

Faculdades Integradas de Patos
 Curso de Medicina
 v. 1, n. 2, Abr-Jun. 2016, p. 130-140.
 ISSN: 2448-1394



ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO, BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO*

*TOXICITY STUDY OF TERPENES BETULINIC ACID, BOTULIN AND OLEONOLIC ACID: AN *IN SILICO* APPROACH*

Clarissa de Moraes Martins Neri
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
clarissa.clarinha@hotmail.com

Eduardo Bitu Pinto
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
eduardoobitu@gmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
 Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba - Brasil
abrahao.farm@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar o potencial tóxico de alguns terpenos, ácido betulínico, betulina e ácido oleanólico, utilizando modelos *in silico*. **Métodos:** Ao se realizar a classificação metodológica desta pesquisa, pode-se perceber que trata-se de um estudo aplicado, quantitativo e experimental. Todas as informações químicas dos terpenos selecionados foram obtidas no site <http://www.chemspider.com/>. Para a análise da toxicidade teórica foi submetido ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET usando o programa Osiris Property Explorer. Para a análise dos dados obtidos na pesquisa utilizou-se o software Microsoft excel® 2010. **Resultados:** Os três terpenos analisados, assim como a Clorexidina, não apresentaram nenhum potencial mutagênico, tumorigênico e irritante, como também não apresentaram danos ao sistema reprodutor sendo classificados na escala 1, significativa de dano ausente. Demonstrando assim, *in silico* a segurança do uso destes compostos. No entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados. **Conclusões:** Pode-se concluir que, assim como a Clorexidina, excelentes substâncias isoladas de plantas estão sendo descobertas para o desenvolvimento de terapias alternativas na odontologia, e testes *in silico* são de extrema importância para verificar a qualidade destes novos compostos.

Palavras-Chave: Placa dental. Ação antimicrobiana. Toxicidade.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the potential toxicity of some of these terpenes, betulinic acid, betulin and oleanolic acid, using *in silico* models. **Methods:** When performing the methodological classification of this research, we realized that it is an applied, quantitative and experimental study. All chemical information from the selected terpenes were obtained in the site <http://www.chemspider.com/>. For the analysis of theoretical toxicity it was submitted to the *in silico* study of ADMET parameters using the Osiris Property Explorer program. For the analysis of obtained data in the research it was used the software Microsoft Excel® 2010. **Results:** The three analyzed terpenes, as well as chlorhexidine, showed no mutagenic, tumorigenic and irritating potentials, and also did not present damage to the reproductive system being classified on the scale 1, absent significant damage. Demonstrating, *in silico* the safety of these compounds, however, clinical trials are crucial to prove these results. **Conclusions:** It can be concluded that, as well as Chlorhexidine, excellent compounds isolated from plants are being discovered to develop alternative therapies in dentistry, and *in silico*, tests are extremely important to check the quality of these new compounds.

Keywords: Dental plaque. Anti-infective agents. Toxicity.

1. Introdução

O conhecimento sobre a placa dental evoluiu significativamente desde a sua primeira observação por van Leewenhoek em 1684. Modernamente a placa dental é reconhecida como um biofilme verdadeiro.¹ O biofilme pode ser definido como uma população microbiana aderida a um substrato orgânico ou inorgânico, estando envolvida por seus produtos extracelulares, os quais formam uma matriz intermicrobiana podendo ocorrer na superfície de várias estruturas na natureza.² Na boca, o biofilme é composto por micro-organismos sobre uma camada de proteína denominada película que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival.³

Os micro-organismos presentes no biofilme podem se dividir em aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estrictos. Podem também ser divididos de acordo com a coloração apresentada, em Gram-positivos e Gram-negativos.⁴ O biofilme é academicamente classificado em supragengival e subgengival. A composição microbiana destes dois tipos difere no tipo e/ou proporção de espécies bacterianas, pois estas áreas estão sujeitas a diferentes condições ambientais, como por exemplo, disposição de nutrientes e exposição ao oxigênio. As espécies bacterianas mais comumente detectadas no biofilme são: *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis biovar 1 e 2*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *Actynomices naseslundii*, *Actynomices Odontolyticus*, *Neisseria sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, *Prevotella sp.*, *Haemophilus*, *Fusobacterium sp.*, *Eubacterium* e Bacterioides.⁵

Muitos estudos demonstraram que o biofilme dental é o fator determinante da cárie dentária e doença periodontal, justificando a utilização de medidas para o seu controle.⁶ O controle mecânico do biofilme (escovação e uso do fio dental) é o mais

aceito, e os agentes químicos têm sido utilizados como coadjuvantes da higiene bucal quando incorporados em soluções para bochecho.⁷ Há constante necessidade de se avaliar meios alternativos para o controle do biofilme. A fitoterapia pode ser mais um recurso dentro dos programas de prevenção e promoção em saúde bucal. Há tempos as plantas são usadas pela população com o objetivo de tratar e curar doenças.⁸ Com o importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos, tem-se estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental.⁹

A maioria destas terapias envolvem o uso de extratos de plantas ou seus compostos ativos, tais como os terpenos.¹⁰ Segundo Glória (1994),¹¹ os terpenos representam o grupo mais importante de substâncias químicas secretadas, sendo derivados do isopreno (unidade ramificada de cinco carbonos) e classificados de acordo com o número mínimo dessas unidades presentes na molécula. Os terpenos são metabólitos secundários, porque eles são classificados como não essenciais para a sua viabilidade; no entanto, eles promovem interações importantes entre plantas e o meio ambiente.¹² Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica.¹³ Estudos mostram que os terpenos têm diversas propriedades farmacológicas incluindo antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e antiespasmódica.^{14, 15}

A utilização dos terpenos podem exercer efeitos adversos no organismo, caracterizando assim um grave problema de saúde pública.¹⁶ Estes efeitos, bem como a eventual ação sinérgica com outras drogas são bastante comuns. Neste contexto, testes toxicológicos avaliam os efeitos do tratamento em muitos órgãos.¹⁷ Estes parâmetros são usados para caracterizar doses, relações de resposta, e ajudar a selecionar as concentrações ideais utilizadas em tratamentos com essas substâncias.¹⁸

Sabendo-se da importância da descoberta de produtos naturais com efeitos terapêuticos, bem como a possibilidade de efeitos tóxicos ao organismo causados pelos terpenos, torna-se relevante estudar o potencial toxicológico de alguns exemplos destes metabólitos secundários com propriedade antimicrobianas já relatada contra bactérias que compõem o biofilme bucal, como por exemplo o Ácido Betulínico, Betulina, e o Ácido Oleanólico, avaliando o efeito mutagênico, tumorigênico, irritante e alterações no sistema reprodutor causados pelos mesmos e comparar os resultados com a Clorexidina, um agente antimicrobiano padrão utilizado na Odontologia, afim de se confirmar a possibilidade de novas opções terapêuticas.

Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial tóxico dos terpenos Ácido Betulínico, Betulina e Ácido oleanólico, utilizando modelos *in silico*.

2. Métodos

Para a realização dos estudos *in silico*, todas as informações químicas (estrutura química da molécula, massa molecular, polaridade, CAS-number) dos terpenos selecionados (Ácido Betulínico, Betulina, Ácido Oleanólico) foram obtidas no site <http://www.chemspider.com/>.

Para a análise da toxicidade teórica as estruturas dos terpenos foram submetidas ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>). Nesta análise foram determinados os potenciais mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução.¹⁹

Para a análise dos dados obtidos na pesquisa e futura construção dos gráficos utilizou-se o software Microsoft excel[®] 2010. Os resultados foram classificados a partir de uma escala de 1 a 3, onde 1 significava toxicidade ausente, 2 toxicidade moderada e 3 toxicidade severa.

3. Resultados e discussão

O crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e outras afecções bucais.²⁰

As pesquisas com produtos naturais no meio odontológico buscam por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população. A aceitação popular da fitoterapia leva a boas perspectivas no mercado de produtos odontológicos que contém substâncias naturais, e estes podem ser introduzidos desde que estudos laboratoriais e clínicos específicos comprovem sua eficácia.²¹

Produtos naturais sejam extratos, frações ou fitoconstituintes, devem ser estudados através de métodos idênticos que avaliem a segurança e a eficácia, de modo semelhante aos compostos sintéticos, visto que seus efeitos além de toxicidade, podem desencadear efeitos mutagênicos, tumoral, irritante e alterações no sistema reprodutor.²²

A determinação do perfil farmacocinético juntamente com a toxicidade são parâmetros importantes na definição de biodisponibilidade e efeitos tóxicos de uma molécula, ajudando na redução do tempo e do custo do processo de investigação e desenvolvimento de novas drogas.²³

Modelos de previsão assistida por computador, as chamadas ferramentas de previsão, desempenham um papel essencial no repertório proposto de métodos

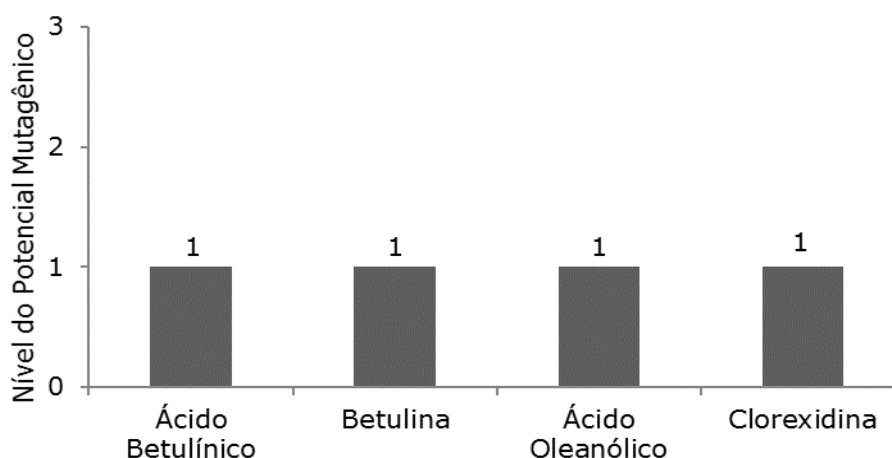
alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto, além de modelos *in vitro*.^{24,25}

Neste contexto, destacam-se os estudos com modelos *in silico* (expressão usada com o significado de "executado em computador"), que estão sendo aplicados para a avaliação da toxicidade de um composto no meio metabólico de mamíferos, e cuja utilização dentro de um ambiente regulatório também tem sido incentivada pela legislação recente e que podem fornecer várias previsões sobre dados como os possíveis potenciais mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e tóxicos sobre diferentes sistemas do organismo humano.^{26,27}

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose.²⁸ Os tecidos epiteliais de revestimento são mais afetados diretamente por agentes químico-físicos, que podem expressar uma condição de genotoxicidade, especificamente o epitélio oral (tecido pavimentoso estratificado não queratinizado) apresenta maior capacidade de absorção, devido às estruturas de suas células.²⁹

Nos resultados encontrados no presente estudo, os três terpenos analisados, assim como a Clorexidina, não apresentaram nenhum potencial mutagênico, sendo classificados na escala 1, significativa de mutagenicidade ausente (Figura 1). Demonstrando assim, *in silico*, a segurança do uso destes compostos em relação a futuros danos sobre células do corpo humano.

Figura 1 - Potencial Mutagênico dos terpenos em comparação com a clorexidina



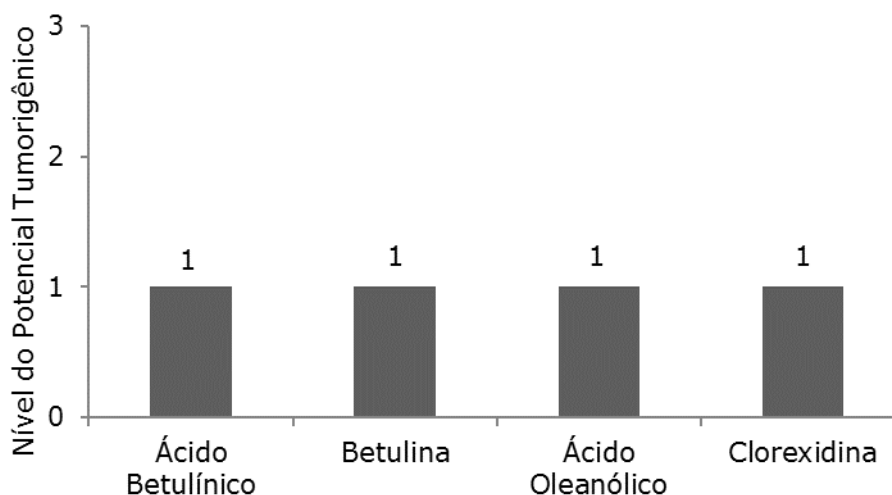
Fonte: Pesquisa (2015).

Os resultados estão de acordo com o estudo de Zhang, Ling, Ji e Fang (2008)³⁰ que verificaram que a betulina e outros derivados dela não são tóxicos e nem mutagênicos; mostram também que o ácido betulínico pode ser sintetizado a partir da betulina, ou seja, assim como ela, não apresenta potencial mutagênico o seu derivado betulina também não é tóxico. Em estudos como o de Liu (1995)³¹ foi observado que o ácido oleanólico além de sua propriedade anti-inflamatória, apresenta também atividade antitumoral.

A formação tumoral envolve mecanismos biológicos complexos e ainda desconhecidos, por isso, a identificação de marcadores para determinar quais células realmente apresentam potencial tumorigênico é um processo complexo.³² Segundo Sivropoulou et al. (1996),³³ muitos eventos podem induzir processos de carcinogênese, causando modificações genéticas nas células, alterando o controle da diferenciação, mitose e apoptose celular.

Com base nos resultados encontrados (Figura 2), os três compostos não apresentaram potencial tumorigênico, assim como a Clorexidina, demonstrando mais uma vez a segurança do uso dessas substâncias sem risco de desenvolvimento de danos.

Figura 2 - Potencial Tumorigênico dos terpenos em comparação com a clorexidina



Fonte: Pesquisa (2015).

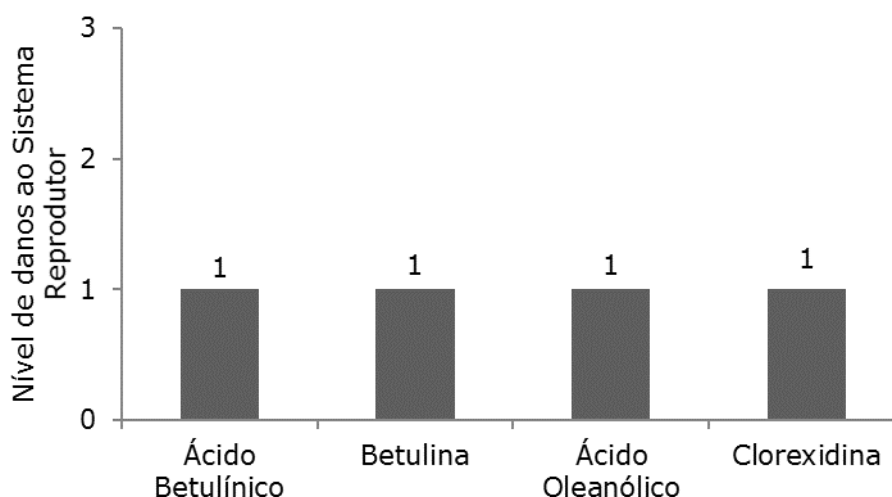
Estes resultados corroboram com o estudo de Król et al. (2015)³⁴ onde foi comprovado o uso clínico do ácido betulínico em várias doenças, incluindo quimioterapias anticâncer. No estudo de Fulda & Debatin (2000)³⁵ foi comprovado que o ácido betulínico pode inibir a formação de células tumorais, a transferência, a diferenciação induzida e a apoptose de células tumorais.

Testes toxicológicos de plantas medicinais avaliam os efeitos do tratamento em muitos órgãos,¹⁸ bem como a influência sobre a reprodução.¹⁷ Estes parâmetros são usados para caracterizar a relação dose x resposta, e ajudar a selecionar as doses utilizadas em estudos da exposição crônica a certas substâncias.¹⁸

O sistema reprodutor masculino por exemplo, é muito sensível à ação de fatores prejudiciais e a exposição a certos agentes podem causar alterações nesses órgãos, prejudicando a reprodução e a competência do indivíduo.¹⁶ A ação de um agente tóxico pode interferir com a maturação sexual, a produção e transporte de gametas, o ciclo espermatogênico, o comportamento sexual e/ou a fertilidade.³⁶

Quanto à avaliação para o nível de dano causado ao sistema reprodutor, pôde-se observar que os três terpenos, assim como a Clorexidina, foram classificados na escala 1, significativa de ausência de danos, conforme mostra a (Figura 3).

Figura 3 - Nível de danos ao Sistema Reprodutor dos terpenos em comparação com a Clorexidina



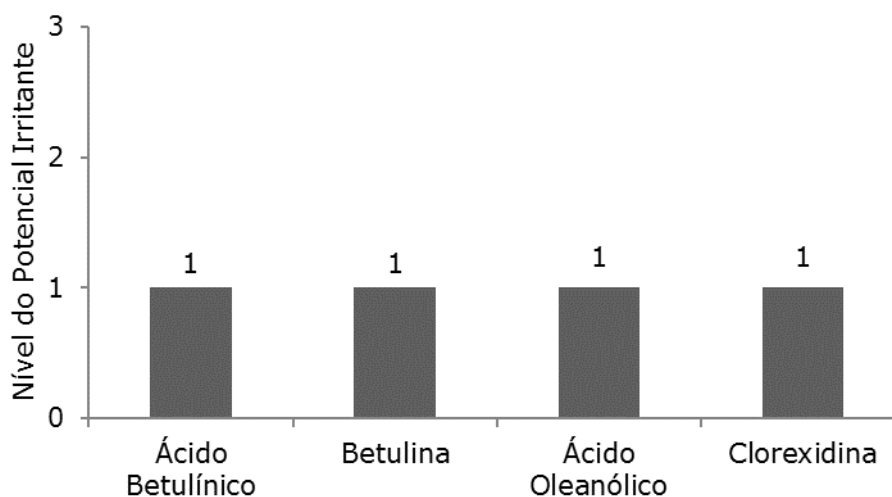
Fonte: Pesquisa (2015).

Os resultados encontrados vão de acordo com estudos como os de Sousa (2009)³⁷ onde verificou-se que os triterpenos encontrados na *Cimicífuga Racemosa*, além de não causarem danos ao sistema reprodutor, é uma planta utilizada em mulheres para o tratamento de sintomas da menopausa.

A irritação pode ser definida como intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto, variando sua intensidade desde ardor, coceira e pinicação, podendo chegar até a corrosão e destruição dos tecidos. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com a substância.³⁸

Quanto ao resultado apresentado na (Figura 4), verifica-se que os três terpenos não demonstraram nenhum potencial irritante, assim como a Clorexidina, sendo mais uma vez classificados no nível 1, conclusivo de dano ausente.

Figura 4 – Nível do Potencial Irritante dos terpenos em comparação com a Clorexidina



Fonte: Pesquisa (2015).

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com o estudo desenvolvido por Zhang, Ling, Ji, Fang (2008)³⁵ que comprova que além dos efeitos benéficos, o ácido betulínico não apresenta potencial tóxico, nem irritante. Estudos como o de Tokarnia et al. (1999)³⁹ comprovam que os triterpenos presentes na *Lantana Camara* são substâncias que possuem bons efeitos e nenhum potencial tóxico ou irritante ao ser humano.

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que os terpenos: Ácido Betulínico, Betulina e Ácido Oleanólico apresentaram efeitos tão satisfatórios quanto o Digluconato de Clorexidina (0,12%), comprovando que estes compostos apresentam excelentes indicações para serem utilizados como substâncias antimicrobianas, visto que, quando utilizadas da maneira correta não possuem capacidade de desenvolver efeitos adversos como, efeitos irritantes, mutagênicos, tumorigênicos e danos ao sistema reprodutor humano. No entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados.

Dessa forma pode-se concluir que, assim como a Clorexidina, excelentes substâncias isoladas de plantas estão sendo descobertas para o desenvolvimento de

terapias alternativas na odontologia, e testes *in silico* são de extrema importância para verificar a qualidade destes novos compostos, facilitando assim, a seleção de substâncias ideais para estudo *in vivo*, como também a fabricação de medicações fitoterápicas alternativas, tão eficientes quanto à Clorexidina no controle do biofilme bucal.

Referências

1. Wilderer PA, Characklis WG. Structure and function of biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA. Structure and function of biofilms. Chichester, U. K: John Wiley, 1989, p. 5-17.
2. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endodontic topics 2004; 9(1); 27-36.
3. Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 2005.
4. Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Microbiologia. 3 ed. Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte: 1999.
5. Harris LG, Murray S, Pascoe B, Bray J, Meric G, Magerios. Biofilm Morphotypes and Population Structure among Staphylococcus epidermidis from Commensal and Clinical Samples. PLoS One. 2016; 11(3): 151-214.
6. Axelsson P, Lindhe J. The effect of a preventive programme on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. J. Clin. Periodontol., 1974; 1(2): 126- 138.
7. Cury J A. Controle Químico da Placa Dental. In: KRIGER, L. (Coord.). Promoção de saúde bucal: Paradigma, Ciência, Humanização. São Paulo: 3 ed. Artes Médicas/ABOPREV; 2003. p. 141-151.
8. Buffon MCM, Pecharki GD, Mariot CA, Gomes EC. O uso de fitoterápicos em odontologia. Rev Pro-odonto, ciclo 4, módulo 4, 2011.
9. Lima GR. Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos. Monografia (Ciências Farmacêuticas) - Brasília, Universidade de Brasília, 2006.
10. Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Ann Nutr Metab., 2003; 47(1); 95-106.
11. Glória BA. Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia: Estruturas Secretoras nos Vegetais Superiores. Edição Cursos Agrozootécnicos ESALQ-USP. Piracicaba. São Paulo, 1994, 81p.
12. Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Boil., 1995; 46(1): 521-547.

13. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol Oxford*. 1994; 32(1): 31-36.
14. Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). *Rev Bras Farmacogn.*, 2003; 13(1): 36-38.
15. Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Aquije GMFV, Fernandes AAR, Santos RB, et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropicalis fruits preservatives. *Braz j Microbiol.*, 2008; 39(1): 163-168.
16. Reboredo MM, Lucinda LMF, Rocha CB, Queiroz GT, Faria VC, Vieira VA. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia férrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. *Bol Cent Biol Reprod.*, 2007; 26(1); 11-17.
17. Clark DO. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. *Toxicol Mech Method.*, 1993; 3(1): 223-251.
18. Barnes DG, Dourson M. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*, 1988; 8(1): 471-486.
19. Abreu PA. Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas. [dissertação]. Niteroi: Universidade Federal Fluminense/UFF; 2008. 138 p.
20. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Braz J Pharmacogn.*, 2007; 17(3); 466-476.
21. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev bras Farmacogn.*, 2007; 17(1): 114-140.
22. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. 2001; 56(1); 5-51.
23. Tavares LC, QSAR: A abordagem de Hansch. *Quim Nova*. 2004; 27(4): 631-639.
24. Carvalho MF, Albuquerque Junior CL, Guidolin AF, Farias FL. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. *Rev Bras Plantas Med.*, 2009; 11(3): 339-346.
25. Arnous AH, Santos AS, Beininger RPC. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Rev Esp S.*, 2005; 6(2): 1-6.
26. Sami A, Taru M, Salme K, Jari Y. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *J Europ Pharmac Sciences*. 2006; 29(1); 1-13.
27. Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paganetto G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* Muell. *Arg Latex Phytomedicine*. 2003; 10(1); 139-144.

28. Trevizan MA, Mendes IAS, Fávero N, Costa MATR. Acerca da dedicação do enfermeiro-chefe às atividades de assistência direta ao paciente. *Rev Paul Hosp.*, 1980: 28(8); 227-233.
29. Santos MH, Oliveira TT, Nagem TJ, Oliveira JR, Queiros MELR, Lima RD. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (Bacupari) sobre bactérias patogênicas. *Rev Bras Farm.*, 1999: 35(2); 297-301.
30. Zhang X, Ling L, Ji Y, Fang G. Bioactivities of Betulinic Acid. *Col L Science*. Beijing 2008.
31. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacology*. 1995: 49(2); 57-68.
32. Snijman PW, Swanevelder S, Elizabeth Joubert E, Green IR, Gelderblom WCA. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutat Res.*, 2007: 631;111-123.
33. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* Essential Oils. *J Agric Food Chem.*, 1996: 44(5); 1202-1205.
34. Król SK, Kielbus M, Rivero-Müller A, Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *BioMed Res Int.*, 2015: 2015(2015); 1-11.
35. Fulda S, Debatin KM. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumor. *Med Pediatr Oncol.*, 2000: 35(6); 616-618.
36. Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 2005: 34(1); 6-8.
37. Souza AC. Tratamento dos sintomas do climatério utilizando medicamento fitoterápico: estudo de revisão [monografia]. Umuarama: Universidade Paranaense; 2009.
38. Lawless H, Stevens DA. Effects of oral chemical irritation on taste. 1989: 32(6); 995-998.
39. Tokarnia CH, Armién AG, Barros SS, Peixoto PV, Döbereiner J. Estudos complementares sobre a toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. *Pesq Vet Bras.*, 1999: 19(3/4); 128-132.