histological evidences. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 58, p. 29-36, 2018.

53. JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbed pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.
54. JANAKIRAM, Chandrashekar; KUMAR, CV Deepan; JOSEPH, Joe. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 8, n. 1, p. 16, 2017.
55. KAPLAN, Marshall M. Alanine aminotransferase levels: what's normal?. *Annals of internal medicine*, v. 137, n. 1, p. 49-51, 2002.
56. KARYGIANNI, Lamprini; AL-AHMAD, Ali; ARGYROPOULOU, Aikaterini; HELLWIG, Elmar; ANDERSON, Annette C.; SKALTSOUNIS, Alexios L.. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1524-1529, 14 jan. 2016. Frontiers Media SA.
57. KIRSZTAJN, G.M. Avaliação do ritmo de Filtração Glomerular. **Jornal Brasileiro Patologia Med.**, v.3, p.257-264, 2007.
58. KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett & Doull's: Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos**. Compêndio. 5 Ed., Portugal: Mc Graw-Hill, 2001
59. KONSTANTOPOULOU, I.; VASSILOPOULOU, L.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.; SCOURAS, Z. G.. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 616-619, jun. 1992. Springer Science and Business Media LLC.
60. KREWSKI, Daniel et al. Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment. **Risk Analysis: An International Journal**, v. 29, n. 4, p. 474-479, 2009.
61. LEE, Inn Sook; LEE, Gyung Joo. Effects of lavender aromatherapy on insomnia and depression in women college students. **Journal of Korean Academy of Nursing**, v. 36, n. 1, p. 136-143, 2006.
62. LEITE, Bianca Palhano Toscano. DESENVOLVIMENTO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA SIDOIDES CHAM. 2020. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

63. LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D.. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 82-84, abr. 1990. Wiley.
64. LI, F.; WENG, J. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. **Nature Plants**, [s.l.], v. 3, n. 8, p.1-7, 2017.
65. LIMA, A. P. Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José dos Campos, 2009.
66. LIMA, Claudio Moreira et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**, v. 10, n. 3, 2014.
67. LIMA, D. S. *et al.* Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 8, n. 1, p. 17-21, mar. 2017
68. LOBO, Patrícia Leal Dantas *et al.* Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 551-556, 2011.
69. LOBO, Patrícia Leal Dantas *et al.* The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1043-1047, 2014.
70. LUYCKX, Valerie A. Nephrotoxicity of alternative medicine practice. **Advances in chronic kidney disease**, v. 19, n. 3, p. 129-141, 2012.
71. MACIEL, M. V. *et al.* Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre *Lutzomyia longipalpis*. **Cienc Animal**, v. 19, n. 2, p. 77-87, 2009.
72. MÄKINEN, Kauko K. Gastrointestinal disturbances associated with the consumption of sugar alcohols with special consideration of xylitol: Scientific review and instructions for dentists and other health-care professionals. **International journal of dentistry**, v. 2016, 2016.

73. MATOS, FJ de A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Rev Bras Farm**, v. 79, n. 3-4, p. 84-87, 1998.
74. MITCHELL, Helen (Ed.). **Sweeteners and sugar alternatives in food technology**. John Wiley & Sons, 2008.
75. MONTEIRO, Maria Vivina Barros *et al.* Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.
76. MOON, Hee-Jung *et al.* Biotechnological production of erythritol and its applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 4, p. 1017-1025, 2010.
77. MOTA, V.T. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*. 4 ed. Médica Missau: Porto Alegre, 2003.
78. NARVAI, Paulo Capel. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, p. 381-392, 2000.
79. NEUWIRTH, Amanda; CHAVES, Ana Letícia Rocnieski; BETTEGA, Janine Maria Ramos. Propriedades dos óleos essenciais de cipreste, lavanda e hortelã-pimenta. **Universidade do Vale do Itajaí–UNIVALI**. Balneário Camburiú, Santa Catarina, 2015.
80. OECD. **Test No. 423: Acute oral toxicity-Acute toxic class method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**, 2002.
81. OLIVEIRA, Fillipe Pereira de *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 510-516, Dec. 2006
82. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**. OECD Publishing, 2008.
83. PALOMBO, Enzo A.. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2011, p. 1-15, 2011. Hindawi Limited.

84. PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H. N.; KUMAR, S.. Essential Oils as Potent Source of Nematicidal Compounds. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 148, n. 7-8, p. 501-502, ago. 2000. Wiley.
85. PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74, 2011.
86. PARK, Gi-Cheol; KIM, Jong-Su. Recommendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. **The Journal of the Korean dental association**, v. 40, n. 1, p. 42-53, 2002.
87. PAUMGARTTEN, Francisco José Roma *et al.* Comparison of five methods for the determination of lethal dose in acute toxicity studies. 1989.
88. PETERSON, Michael E. Xylitol. **Topics in companion animal medicine**, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2013.
89. POSER, G.L.; MENTZ, L.A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. In: SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R (editores). *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (1ed). Porto Alegre (RS): UFRGS, 2004: 61-74.
90. PREDOI, Daniela *et al.* Antimicrobial Activity of New Materials Based on Lavender and Basil Essential Oils and Hydroxyapatite. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, 2018.
91. PUNDIR, C. S.; JAKHAR, Seema; NARWAL, Vinay. Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 123, p. 36-50, 2019.
92. PURCHASE, Iain FH *et al.* Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v. 43, n. 2, p. 86-101, 1998.
93. RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v.39, p. 603-613, 2001.
94. REGNAT, K.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. Erythritol as sweetener—wherefrom and whereto?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 587-595, 2018.
95. RISPIN, Amy *et al.* Alternative methods for acute oral toxicity testing: practical guidance for implementation. **Lab animal**, v. 31, n. 7, p. 42-48, 2002.

96. RODRIGUES, Humberto G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.
97. RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard. **The principles of humane experimental technique**. Methuen, 1959.
98. SALLI, Krista et al. Xylitol's health benefits beyond dental health: a comprehensive review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1813, 2019.
99. SCHENKEL, E.L, ZANNIN, M., MENTZ, L.A., BORDIGNON, S.A.L., IRGANG, B. **Plantas Tóxicas**. 5.ed. Florianópolis: UFRGS, p. 959-993, 1990.
100. SCIENTIFIC COMMITTEE ON HEALTH AND ENVIRONMENTAL RISKS. Critical review of any new evidence on the hazard profile, health effects, and human exposure to fluoride and the fluoridating agents of drinking water. 2011.
101. SHOJA, M. M. et al. Herbal Diuretics in Medieval Persian and Arabic Medicine. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.309-320, 2015
102. SOUSA SILVEIRA, Zildene de et al. Evaluation of the antibacterial activity and efflux pump reversal of thymol and carvacrol against *Staphylococcus aureus* and their toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2103, 2020.
103. SUJARWO, W. et al. Ethnobotanical uses of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.; Meliaceae) leaves in Bali (Indonesia) and the Indian subcontinent in relation with historical background and phytochemical properties. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 189, p.186-193, 2016.
104. TANDON, N.; YADAV, S. S. Contributions of Indian Council of Medical Research (ICMR) in the area of Medicinal plants/Traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 197, p.39-45, 2017.
105. TOVAR R.T., PETZEL, R.M. Herbal toxicity. *Disease-a-month*, v.55, n.10, p.592-641, 2009
106. TREVAN, John William. The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, v. 101, n. 712, p. 483-514, 1927.

107. TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p.3-10. (Biology and resource management series).
108. UR-REHMAN, Salim et al. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1514-1528, 2015.
109. VALADARES, Marize C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.
110. VALE, Letícia et al. Binary combinations of thymol, carvacrol and eugenol for *Amblyomma sculptum* control: Evaluation of in vitro synergism and effectiveness under semi-field conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 6, p. 101816, 2021.
111. VARGHESE, Jothi; TUMKUR, Vijay Kumar; BALLAL, Vasudev; BHAT, Giliyar Subraya. Antimicrobial effect of *Anacardium occidentale* leaf extract against pathogens causing periodontal disease. **Advances In Bioscience And Biotechnology**, [s.l.], v. 04, n. 08, p. 15-18, 2013. Scientific Research Publishing, Inc.
112. VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
113. VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. da. Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus faecalis* Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2014, p. 1-5, 2014. Hindawi Limited.
114. VERAS, Helenicy NH et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytotherapy research*, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2013.
115. VILLAS BÔAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas

- brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.6, 2007
116. VINCENT, M. Françoise; VAN DEN BERGHE, Georges; HERS, Henri-Géry. D-Xylulose-induced depletion of ATP and Pi in isolated rat hepatocytes. **The FASEB journal**, v. 3, n. 7, p. 1855-1861, 1989.
117. WANG, Hong-wei et al. Mitochondrial respiratory chain damage and mitochondrial fusion disorder are involved in liver dysfunction of fluoride-induced mice. **Chemosphere**, v. 241, p. 125099, 2020.
118. WARREN, Melanie R. et al. Peanut butter as an alternative dose delivery method to prevent strain-dependent orogastric gavage-induced stress in mouse teratogenicity studies. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 107, p. 106948, 2021.
119. WHO- World Health Organization. **Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals**. Parte 1 EHC 6, 1978
120. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. **World Health Organization**, 2013.
121. WRIGHT, J. Timothy et al. Fluoride toothpaste efficacy and safety in children younger than 6 years: a systematic review. **The Journal of the American Dental Association**, v. 145, n. 2, p. 182-189, 2014.
122. XIA, Z.; HE, Y.; YU, J. Experimental acute toxicity of xylitol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 5, p. 465-469, 2009.
123. YANG, Bo et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 1605-1611, 2018.
124. ZHAO, Yangfei *et al.* Fluoride exposure induces mitochondrial damage and mitophagy via activation of the IL-17A pathway in hepatocytes. **Science of The Total Environment**, v. 804, p. 150184, 2022.
125. ZHAO, Yangfei *et al.* Fluoride induces apoptosis and autophagy through the IL-17 signaling pathway in mice hepatocytes. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 11, p. 3277-3289, 2018.