

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO DE TOXICIDADE REPRODUTIVA E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Origanum majorana*

Andrea dos Santos Dantas

Porto Alegre, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO DE TOXICIDADE REPRODUTIVA E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Origanum majorana*

Aluna: Andrea dos Santos Dantas

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Morfologia, Cirurgia e Reprodução
Animal, subárea Anatomia Animal,
Cirurgia, Farmacologia e Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga
de Mello

Coorientadora: Prof. Dr. Fernanda Bastos
de Mello

Porto Alegre, RS

2016

*Dedico esse trabalho
a minha mãe, Ana Santos, pelo
exemplo de dedicação profissional;
ao meu marido, Jeferson Medina, pelo
incentivo contínuo no meu crescimento; e
aos meus filhos, Rômani e Maitê, pela
alegria e coragem que despertam em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Mello, pela oportunidade, confiança, orientação, empenho para a realização e conclusão desse trabalho, e pelas palavras certas nas horas certas. Muito obrigada!!!

À Prof. Fernanda Mello, coorientadora desse trabalho, por participar ativamente da execução do projeto, sempre disponível e atenciosa, e com orientações muito importantes nas práticas de pesquisa. Muito obrigada!!!

Às colegas de doutorado Clarissa Hollenbach e Luciana Dalazen, por todo o auxílio, encorajamento, e por terem se tornado amigas. Vocês foram muito importantes na execução desse projeto. Muito obrigada!!!

Às queridas Jéssica Dafré, Caroline Barroco, Fabiane Pohlmann, Luisa Giacomini, Jaqueline Pereira da Silva, Isabela de Paula, Laís Jardim, Thaís Elisa Damo, Priscila Ramires da Silva e Bruna Rangel, alunas da UFRGS e UFCSPA, pela disposição em participar e responsabilidade com as atividades do projeto, além da simpatia e alegria na realização do trabalho. Serão excelentes profissionais e cientistas. Muito obrigada!!!

Aos laboratórios colaboradores nesse trabalho: Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, UFRGS (Luiz Carlos Klein-Júnior, Prof. Amélia Henriques), Reparação de DNA em Eucariotos, UFRGS (Miriana Machado, Temenouga Guecheva, Prof. Henriques), Setor de Patologia Veterinária, UFRGS (Lismara Nascimento, Prof. David Driemeier), Laboratório Axis Analysis (Fabrício Torres, DMV, MSc.), Woil Extração de Óleos essenciais (Edgar Witkowski). Muito obrigada!!!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa CNPQ, pelo financiamento e bolsa de doutorado, fundamentais na execução do projeto. Muito obrigada!!!

Aos Professores e Colaboradores do PPGCV, pela dedicação e gentileza que dispensaram durante o período de vínculo com o curso. Especialmente à Alice, pela atenção e dedicação. Muito obrigada!!!

RESUMO

Origanum majorana L., planta rica em óleos essenciais, apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii*, entre outras atividades. No entanto, a exposição a produtos químicos, incluindo medicamentos à base de plantas, podem causar mutagenicidade, infertilidade, toxicidade materna e embriofetotoxicidade. Visando avaliar esses efeitos, este estudo investigou toxicidade reprodutiva do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) e compostos majoritários em ratos Wistar, os efeitos sobre o desenvolvimento fetal e parâmetros comportamentais da prole, e atividade mutagênica *in vitro*. As doses testadas *in vivo* foram 33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg Omeo, 77mg/kg γ -terpineno ou 52mg/kg terpinen-4-ol, estabelecidas de acordo com estudos prévios. Ratos machos foram tratados durante 70 dias e fêmeas por 14 dias antes do acasalamento, durante a gravidez e lactação. Para identificar alterações no sistema reprodutivo de machos foram avaliados: peso relativo de órgãos, histopatologia, número e morfologia de espermatozóides, taxas reprodutivas, ganho de peso, ingestão de água e alimento, e sinais de toxicidade. Comportamento e sinais de toxicidade materna, parâmetros reprodutivos, comportamento em campo aberto e sexual da prole também foram avaliados. O potencial teratogênico foi observado na progênie de machos não tratados e fêmeas tratadas apenas durante a prenhez. No dia 21, após cesárea, os fetos foram diafanizados, corados e avaliados individualmente para a presença de alterações esqueléticas. A exposição reduziu de maneira dose dependente taxas reprodutivas, número e produção diária de espermatozóides, além de induzir aumento de defeitos em espermatozoides (Omeo e terpinen-4-ol), e reduzir peso relativo de testículos e epidídimos com 300mg/kg Omeo. Não foi observada prenhez com esta dose e com terpinen-4-ol. O comportamento materno relacionado ao ninho foi reduzido com 100mg/kg Omeo, mas a capacidade de resposta materna foi mantida pelo comportamento de amamentação e cuidados. Esta dose induziu redução do número de descendentes, aumento do tempo de prenhez e retardo na separação prepucial de filhotes. Outros parâmetros reprodutivos e comportamentais da prole não foram afetados. Observou-se atraso do desenvolvimento esquelético em todos os grupos tratados e malformações do esqueleto com as doses máximas de Omeo e terpinen-4-ol. Mutagenicidade *in vitro* foi avaliada pelo teste de *Salmonella*/microsoma utilizando o procedimento de pré-incubação das linhagens TA98, TA97, TA100, TA102 e TA1535 de *S. typhimurium*, com ou sem ativação metabólica. Citotoxicidade foi detectada em concentrações superiores a 0,04 mL/placa Omeo em ausência da mistura S9 e superior a 0,08mL/placa em presença, e não se observou qualquer aumento de mutação gênica. Para o teste de micronúcleos em células de mamíferos *in vitro*, foi utilizado células V79 de fibroblastos de pulmão de hamster chinês. Citotoxicidade foi observada em concentrações maiores ou iguais a 0,05ug/mL e quando testado em concentrações não citotóxicas, Omeo não induziu mutação cromossômica. Concluindo, Omeo não é capaz de induzir *in vitro* mutações gênicas ou cromossômicas, no entanto, o tratamento contínuo em doses elevadas de Omeo e compostos majoritários afetam a fertilidade masculina, induzem alterações nas taxas reprodutivas e causam malformação e efeitos adversos sobre a descendência, não devendo ser utilizado nessas doses durante a gravidez e lactação.

ABSTRACT

Origanum majorana L., a plant rich in essential oils, presents antifungal activity in vitro against *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp and *Trichosporon asahii*, among other activities. However, exposure to chemicals, including herbal medicines, can cause mutagenicity, infertility, maternal toxicity, embryotoxic effects on offspring. Therefore, this study investigated in vivo reproductive toxicity of the *Origanum majorana* essential oil (Omeo) and major compounds on rats Wistar, effects on the fetal development and behavioral parameters of the offspring, and in vitro mutagenic activity. The in vivo tested doses were 33mg/kg, 100mg/kg or 300mg/kg Omeo, 77mg/kg γ -terpinene or 52mg/kg terpinen-4-ol, established according to previous studies. Male parents were treated for 70 days and females for 14 days prior to mating, during pregnancy and lactation. To identify alterations in reproductive system of males were evaluated organs relative weight, histology, sperm number and morphology of spermatozoa. Reproductive index, body weight gain, intake water and food, and toxicity signs were evaluated. Signs of maternal toxicity, maternal behavior, offspring reproductive parameters, open field behavior and sexual behavior were observed. To evaluated the teratogenic potential, female rats Wistar were treated only during pregnancy and males were not treated. At 21th was performed cesarean, fetuses were diaphanized, stained and evaluated individually for the presence of skeletal alterations. The exposure induced dose-dependent way reduction in reproductive index, reduction in sperm number, reduction in daily sperm production, increase in sperm defects to males treated with Omeo and Terpinen-4-ol, reduction in testis and epididymis relative weight to 300mg/kg Omeo, and no pregnancy at this dose and terpinen-4-ol. Maternal toxicity was not observed. The maternal behavior related to the nest was reduced with 100 mg/kg Omeo, but the maternal responsiveness was maintained by the nursing behavior. This dose induced reduction in the number of offspring per parent, increase in the time of pregnancy and changes in the development of males characterized by delayed preputial separation. Other reproductive and behavioral parameters of the male offspring were not affected. However, it was observed skeletal development delay in all treated groups and skeletal malformation at the highest doses of Omeo and terpinen-4-ol. Mutagenicity in vitro was evaluated by the Salmonella/microsome test using the preincubation procedure on TA98, TA97a, TA100, TA102 and TA1535 *Salmonella typhimurium* strains, with or without metabolic activation. Cytotoxicity was detected at concentrations higher than 0.04 μ L/plate Omeo in the absence of S9 mix and higher than 0.08 μ L/plate in the presence, and no gene mutation increase was observed. For the in vitro mammalian cell micronucleus test, it was used V79 Chinese hamster lung fibroblasts. Cytotoxicity was observed at concentrations higher or equal to 0.05 μ g/mL. Moreover, when tested in non-cytotoxic concentrations, Omeo was not able to induce chromosome mutation. In conclusion, Omeo is not able to induce in vitro gene and chromosome mutations, however, the continuous treatment with high doses Omeo and major compounds affect male fertility, induce changes in reproductive rates, cause malformation and adverse effects on the developing offspring, and should not be used during pregnancy and lactation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Foto de <i>Origanum majorana</i> em floração.....	15
Figura 2. Períodos de tratamento de progenitores em teste de toxicidade reprodutiva em ratos	22

ARTIGO I

Figure 1. Mating index and Pregnancy index	48
Figure 2. Histopathological section of the testis stained with hematoxylin and eosin (x100)	50
Figure 3. Histopathological section of the epididymis stained with hematoxylin and eosin (x100)	51
Figure 4. Schematic diagram of possible mechanisms mediating <i>Origanum majorana</i> essential oil decrease fertility	54

ARTIGO II

Figura 1. Algumas das alterações esqueléticas observadas em fetos de fêmeas tratadas com 100mg/kg Omeo e 300mg/kg Omeo do 6° ao 15° dia da gestação.....	66
--	----

ARTIGO III

Figura 1. Comportamento materno em relação à construção e qualidade do ninho de ratas lactantes nos dias 1, 5 e 10 pós-parto (PPD1, 5 e 10).....	78
Figura 2. Comportamento materno em relação à ninhada nos dias 1, 5 e 10 pós-parto (PPD1, 5 e 10).....	79
Figura 3. Comportamento de machos em teste de campo aberto.....	82

ARTIGO IV

Figure 1. Micronucleus frequency of V79 cells exposed to different <i>O. majorana</i> essential oil (OMEQ) concentrations for 3 h and 21 h	104
--	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1. Effects of treatment with <i>O. majorana</i> essential oil (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) and major compounds (77mg/kg γ -terpinene and 52mg/kg Terpinen-4-ol) on sperm number in the epididymis tail, daily sperm production per organ and per male, sperm transit rate, sperm morphology and testosterone level.....	49
Table 2. Final body weight (g) and organ relative weights (g%) of male rats treated with different concentrations of <i>O. majorana</i> essential oil (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) and major compounds (77mg/kg γ -terpinene and 52mg/kg Terpinen-4-ol)	52
Table 3. Chemical composition of the <i>Origanum majorana</i> essential oil.....	53

ARTIGO II

Tabela 1. Quadro de efeitos do tratamento de fêmeas prenhas com óleo essencial de <i>O. majorana</i> (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol sobre o ganho percentual de peso corporal (%) e peso relativo de órgãos (%).	63
Tabela 2. Quadro de índices reprodutivos de fêmeas tratadas com óleo essencial de <i>O. majorana</i> (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol do 6° ao 15° dia da gestação	64
Tabela 3. Quadro de percentual de alterações esqueléticas em fetos de fêmeas tratadas com óleo essencial de <i>O. majorana</i> (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol do 6° ao 15° dia da gestação.....	65

ARTIGO III

Tabela 1. Efeitos do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> e compostos majoritários sobre parâmetros reprodutivos das fêmeas submetidas a tratamento.....	76
Tabela 2. Efeitos do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> e compostos majoritários sobre o ganho de peso corporal (%) e peso relativo de órgãos (%) das fêmeas tratadas.....	77
Tabela 3. Efeitos do tratamento materno com óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> (33mg/kg e 100mg/kg) e composto majoritário γ -terpinene (77mg/kg) sobre parâmetros reprodutivos das progenies	80
Tabela 4. Efeitos do tratamento materno com óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> (33mg/kg e 100mg/kg) e composto majoritário γ -terpinene	

(77mg/kg) sobre comportamento sexual de machos expostos no útero e durante lactação	81
---	----

ARTIGO IV

Table 1. Chemical composition of the <i>Origanum majorana</i> essential oil.....	100
Table 2. Induction of his ⁺ revertants in <i>S. typhimurium</i> strains by <i>Origanum majorana</i> essential oil with and without metabolic activation (S9 mix) ..	101
Table 3. Replication index of cultures exposed to <i>Origanum majorana</i> essential oil	102
Table 4. Replication index of cultures exposed to <i>Origanum majorana</i> essential oil for 3 h or 21 h	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Espécie <i>Origanum majorana</i>.....	15
3.1.1 Caracterização Botânica e Química	15
3.1.2 Aplicações gerais	17
3.1.3 Estudos de eficácia terapêutica	17
3.2 Aspectos Regulatórios de Produtos Fitoterápicos	20
3.3 Ensaios de Toxicidade Reprodutiva	20
3.4 Ensaios de Genotoxicidade	23
4 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	25
ARTIGO I - <i>Origanum majorana</i> essential oil impairs fertility: reproductive toxicity assessment in male rats	27
ARTIGO II - Potencial teratogênico do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> e compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar ...	56
ARTIGO III - Efeitos da exposição de ratas Wistar ao óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> sobre parâmetros reprodutivos e comportamentais da progênie	68
ARTIGO IV - <i>Origanum majorana</i> essential oil lacks mutagenic activity in the <i>Salmonella</i> /microsome and micronucleus assays.....	84
5 DISCUSSÃO GERAL	105
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXO A.....	117

1 INTRODUÇÃO

Produtos encontrados na natureza revelam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos ou em matéria-prima vegetal utilizada diretamente na elaboração de medicamentos fitoterápicos. No caso do Brasil e muitos outros países, esse último é a base da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (WALL et al., 1996; DI STASI, 1996).

A ideia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, com indicações terapêuticas complementares (SIMÕES et al., 2000). Em medicina veterinária, pode-se esperar ainda que medicamentos fitoterápicos tenham um reduzido potencial de resíduo nos produtos e subprodutos de animais de produção.

O uso de plantas, extratos e óleos essenciais com finalidades terapêuticas é difundido mundialmente em diferentes áreas da saúde, apresentando resultados satisfatórios e demonstrando que estes podem ser utilizados no tratamento de diversas enfermidades, principalmente por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (BARATTA et al., 1998; BURT et al., 2003; DE SOUZA et al., 2005; BUSATTA, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; SANTIM, 2013; ERENLER et al., 2016).

Para validar o uso de uma planta medicinal é necessária uma investigação sistemática envolvendo vários aspectos que somados resultarão no medicamento fitoterápico. A investigação de uma planta como um novo medicamento segue as etapas: botânica, com identificação da espécie-alvo; farmacêutica, com padronização do material a ser analisado; de ensaios biológicos pré-clínicos, com avaliação farmacológica e toxicológica; e clínica, realizadas apenas após indicações seguras de que os benefícios do uso medicinal suplantam os riscos de uma possível ação tóxica (LAPA et al, 2000; LEMÔNICA, 2008).

A toxicologia pré-clínica, etapa que inclui os ensaios toxicológicos previstos nesse projeto, deve indicar o grau de confiança a ser depositado em um novo produto, em interdependência com estudos farmacológicos, observando os mesmos princípios científicos e resultados complementares. Dessa forma, o objetivo principal da etapa pré-

clínica é determinar experimentalmente o grau de segurança para os testes clínicos com fitoterápicos (LAPA et al, 2000).

A importância da avaliação toxicológica é exemplificada por algumas espécies vegetais, bem conhecidas popularmente e que apresentam efeitos tóxicos como confrei (*Symphytum officinale* L.) com reação hepatotóxica, jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) de conhecida irritação gastrointestinal, erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.) que afeta o sistema nervoso central, mamona (*Ricinus communis* L.) que chega a ser letal, entre outras (SIMÕES et al, 2000).

Especificamente os óleos essenciais de plantas medicinais necessitam ser caracterizados quanto aos padrões de toxicidade por tratarem-se de misturas complexas de constituintes químicos (CARVALHO et al., 2004). Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e seus fitoconstituintes, o desenvolvimento de produtos de origem natural com mecanismo de ação mais seletivo, com as atividades antibacteriana e antifúngica, bem estabelecidas, parecem, num futuro próximo, orientar para a associação de produtos sintéticos e naturais (SOUZA, 2010).

Nas últimas décadas, estudos tem referido interessante ação antimicrobiana de espécies de *Origanum*, de modo que *O. majorana* L. (ou *Majorana hortensis* Moench), planta aromática pertencente à família Lamiaceae e rica em óleos essenciais, tem demonstrado resultados importantes na inibição do crescimento de bactérias, fungos e síntese de metabólitos microbianos (BARATTA et al, 1998; DIFERERA et al., 2000; MARINO et al., 2001; ULTEE et al, 2001; BUSATTA, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ABDEL-MASSIH et al., 2010; SOUZA, 2010; SANTIM, 2013).

Nosso grupo tem realizado ensaios de avaliação da atividade terapêutica *in vitro* do óleo essencial de *O. majorana* e obtido resultados satisfatórios para atividade antifúngica (SANTIM, 2013). Os ensaios previstos nesse estudo pretendem avaliar possíveis efeitos toxicológicos do óleo essencial de *O. majorana*, em interdependência com os estudos farmacológicos em andamento.

Nesse sentido, tem-se como alvo a realização de testes de avaliação da toxicidade reprodutiva adaptado de normas da Environmental Protection Agency (EPA) e recomendado por OECD e FDA, que abrangem três segmentos: Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” para avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade”, com exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o

desenvolvimento pré e pós-natal de progênes expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (EPA 1996; OECD 414, 2001; OECD 443, 2001; LEMÔNICA, 2001).

Da mesma forma, a avaliação de genotoxicidade, um estudo a ser conduzido quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado de doses, preconiza a realização dos ensaios Teste de Ames ou Ensaio *Salmonella*/microsoma, utilizado para detecção de mutação gênica, e Teste de Micronúcleos, utilizado para detecção de mutação cromossômica de produtos a serem utilizados como promotores de saúde, incluindo fitoterápicos (OECD 471, 1997; SBMCTA, 2004; ANVISA, 2004; OECD 487, 2014).

Conforme citado anteriormente, a realização desses ensaios de avaliação toxicológica é fundamental para garantir que os compostos químicos encontrados na planta em estudo não exerçam atividade tóxica que inviabilize sua utilização em saúde humana e/ou animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os potenciais riscos toxicológicos da utilização do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) no que se refere à toxicidade reprodutiva e genotoxicidade contribuindo para a elucidação prévia de questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos de Omeo sobre a fertilidade de ratos e ratas Wistar, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, com machos tratados antes e durante o acasalamento e fêmeas tratadas antes e durante o acasalamento, a gestação e a lactação.

Avaliar os efeitos de Omeo sobre as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese e a possibilidade de produzir efeitos teratogênicos.

Avaliar os efeitos de Omeo sobre parâmetros reprodutivos e comportamentais de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

Avaliar o potencial mutagênico *in vitro* de Omeo sobre linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium* conforme metodologia padronizada do Ensaio de Mutagenicidade *Salmonella*/microsoma, ou Teste de Ames.

Avaliar o potencial genotóxico *in vitro* de Omeo através do Teste de Micronúcleos identificando a presença de pequenos núcleos de cromatina em fibroblasto de pulmão de hamster chinês, células V79.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécie *Origanum majorana*

3.1.1 Caracterização Botânica e Química

Origanum majorana L. (ou *Majorana hortensis* segundo a classificação de Moench) pertence à família Lamiaceae e apresenta como origem a região do Mediterrâneo e Oriente Médio (SIMÕES et al., 2000), mais especificamente Ilha de Chipre e Sul da Turquia (RODRIGUES, 2002). Atualmente, sua produção apresenta-se distribuída mundialmente (EL-ASHMAWY et al. 2007; RAMADAN et al. 2012).

Segundo Ken (1951, apud RODRIGUES, 2002), características botânicas de *O. majorana* são de uma planta perene, com uma porção subterrânea formada por raízes fibrosas. Apresenta o caule muito ramificado de coloração avermelhada, com altura entre 30 a 60cm e ramos lenhosos e frágeis. Suas folhas são ovais, inteiras, pecioladas de coloração verde acinzentada. As flores são pequenas em espigas oblongas, de cor branca a rosada.



Figura 1. Foto de *Origanum majorana* em floração. Autor: Clarissa Hollenbach, 2015.

O termo manjerona compreende várias plantas aromáticas de diferentes espécies. Popularmente também são conhecidas como manjerona-inglesa, ouregão-vulgar, flor-do-himeneu, manjerona-doce, manjerona-verdadeira, manjerona-branca (KEN, 1951, apud

RODRIGUES, 2002). Em geral, as plantas da família Lamiaceae, por serem ricas em óleos essenciais, caracterizam-se pela alta quantidade de compostos fenólicos, os quais se acreditam serem responsáveis por suas propriedades antimicrobianas (FERRARA et al., 2003).

Origanum majorana é conhecida como manjerona-doce, possui um odor forte, aromático, penetrante, quente, às vezes picante, mas muito agradável. A planta verde tem um perfume semelhante ao de uma flor (VON HERTWIG, 1986; RODRIGUES, 2002). O produto mais importante em sua composição é o óleo essencial, que representa entre 0,30 e 0,40% da planta fresca e entre 0,7 e 3,5% das folhas secas. O óleo extraído é muito aromático e de cor amarelo-esverdeada (QUER, 1988).

O principal método industrial de obtenção do óleo essencial é a destilação por arraste a vapor de água, sendo assim utilizado pela indústria como flavorizante. Para utilização na produção de bebidas alcoólicas (licor com sabor de ervas), os componentes voláteis são separados por percolação e posterior destilação com uma mistura de água-álcool. Além da extração com arraste a vapor ou com solventes orgânicos, outra técnica de extração dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor é a extração com fluido supercrítico que permite obter o óleo essencial livre dos resíduos do tecido vegetal, tais como ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, flavonas e esteróis, entre outros. Em estudos comparativos entre extratos de plantas, o método de extração parece exercer grande influência na composição do produto extraído (RODRIGUES, 2002).

Após extração, os óleos essenciais devem ser analisados para identificar e quantificar seus componentes. Para tal, são empregadas técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Na CG, a amostra injetada no cromatógrafo volatiliza, permitindo a separação e a identificação dos compostos individuais através do tempo de retenção relativo da amostra quando comparados com padrões. Na CG/EM, além da separação dos componentes, obtém-se espectros de massas de cada pico, que também podem ser comparados com espectros de massas de padrões ou com espectros constantes na literatura ou na biblioteca do equipamento (SIMÕES et al, 2000).

O óleo de *O. majorana* vem sendo estudado há muitos anos e publicações referem que sua composição varia conforme a região de origem da planta (SOLIMAN et al., 2009). A concentração pode chegar a cerca de 40% de hidrocarbonetos monoterpênicos, principalmente terpinenos. Mirceno, γ -terpinene, α -terpineno, p-cimeno, borneol, timol, carvacrol, β -cariofileno, limoneno, α -pineno, β -pineno linalol e sabineno são alguns dos

compostos encontrados no óleo essencial de *O. majorana* (BURT et al, 2003), sendo estabelecidos dois quimiotipos: um rico em terpenos γ -terpineno e terpineol-4 (GUENTER et al., 1952, apud SOLIMAN et al., 2009; RODRIGUES, 2002) e outro rico em timol e o carvacrol (FISHER et al., 1987, apud SOLIMAN et al., 2009; LAMBERT et al., 2001; MARINO et al., 2001).

O óleo essencial de *Origanum majorana* L. cultivada em duas localidades diferentes da Finlândia, em local coberto e ao ar livre, obtido por destilação a vapor e extração em n-pentano, apresentou como compostos majoritários o cis-sabineno hidratado (8 e 43%, respectivamente) e terpineol-4 (21 e 52%, respectivamente), seguidos pelos trans-sabineno hidratado α -terpineol e linalol (GUENTER, 1952, apud RODRIGUES, 2002; SOLIMAN et al., 2009).

Análise cromatográfica de óleo essencial obtido por destilação a vapor de flores e folhas de *O. majorana* cultivada ao sul da Turquia, apresentou alto teor de carvacrol (65%), caracterizando esta manjerona como do tipo fenólico. No óleo essencial de amostras de manjerona italiana também foi encontrado alto teor de fenóis (47%), sendo o timol em maior quantidade do que o carvacrol. Amostras de óleo essencial da planta coletada em duas diferentes localidades da Turquia apresentaram alto teor de óleo (6,5 e 7,7%) e um alto teor de carvacrol (78,27 e 79,46%). Estes valores estão de acordo com publicações anteriores e comprovam que a manjerona plantada na Turquia é do tipo fenólica, enquanto que as plantas cultivadas na Europa, contêm menos óleo, pouco ou nenhum composto fenólico e são ricas em cis-sabineno hidratado e terpineol-4 (RODRIGUES, 2002; FISCHER, 1987, apud SOLIMAN et al., 2009).

Dessa forma, deve ser considerado, além da origem de *O. majorana*, o método de extração do óleo essencial para caracterização botânica e química da planta.

3.1.2 Aplicações gerais

Infusões das folhas de *O. majorana* são utilizadas em distúrbios do sistema respiratório (como asma, bronquite, sinusite), do sistema nervoso central (depressão, tonturas, atividade sedativa) e do sistema gastrointestinal (pelas propriedades digestivas), além de febre do feno, dor de cabeça, dor de dente, como diurético e indutor da menstruação (EL-ASHMAWY et al., 2007; RAMADAN et al., 2012; RAAFAT et al., 2013).

Popularmente, a manjerona é citada ainda por apresentar propriedades afrodisíacas, auxiliar em recuperação de contusões, dores reumáticas, espasmos, torcicolo e ação hidratante da pele e dos cabelos (QUER, 1988; RECEITA CASEIRA, 2012; COOPAFLOA, 2012).

Na indústria de alimentos, o óleo essencial tem larga aplicação, em razão de sua grande estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e a grande variedade de compostos. Possui aplicação principal como aromatizante de bebidas e alimentos (VON HERTWIG, 1986). Sua utilização como conservante em alimentos também parece útil, por suas propriedades antimicrobianas, sendo capaz de inibir o desenvolvimento microbiano quando incorporado em biofilmes (RITA et al., 2011) ou na aplicação direta na conservação de carnes (OMARA et al., 2014).

3.1.3 Estudos de eficácia terapêutica

Alguns estudos referem interessante ação antimicrobiana de espécies de *Origanum*, de modo que *O. majorana* L. tem demonstrado resultados importantes na inibição do crescimento de bactérias, fungos e síntese de metabólitos microbianos (MARINO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Em literatura são encontrados relatos de ensaios conduzidos com óleo essencial e extratos de *O. majorana*. O óleo essencial apresentou efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre cepas de *S. aureus*, *S. coagulase negativa* e *Enterobacter spp*, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 2,5 e 10 $\mu\text{L/mL}$ para o óleo essencial de manjerona (OLIVEIRA et al., 2009). Outros extratos inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em diferentes concentrações (ABDEL-MASSIH et al., 2010).

Em estudo realizado com teste *in vitro* de difusão em disco foi encontrada CIM de 0,92mg/mL para o óleo essencial frente a cepas de *Escherichia coli*, *Aeromonas sp* e *Salmonella choleraesius*, e CIM de 0,78 mg/mL para *Staphylococcus aureus*. Outros microrganismos testados também foram suscetíveis à ação do óleo essencial de manjerona, com valores de CIM entre 0,069 e 2,3mg/mL (BUSATTA, 2006).

As propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes de alguns óleos comerciais de oito plantas, entre elas *O. majorana* foram avaliadas por Baratta et al. (1998). Este óleo apresentou a mais alta atividade antioxidante, sendo que em ensaios com gema de ovo, a atividade antioxidante da manjerona foi muito mais alta do que a do

α -tocoferol em todas as concentrações testadas. Quanto à atividade antibacteriana, os autores testaram bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo que o óleo da manjerona apresentou um dos três melhores resultados como inibidores do crescimento destes microrganismos, além da capacidade de inibição do *Aspergillus niger* (BARATTA et al., 1998).

A atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona foi testada frente ao *Penicillium digitatum*, demonstrando completa inibição, inclusive em baixas concentrações do óleo essencial ($\sim 250\mu\text{g/mL}$) e, frente a diferentes espécies de *Candida*, *Aspergillus* e dermatófitos onde se observou que a CIM de $320\mu\text{L/mL}$ foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos microrganismos, com halos de inibição variando de 12 a 40mm de diâmetro (DI FERERA et al., 2000; SOUZA, 2010). Recentemente, Mathew and Padmanabhan (2015) apresentaram resultados ainda mais interessantes, comparando a eficácia antifúngica do óleo essencial de *O. majorana* ao cetoconazol. Abdel-Massih e Abraham (2014) também relatam ações antimicrobianas do óleo essencial de *O. majorana*.

Com relação ao mecanismo de ação do óleo essencial de *O. majorana* pode ser por inibição da parede celular, contudo, outros mecanismos responsáveis pela expressiva ação antifúngica do óleo essencial da manjerona também podem estar envolvidos, por exemplo, a ação do eugenol como antifúngico deve-se ao fato deste se ligar à membrana dos microrganismos e, assim, danificá-la (SOUZA, 2010).

Outra linha de pesquisa desenvolvida com extratos vegetais de manjerona avalia a capacidade genotóxica, onde resultados apontam que os extratos alcoólico e aquoso e o óleo essencial de *O. majorana* desempenham papel importante para melhorar as funções hepáticas e renais e diminuir a genotoxicidade induzida pela toxicidade do chumbo (EL-ASHMAWY et al., 2005). Em outro estudo, os dados apresentados demonstraram que o extrato de *O. majorana* não induziu efeitos genotóxicos em células de raízes de *Vicia faba*. Além disso, este estudo sugere que o pré-tratamento com *O. majorana* tem uma forte ação inibitória contra a ação mutagênica da azida de sódio (QARI, 2008).

Pesquisadores parceiros desse grupo através de ensaios de avaliação da atividade farmacológica *in vitro* do óleo essencial de *O. majorana* obtiveram resultados satisfatórios para atividade antifúngica. A atividade *in vitro* do óleo essencial de manjerona proveniente da região sul do Rio Grande do Sul foi avaliada frente a leveduras provenientes da cavidade oral e vias urinárias de fêmeas caninas, entre elas *Candida sp*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *Cryptococcus albidus*, *T. asahii*. Os valores de

concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fúngica mínima (CFM) para o óleo essencial de manjerona variaram de 3,7 a 30 μ L/mL (SANTIM, 2013).

Outros estudos relatam potencial uso como anticâncer (AL DHAHERI et al., 2013; RAO et al., 2014), imunoestimulante, antigenotóxico e antimutagênico (AL-HARBI, 2011; RAMADAN et al., 2012; KHAN et al., 2013). Em relação à toxicidade reprodutiva, Heikal (2015) sugere que o potencial antioxidante do extrato das folhas de *O. majorana* atenuam o dano oxidativo testicular e a indução de apoptose induzida pela exposição a metomil.

Estudos indicam que o óleo essencial pode ser usado na prevenção de doenças relacionadas à idade (JUN et al., 2001; ALIZADEH et al., 2011; ROBY et al., 2013) e distúrbios no sistema nervoso central (EL-ASHMAWY et al., 2007; REZAIE et al., 2011), possivelmente por causa de seus efeitos antioxidantes (ERENLER et al., 2016).

3.2 Aspectos Regulatórios de Produtos Fitoterápicos

A legislação brasileira e internacional exige que produtos industrializados incluindo fitoterápicos e fármacos em geral sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo somente após a avaliação rigorosa de suas características que inclui testes para determinar suas atividades toxicológicas e ainda seu potencial mutagênico (SILVA et al., 2003; ANVISA, 2004).

Existem diferenças entre as exigências nos diferentes países ou blocos econômicos, mas em geral, os principais protocolos a serem observados são os emitidos pela Europa através da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), pelos Estados Unidos da América através do Food and Drug Administration (FDA), ou ainda, Canadá, Ásia e Japão (SILVA et al., 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador para registro de medicamentos fitoterápicos para uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para fitoterápicos incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e ensaios de genotoxicidade e toxicidade tópica. Os ensaios de toxicidade reprodutiva estão previstos quando o medicamento for indicado para administração de longa duração ou para gestantes (ANVISA, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo registro de medicamentos para uso veterinário, apresenta as mesmas exigências quanto à avaliação toxicológica previsto em suas normativas Decreto 5.053 de 2004 e Portaria 54 de 1999.

3.3 Ensaios de Toxicidade Reprodutiva

A avaliação da Toxicologia Reprodutiva compreende um estudo complexo que se deve em parte à própria natureza e duração do processo reprodutivo. Entende-se por reprodução o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Portanto, o ciclo reprodutivo não consiste apenas na concepção, gravidez e nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos pais, seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto se torna capaz de procriar (MELLO, 2007).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases, impedindo ou inibindo temporariamente a reprodução, causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta e assim por diante. Desta forma os estudos de toxicidade reprodutiva têm que ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até sua maturação sexual (LEMÔNICA, 2008).

Um exemplo clássico e de impacto sobre o sistema reprodutivo foi evidenciado pelo caso da Talidomida na década de 60. Esse acontecimento levou a um aumento do conhecimento da toxicidade de compostos químicos e medicamentos sobre o sistema reprodutivo e também aumento no rigor quanto aos estudos de segurança e eficácia de novos medicamentos, incluindo os estudos de toxicidade reprodutiva (MELLO, 2007).

Assim, os estudos de toxicidade reprodutiva adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA), recomendados por OECD e FDA, e realizados durante a execução desse projeto, abrangem três segmentos: Toxicidade crônica e reprodutiva, onde é realizada avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade, com exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Toxicidade peri e pós-natal,

onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento peri e pós-natal de progênes expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

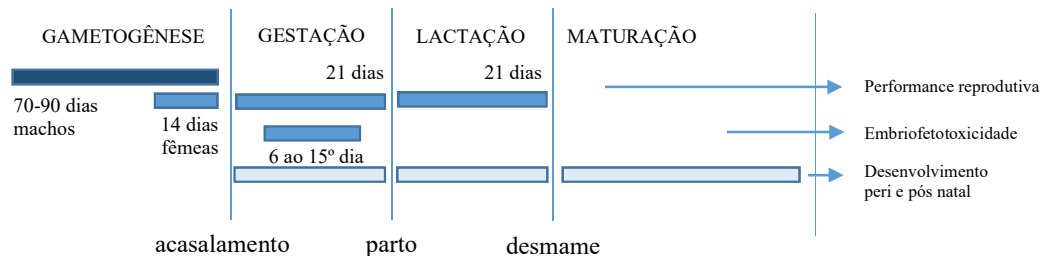


Figura 2. Períodos de tratamento de progenitores em teste de toxicidade reprodutiva em ratos. Adaptado de Lemônica, 2008.

A influência de fatores ambientais na fertilidade masculina vem sendo cada vez mais discutida. Apesar de diferenças regionais e étnicas da população humana e falta de padronização de técnicas de contagem de espermatozoides, diversos estudos demonstraram que, ao longo dos anos, houve redução da fertilidade masculina humana. Tal redução se deve provavelmente à modificação do estilo de vida, fatores ocupacionais e exposição a substâncias e a agentes físicos (OSHIO et al., 2009).

Dentre as substâncias potencialmente capazes de causar infertilidade incluem-se novos compostos químicos. Além da perda de fertilidade podem ocasionar alterações genéticas nas células germinativas com consequentes manifestações neoplásicas e malformações, além de infertilidade nos descendentes (OSHIO et al., 2009). No entanto, alterações nas funções reprodutivas de machos e fêmeas podem ser reversíveis. Uma restauração gradual normal pode ser antecipada após o término da exposição a um agente (AMMAN, 1982).

Quanto ao potencial embriofetotóxico de um composto, tem-se a ocorrência de anomalias congênitas caracterizadas por alterações estruturais e/ou funcionais ocorridas antes do nascimento, devido a fatores genéticos, ambientais ou desconhecidos. No grupo dos fatores ambientais está incluída a exposição a fármacos. Um fármaco pode ser caracterizado como agente teratogênico quando uma vez administrado durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (LEMÔNICA, 2008).

Os teratógenos agem através de um número relativamente limitado de mecanismos patogênicos, produzindo morte celular, alterações no crescimento dos tecidos (hiperplasia, hipoplasia ou crescimento assincrônico), interferência na diferenciação celular ou em outros processos morfogenéticos. Esses mecanismos afetam eventos básicos do organismo em desenvolvimento e geralmente suas consequências atingirão mais de um tecido ou órgão. Assim, as manifestações da ação de um agente teratogênico podem ser agrupadas em quatro classes principais: morte do conceito ou infertilidade; malformações; retardo de crescimento intra-uterino; e deficiências funcionais (SCHULLER-FACCINI, 2003).

Nas fases peri e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação. Além disso, indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK et al, 1989).

3.4 Ensaios de genotoxicidade

A avaliação do potencial genotóxico ou mutagênico de um agente químico é realizada utilizando estudos que abrangem organismos procarióticos e eucarióticos, com testes *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al, 2003).

Conforme legislação da ANVISA, a avaliação de genotoxicidade é um estudo especial a ser conduzido quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do fitoterápico. Nesses casos, faz-se necessária avaliação *in vitro* da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou do dano a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo; e avaliação *in vivo* do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (ANVISA, 2004).

A Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) propõe harmonização dos testes de mutagenicidade utilizados para detecção de mutação gênica (Teste de Ames) e de mutação cromossômica (Teste de Micronúcleos) de produtos que possam causar danos à saúde, sejam químicos, fitoterápicos, amostras ambientais ou outro, realizados em laboratórios nacionais, adaptado dos guias da OECD (SBMCTA, 2004).

A metodologia mais utilizada para avaliação da atividade mutagênica *in vitro* foi descrita por Ames em 1979. O Ensaio *Salmonella*/microsoma, também conhecido como Teste de Ames consiste em um ensaio de avaliação de mutação reversa em bactérias (MARON et al., 1983; MORTELMANS et al., 2000; OECD 471, 1997).

O ensaio utiliza linhagens-teste de bactérias mutantes de *Salmonella typhimurium* incapazes de crescerem na ausência de histidina. Na presença de compostos mutagênicos essas bactérias sofrem nova mutação originando reversão da mutação original proporcionando a síntese de histidina e permitindo seu crescimento. A inibição da mutagenicidade é calculada pelo número de bactérias que foram revertidas em relação ao controle, levando-se em consideração as bactérias revertidas espontaneamente (MACHADO et al, 2009).

O teste é realizado em presença e ausência de um sistema de metabolização endógeno, o que permite determinar tanto substâncias com ação direta sobre o material genético da célula como monitorar a atividade positiva ou negativa dos metabólitos gerados pela biotransformação, imitando o que ocorreria no fígado de mamíferos (SILVA et al., 2003).

Enquanto o Ensaio *Salmonella*/microsoma indica mutagenicidade gênica, o Teste de Micronúcleos permite a detecção de mutagênese cromossômica de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito para a avaliação do potencial mutagênico para o registro de novos produtos (SILVA et al, 2003; SBMCTA, 2004; RIBEIRO, 2003; OECD 487, 2014).

Os micronúcleos são pequenos núcleos representando o material genético perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético que pode ter sido causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso mitótico, ou que possam induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (SBMCTA, 2004; OECD 487, 2014).

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

O presente trabalho apresenta os métodos investigativos utilizados e os resultados obtidos na forma de artigos. Foram elaborados quatro artigos conforme descrito a seguir.

ARTIGO I - *Origanum majorana* essential oil impairs fertility: reproductive toxicity assessment in male rats

ARTIGO II - Potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar

ARTIGO III - Efeitos da exposição de ratas Wistar ao óleo essencial de *Origanum majorana* sobre parâmetros reprodutivos e comportamentais da progênie

ARTIGO IV - *Origanum majorana* essential oil lacks mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome and micronucleus assays

ARTIGO I***Origanum majorana* essential oil impairs fertility: reproductive toxicity assessment
in male rats**

Artigo a ser submetido à Reproductive Toxicology

***Origanum majorana* essential oil impairs fertility: reproductive toxicity
assessment in male rats**

Andrea dos Santos Dantas^{a,b,*}, Luciana Dalazen dos Santos^{a,b}, Lismara do Castro Nascimento^c, Luiz Carlos Klein-Júnior^d, Fernanda Bastos de Mello^b, David Driemeier^{a,c}, João Roberto Braga de Mello^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica - Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Andrea dos Santos Dantas; Department of Pharmacology, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; asdmedina@gmail.com.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the effects on fertility of adult male Wistar rats chronically treated with different concentrations of *O. majorana* essential oil (Omeo) and its major compounds, determined by chromatographic analysis. The most abundant compounds identified by GC-MS were γ -terpinene (25.73%), α -terpinene (17.35%), terpinen-4-ol (17.24%) and sabinene (10.8%). To identify alterations in reproductive system of males were evaluated organs relative weight, histology, sperm number and morphology of spermatozoa. Reproductive index, body weight gain, intake water and food, and toxicity signs were evaluated, too. The exposure induced dose-dependent way reduction in reproductive index, reduction in sperm number, reduction in daily sperm production, increase in sperm defects to treated groups with Omeo and Terpinen-4-ol, and reduction in testis and epididymis relative weight to 300mg/kg Omeo. The results demonstrate that continuous treatment with Omeo and major compounds affect male fertility when administrated orally for 91 days.

Key words: Marjoram; reproductive toxicity; Terpinen-4-ol; γ -terpinene; *in vivo* toxicity

1. Introduction

Origanum majorana L. or *Majorana hortensis* Moench is an aromatic plant rich in essential oils native from Mediterranean region but commercially grown in the southern Europe and worldwide throughout the year. It is popularly known as sweet marjoram and has been used in the form of herbal infusions in folk medicine for asthma, cold, coughs, cramps, depression, dizziness, gastrointestinal disorders, hay fever, headache, toothache and sinus congestions, and as a diuretic and to promote menstruation (El-Ashmawy et al., 2007; Ramadan et al., 2012).

Important activities of *O. majorana* essential oil include antibacterial, antifungal and antioxidant actions and increase in liver and kidney functions (Busatta et al., 2008; Prakash et al., 2012; Santin, 2013). Studies suggest that oil can be used in the prevention of ageing-related diseases (Jun et al., 2001; Alizadeh et al., 2011; Roby et al., 2013) and central nervous system disorders (El-Ashmawy et al., 2007; Rezaie et al., 2011), because of its antioxidant effects.

Previous studies have reported the potential use of *O. majorana* ethanolic extract as anticancer agent (Al Dhaheri et al., 2013; Rao et al., 2014), whereas the tea extract has been shown to have immunostimulant, antigenotoxic and antimutagenic properties (Al-Harbi, 2011; Ramadan et al., 2012; Khan et al., 2013). *O. majorana* crude extract, dichloro-methane, ethyl acetate and aqueous fractions showed antibacterial and antifungal actions (Abdel-Massih and Abraham, 2014).

Preliminary studies from Heikal (2015) suggested that co-administration of 150mg/kg and 300mg/kg of *O. majorana* leaves extract attenuated the testicular

oxidative damage and apoptosis-related genes induced by methomyl exposure, which may be attributed to its antioxidant potential. In another study, lower dose (0.16mL/kg) *O. majorana* essential oil was able to prevent the ethanol-induced decline in sperm quality, testosterone levels and in the weight of reproductive organs in male rats (El-Ashmawy et al., 2007).

Plants are useful in pharmaceutical research as model to synthesis or drugs production. These, promotes increase in therapeutic options and are indicated in complementary therapy or treatment. In Animal Science, herbal medicines could present reduced or no concentration of toxic residues in products or sub products in animal production. This is very interesting when we think about new treatments to animal diseases. However, the safe use of medicinal plants should be carefully evaluated.

The acute oral LD₅₀ value in rats was reported as 2.24g/kg of *O. majorana* essential oil and acute dermal LD₅₀ value in rabbits exceeded 5g/kg. Besides that, when applied full strength to intact or abraded rabbit skin for 24h under occlusion was not irritating (at 6% in petrolatum) (Opdyke, 1976; Tisserand and Young, 2014).

Literature review demonstrate that the Terpinen-4-ol and γ -terpinene are present in *O. majorana* essential oil in variable concentrations (Rodrigues et al., 2002; Vági et al., 2005; Busatta et al., 2008; Ramos et al., 2011; Tisserand and Young, 2014). Terpinen-4-ol has presented toxic effect when tested alone in *in vitro* evaluation on *Salmonella*/microsome assay (concentrations above 1500 μ L/mL) (Fletcher et al., 2005; Hollenbach et al., 2015). The acute oral LD₅₀ in rats was reported as 3.65g/kg (2.71–4.59g/kg) of γ -terpinene and the acute dermal LD₅₀ in rabbits exceeded 5g/kg (Moreno, 1973). γ -terpinene applied full

strength to intact or abraded rabbit skin for 24h under occlusion was moderately irritating (Kligman, 1973).

Although there are investigations about medicinal properties, there is no information about effects on reproduction. The present study aimed to investigate the effects on fertility of adult male Wistar rats chronically treated with different concentrations of *O. majorana* essential oil and its major compounds, determined by chromatographic analysis.

2. Material and Methods

2.1 Sample and major compounds

O. majorana dried leaves acquired from Luar Sul Company (Santa Cruz do Sul, RS, Brazil) with a Certificate of Quality and free of macroscopic contaminants were used. The *O. majorana* essential oil (Omeo) was obtained by steam distillation using a modified Clevenger device. The major compounds were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, USA).

2.2 Chemical analysis

The GC-MS was carried out on a Shimadzu mass spectrometer (GC/MS-QP5000) connected with cylindrical quadrupole and operated at 70 eV ionization energy. An apolar Durabond-DB5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) was used. To confirm the identity of the compounds, a polar column was also used (LM-120). The temperature was programmed from 60 to 300 °C at 3 °C/min and the

injector and detector temperatures were set at 220 °C and 250 °C, respectively. GC-FID was used for quantification (Limberger et al., 2004; Simões-Pires et al., 2005). The relative composition of the oil was obtained by electronic integration and the identification of the compounds was based on comparison to retention indices, determined relatively to the retention times of an homologous series of n-alkanes, and mass spectra of commercial database (NIST) and literature (Adams, 2007).

2.3 *Animals*

The study was performed with 240 sexually mature Wistar rats (n = 60 males, 90 days old, 350-400g; and 180 females, 70 days old, 250-300g) supplied by the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animal (CREAL, Federal University of the Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil). They were kept in the animal house of the Department of Pharmacology in individual polypropylene cages (40x33x16.5cm) with sawdust-covered floors in a controlled environment with temperature at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50%UR ± 5 relative humidity and 12h light/dark cycle (lights on 8 am). The animals received a standard pellet diet Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo, PR, Brazil) and tap water *ad libitum* throughout the experiment. The individualization is required to control the intake of water and food. The rats were adapted to these conditions for 7 days before starting the experiment.

All breeding phases and experiments were performed in accordance with the rules and ethical principles of the Ethics and Animal Experimentation Committee (CEUA, UFRGS; Protocol n. 23613/2013). The number of animals

employed follows the reproductive toxicity protocols approved by regulatory agencies FDA, OECD and ANVISA (OECD 443, 2011).

2.4 *Experimental Protocol*

2.4.1 Selection of doses

It was employed a therapeutic dose of Omeo (30 μ L/mL) from the values defined on Minimum Inhibitory Concentration (MIC) obtained in *in vitro* tests against *Candida* isolates (Santin, 2013) and were chosen other two smaller doses spaced geometrically. Furthermore, the major compounds were evaluated at concentrations found in the initial dose quantified in gas chromatographic analysis.

2.4.2 Treatment

The animals were randomly divided into 6 groups of 10 males and 30 females each:

- Group I: receive 33mg/kg Omeo
- Group II: receive 100mg/kg Omeo
- Group III: receive 300mg/kg Omeo
- Group IV: receive 77mg/kg γ -terpinene
- Group V: receive 52mg/kg Terpinen-4-ol
- Group VI: negative control group, receive vehicle 3g% tween 80

Doses it was given by gavage (10ml/kg body weight) to male rats continuously for 91 days prior to and during the mating period, as well as to female (3 per male) continuously for 14 days before mating and during all mating period.

2.4.3 Mating procedure

After 70 days of treatment to male rats and 14 days to female, three virgin females were placed inside the cage of one male for 2h each day at the end of dark cycle. Vaginal smears were collected daily. Day zero of gestation was considered when sperm or plug vaginal presence was observed. Pregnant females were separated and non-pregnant followed in mating for up to 21 days.

2.4.4 Collection of blood and organs

Twenty-four hours after last drug administration, male rats were anesthetized with 10mg/kg Xilazina 2% and 50mg/kg Thiopental sodic intraperitoneally. When reached the state of anesthesia the animals were submitted to celiotomy.

Blood was collected from caudal vena cava in a non-heparinized tube and serum removed by centrifugation for 15 minutes at 2500rpm and stored at -20°C until testosterone level analysis. The samples were analyzed in triplicate using Enzyme immunoassay for the in-vitro-diagnostic quantitative determination of testosterone in serum and plasma (ELISA) from IBL International GMBH (Hamburg, Germany).

After blood collection, euthanasia was performed with overdose of Thiopental sodic administered intravenously. Testis, epididymis, seminal vesicles (full of secretion) and prostate glands, kidneys, heart, spleen and liver were dissected out, grossly examined and weighed. The index weight of the organs was calculated by $\text{organ weight/body weight} \times 100$. Testis and epididymis were separated immediately for procedure of spermatoc parameters evaluation.

Three animals per group had its right testis and epididymis fixed in 10% formalin as all the others organs were fixed in buffered 10% formalin, processed for light microscopy, and sections were stained with hematoxylin/eosin. The Sector of Veterinary Pathology (SVP), Department of Veterinary Clinical Pathology (Federal University of the Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil) conducted the histopathological evaluation.

2.5 Spermatic parameters evaluation

The spermatic parameters were evaluated as Robb et al. (1978) and Amann (1982), with minor alterations. After removal of the tunica albuginea, each testis was minced and homogenized in 10mL of 0.9% NaCl containing 0.5% Triton X-100 at 600rpm in a Fisaton® 720 tissuemizer for 1 min. 100µL of this mash was diluted with 900µL of 0.9% NaCl solution. Similarly, the epididymis tail was cut into small pieces, minced and homogenized. The number of homogenization-resistant spermatids of each testis and spermatozoa of each epididymis tail was counted with a hemocytometer (Neubauer chamber) in light microscope with x400 magnification.

To determine the total number of spermatids and spermatozoa values are divided by the area (8mm², corresponding to eight large peripheral squares) versus profundity of chamber (0.1mm). The result is multiplied by 10⁶, which corresponds to dilution applied. The number of spermatids per animal (right plus left testis) and/or per grams of testis was divided by 6.1 days to convert the value to daily sperm production.

To assess the percentage of morphologically abnormal sperm the vas deferens were rinsed with 1.0mL 0.9% NaCl and a sperm suspension was obtained. An aliquot of sperm suspension was carefully stained with 2% eosin to prepare a smear on the slide. Two hundred sperm per animal were analyzed microscopically (at x400 magnification). Morphologically normal and abnormal sperm were recorded according to the presence or absence of defects found in the head or tail of the spermatozoa, classified according to Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document (IRDG, 2000).

2.6 Fertility evaluation

Reproductive index were calculated to assessment the fertility of treated males. The mating index it was calculated by proportion of females with plug vaginal or positive smears/number of mated females and the pregnancy index is the ratio of pregnant to sperm-positive females.

2.7 General toxicity

Animal body weight and intake of water and feed were measured daily to assess onset of systemic signs of toxicity as progressive weight loss and reduction in water and food intake. Amounts noted at day zero was considered as 100%, for each period (prior to and the mating period). The differences observed during the experiment with regard to this parameter were expressed as relative weight gain. Toxicity signs observed during treatment also include lacrimation, piloerection, unusual respiratory pattern, tremors and death.

2.8 Statistical analysis

Parametric data, expressed as mean \pm standard error of the mean, were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test when appropriate. The nonparametric data, expressed as proportion or percentage, were analyzed by the Chi-square test. The significance level was 95% or $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Reproductive male results

As Figure 1 shows, results to mating index and to pregnancy index are significantly different between control and treated groups. Group 300mg/kg Omeo and 52mg/kg Terpinen-4-ol presented no pregnancy.

The percentage of abnormal sperm increased significantly in treated males, except 77mg/kg γ -terpinene group. The spermatid number and daily sperm productions decreased significantly in 100mg/kg Omeo and 52mg/kg Terpinen-4-ol. Highlighting that the group 300mg/kg Omeo presented no spermatozoa or spermatids in the samples evaluated. Testosterone level presented normal concentrations and there were no differences between groups (Table 1).

3.2 Histological analysis

Testis and epididymis of the 300mg/kg Omeo group present statistically significant differences in relative organ weight in comparison with negative control

group (Table 2). Histology of the testis showed the presence of mild to severe degeneration and atrophy testicular dose-related in males treated with *O. majorana* essential oil and major compounds (Figure 2). The epididymis of males treated with 100mg/kg and 300mg/kg Omeo and 77mg/kg γ -terpinene showed few spermatozoa or azoospermia (Figure 3).

Treatments 33mg/kg Omeo, 300mg/kg Omeo and 77mg/kg γ -terpinene results in differences in absolute and/or relative weights of livers. Prostate, seminal vesicle, kidneys, spleens and hearts did not show statistically significant differences (Table 2). There were no histopathologic alterations observed in all other organs.

3.3 General toxicology

The administration of different doses of Omeo and major compounds for 91 days did not induce death or systemic toxicity. There were no statistically significant differences in water and food intake.

The 100mg/kg and 300mg/kg Omeo groups presented lower body weight gain, and the 77mg/kg γ -terpinene group showed an increase in body weight gain in comparison with negative control group prior to mating period. There were no significant differences in body weight gain during the mating period (Table 2).

3.4 Essential oil characterization

Fifteen compounds were identified in the Omeo but the most abundant compounds were γ -terpinene (25.73%), α -terpinene (17.35%), terpinen-4-ol (17.24%) and sabinene (10.8%), as can see in Table 3.

4. Discussion

Different substances have adverse effects on the male reproductive and can interact in an additive, synergistic or antagonistic system. Among these substances are heavy metals, antibiotics, solvents or environmental chemicals, as food additives, pesticides or plasticisers (Reis et al., 2015). To identify alterations in reproductive system of males the most important results to evaluate are the testis relative weight, testis histology, sperm number and morphology. Analysis of hormone concentrations should be included in studies notwithstanding the least sensitive approach (Amann, 1982).

The present study was designed to assess the reproductive toxicology potential of the *Origanum majorana* essential oil (Omeo) and major compounds γ -terpinene and Terpinen-4-ol in male rats.

Our results showed that testosterone level is normal to all groups, but there were significant differences in testis and epididymis relative weight to 300mg/kg Omeo group, associated with absence of spermatozoa and spermatids observed in sperm and histological analysis. Approximately 50% of the animals of this group were able to mate and promote ejaculation but all failed to fertilize females. Similarly, the Terpinen-4-ol group presented sexual behavior; however, the reduced sperm number and the high percentage of defective spermatozoa did not allow fertilization.

Clearly, the males treated with Omeo was affected in reproductive parameters in a dose-dependent way. Reproductive index were affected in 33mg/kg and 100mg/kg Omeo, where was some capacity of fertilization even with significant alterations in sperm parameters. The alterations of the γ -terpinene

group compared to the control was slight reduction in sperm number, but reproductive index with no alterations.

Sperm structure could play a substantial role in both fertilization and pregnancy outcome (Chenoweth, 2005). The fact of males were able to mate but not to fertilize is justified by the disorganization of the sexual organs and lack of reproductive cells. This sexual behavior is possible because the normal level of testosterone and no change in other sex organs. One of three mechanisms usually causes changes in sperm morphology: physiological, genetic or cytotoxic (Stedile et al., 2013). Studies provide positive results about *O. majorana* action as antigenotoxic and antioxidant agent (Ramadan et al., 2012; Khan et al., 2013), suggesting that the reproductive effects observed are related to a physiological action or cell-specific action.

In the present study, the male toxicity characterized by reduced sperm counts in epididymis tail, decreased daily sperm production and increased abnormal cells might have resulted from chemical interference of the Omeo and major compounds with the normal functioning of important reproductive components. It is possible that Omeo and Terpinen-4-ol induces cytotoxicity in Sertoli cells (Figure 4). These cells are primary supporting cells for spermatogenesis and contribute to the construction of the blood–testis barrier (Buzzard et al., 2002). Thus, damage to Sertoli cells may lead to impairment of male reproduction (Gong et al., 2006).

Another possibility is interaction with the pituitary gland, which is responsible for secreting follicle-stimulating hormone (FSH) that acts directly on the testis in Sertoli cells stimulating spermatogenesis. Alterations in this gland or to this

hormone could interfere with the male reproductive system affecting the production of male gametes (Dallegrave et al., 2007; Hollenbach et al., 2015).

The main non-invasive indicators of general toxicity are body weight changes, food intake and clinical signs of toxicity (OECD 443, 2011; Hollenbach et al., 2015; Stedile et al., 2013), which provide an indication of animals health status. Our results showed that there were no death and no differences in water and food intake. The groups 100mg/kg and 300mg/kg Omeo presented lower body weight gain and γ -terpinene presented increase in body weight gain; however, they show organs without histopathological alteration that indicate no systemic toxicity.

As can be seen in the results of chromatographic analysis, the chemical profile identified is in accordance with what is reported in the literature about Omeo, with some quantitative variations (Rodrigues et al., 2002; Vági et al., 2005; Busatta et al., 2008; Alizadeh et al., 2011; Jelali et al., 2011; Ramos et al., 2011; Tisserand and Young, 2014). Our results presents γ -terpinene and Terpinen-4-ol among the major compounds, which were used during the experiment in a concentration equal to that found in dose 300mg/kg of Omeo.

Interesting to note that the results presented separately for major compounds were not always equal to 300mg/kg Omeo, demonstrating that the interaction between the different essential oil compounds was also responsible for the observed changes. Therefore, the studies of natural products need to ensure the chemical composition of the sample under study.

5. Conclusion

The results demonstrate that continuous treatment with *Origanum majorana* essential oil and major compounds affect male fertility when administrated orally for 91 days.

The exposure induced dose-dependent way reduction in reproductive index (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg Omeo and Terpinen-4-ol), in sperm number (100mg/kg, 300mg/kg Omeo, γ -terpinene and Terpinen-4-ol), and in daily sperm production (100mg/kg, 300mg/kg Omeo and Terpinen-4-ol). There were increase in sperm defects (33mg/kg, 100mg/kg and Terpinen-4-ol), and reduction in testis and epididymis relative weight to 300mg/kg Omeo.

Considering the results, the damage observed in the groups treated with *Origanum majorana* essential oil is related to combination of the components and not just to the major compounds isolated.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest involved in this study.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (João Roberto Braga de Mello, Phd) and we are grateful to contributions from Faculty of Pharmacy, UFRGS (Amélia T. Henriques, Phd) and Axis Analysis (Fabrício Torres, DMV, MSc).

References

1. Abdel-Massih, RM, Abraham A, 2014. Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-

- staphylococcal activity. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 5, 819-828.
2. Adams, RP, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatograph/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing, Carol Stream.
 3. Al Dhaheri, Y, Attoub, S, Arafat, K, AbuQamar, S, Viallet, J, 2013. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of *Origanum majorana* on highly metastatic human breast cancer cells: Inhibition of NFkB signaling and reduction of nitric oxide production. PLoS ONE. 8, e68808.
 4. Al-Harbi, NO, 2011. Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. Journal of Medicinal Plants Research. 5(23), 5479-5485.
 5. Alizadeh, A, Khosh-khui, M, Javidnia, K, Firuzi, OR, Jokar, SM, 2011. Chemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. Advances in Environmental Biology. 5, 2326-2331.
 6. Amann, RP, 1982. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. Fundamental and Applied Toxicology. 2, 13-25.
 7. Busatta, C, Vidal, RS, Popiolski, AS, Mossi, AJ, Dariva, C, Rodrigues, MRA, Corazza, FC, Corazza, ML, Vladimir Oliveira J, Cansian, RL, 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology. 25, 207-211.
 8. Buzzard, JJ, Wreford, NG, Morrison, JR, 2002. Marked extension of proliferation of rat Sertoli cells in culture using recombinant human FSH. Reproduction. 124, 633-641.

9. Chenoweth, PJ, 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 64, 457-468.
10. Dallegrave, E, Mantese, FD, Oliveira, RT, Andrade, AJM, Dalsenter, PR, Langeloh, A, 2007. Pre- and postnatal toxicity of the comercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Archives of Toxicology*. 81, 665-673.
11. El-Ashmawy, IM, Saleh, A, Salama, OM, 2007. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101, 320-327.
12. Fletcher, JP, Cassela JP, Hughes, D, Cassela, S, 2005. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. *International Journal of Aromatherapy*. 15, 81-86.
13. Gong, Y, Han, XD, 2006. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*. 22, 623-630.
14. Heikal, TM, 2015. Antioxidant potentials of *Origanum majorana* leaves extract against reproductive toxicity and apoptosis-related gene expression resulted from methomyl exposure in male rat. *Planta Medica*. 81, PM_13. DOI: 10.1055/s-0035-1565390.
15. Hollenbach, CB, Bing, RS, Stedile, R, Mello, FPS, Schuch, TL, Rodrigues, MRA, Mello, FB, Mello, JRB, 2015. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43:1295-1301.
16. IRDG, 2000. Industrial Reproductive Toxicology Discussion Group. Rat Sperm Morphological Assessment. In: <http://www.irdg.co.uk/sperm_morphology.pdf>. Access: January 15, 2016.

17. Jelali, N, Dhifi, W, Chahed, T, Marzouk, B, 2011. Salinity effects on growth, essential oil yield and composition and phenolic compounds content of marjoram leaves. *Journal of Food Biochemistry*. 35, 1443–1450.
18. Jun, WJ, Han, BK, Yu, KW, Kim, MS, Chang, IS, Kim, HY, 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*. 75, 439-444.
19. Khan, JA, Jalal, JA, Ioannides, C, Moselhy, SS, 2013. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. *Toxicology and Industrial Health*. 29, 142-148.
20. Kligman, AM. γ -terpinene. Report to Research Institute for Fragrance Materials, October 31, 1973. In: 1976. *Food and Cosmetics Toxicology*. 14, 875.
21. Limberger, RP, Sobral, M, Henriques, AT, Menut, C, Bessière, J-M, 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*. 27, 916-919.
22. Moreno, OM. γ -terpinene. Report to Research Institute for Fragrance Materials, July 25, 1973. In: 1976. *Food and Cosmetics Toxicology*. 14, 875.
23. OECD 443, 2011. Test No. 443: Extended One-generation Reproductive Toxicity Study, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: 10.1787/9789264122550-en.
24. Opdyke, DLJ, 1976. Marjoram oil sweet. *Food and Cosmetics Toxicology*. 14 (5), 469.
25. Prakash, B, Singh, P, Kedia, A, Dubey, NK, 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin,

- antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. Food Research International. 49(1), 201-208.
26. Ramadan, G, El-Beih, NM, Zahra, MM, 2012. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. British Journal of Nutrition. 108, 1059-1068.
 27. Ramos, S, Rojas, LB, Lucena, ME, Meccia, G, Usubillaga, A, 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum majorana* L. essential oil from the Venezuelan Andes. Journal of Essential Oil Research. 23, 45-49.
 28. Rao, S, Timsina, B, Nadumane, VK, 2014. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum majorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 4, 389-394.
 29. Reis, MMS, Moreira, AC, Sousa, M, Mathur, PP, Oliveira, PF, Alves, MG, 2015. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. Journal of Applied Toxicology. wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/jat.3122.
 30. Rezaie, A, Mousavi, G, Nazeri, M, Jafari, B, Ebadi, A, Ahmadeh, C, Habibi, E, 2011. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. Research Journal of Biological Sciences. 6, 611-614.
 31. Robb, GW, Amann, RP, Killian, GJ, 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. Journal of Reproduction and Fertility. 54, 103-107.
 32. Roby, MHH, Sarhana, MA, Selima, KAH, Khalela, KI, 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus*

- vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products. 43, 827-831.
33. Rodrigues, MRA, Caramão, EB, Arce, L, Ríos, A, Valcárcel, M, 2002. Determination of monoterpene hydrocarbons and alcohols in *Majorana hortensis* Moench by micellar electrokinetic capillary chromatographic. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 4215-4220.
 34. Santim, R, 2013. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da Família Lamiaceae. Tese de doutorado. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
 35. Simões-Pires, CA, Debenedetti, S, Spegazzini, E, Mentz, LA, Matzenbacher, NI, Limberger, RP, Henriques, AT, 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. Plant Systematics and Evolution. 253, 23-32.
 36. Stedile, R, Hollenbach, FB, Mello, FB, Mello, FPS, Bing, R, Rosa, PP, Silva, LM, Vivian, IF, Mello, JRB, 2013. Effects of the association of beta-glucan and itraconazole on fertility of male Wistar rats. Acta Scientiae Veterinariae. 41:1167-1174.
 37. Tisserand, R, Young, R. Essential oil safety. A guide for health care professionals. 2ed. London, UK: Churchill Livingstone Elsevier, 2014. ISBN 978-0-443-06241-4.
 38. Vági, E, Simándi, B, Suhajda, Á, Héthelyi, É, 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International. 38, 51-57.

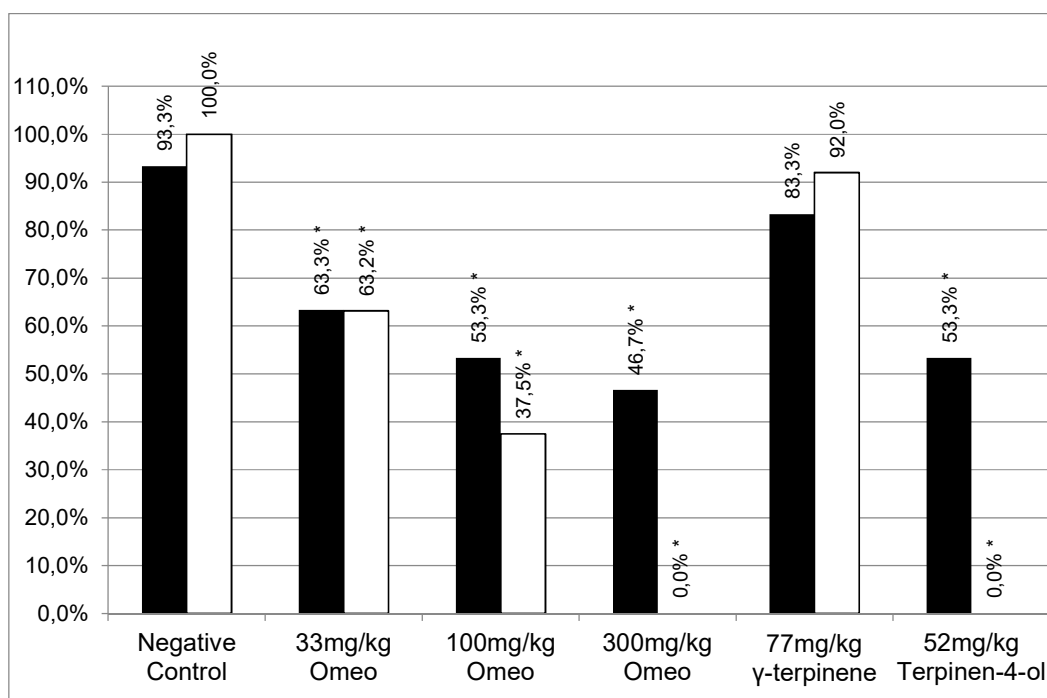


Figure 1. Mating index (black columns) and Pregnancy index (white columns).
 * Significantly different from de negative control group ($p < 0.05$; Chi-square).

Table 1. Effects of treatment with *O. majorana* essential oil (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) and major compounds (77mg/kg γ -terpinene and 52mg/kg Terpinen-4-ol) on sperm number in the epididymis tail, daily sperm production per organ and per male, sperm transit rate, sperm morphology and testosterone level

	Negative Control	<i>O. majorana</i> essential oil			γ -terpinene	Terpinen-4-ol
		33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg	77mg/kg	52mg/kg
Sperm number (x10 ⁶ /epididymis)	803.3 \pm 23.3	814.4 \pm 32.7	373.8 \pm 21.1*	NO*	576.9 \pm 10.8*	272.7 \pm 7.7*
Daily sperm production (x10 ⁶ /g testis)	38.0 \pm 1.2	49.9 \pm 2.3	16.8 \pm 0.9*	NO*	38.7 \pm 1.5	11.1 \pm 0.9*
Daily sperm production (x10 ⁶ /male)	134.2 \pm 3.1	173.1 \pm 4.2	65.2 \pm 3.3*	NO*	147.1 \pm 4.1	36.6 \pm 3.5*
Abnormal sperm (%)	4.1 \pm 0.01	45.1 \pm 0.18*	63.3 \pm 0.09*	NO*	2.7 \pm 0.01	90.1 \pm 0.07*
Defects in the head (%)	51.5	3.6	61.4	-	34.6	62.7
Defects in the tail (%)	48.5	96.4	38.6	-	69.8	37.3
Testosterone level (ng/mL)	5.3 \pm 2.5	5.7 \pm 2.9	4.24 \pm 1.8	4.58 \pm 2.4	5.25 \pm 2.3	4.25 \pm 2.4

^a NO: No spermatozoa or spermatid were founded in slides. Data are expressed as Mean \pm SEM.

*Significantly different from de negative control group ($p < 0.05$; ANOVA).

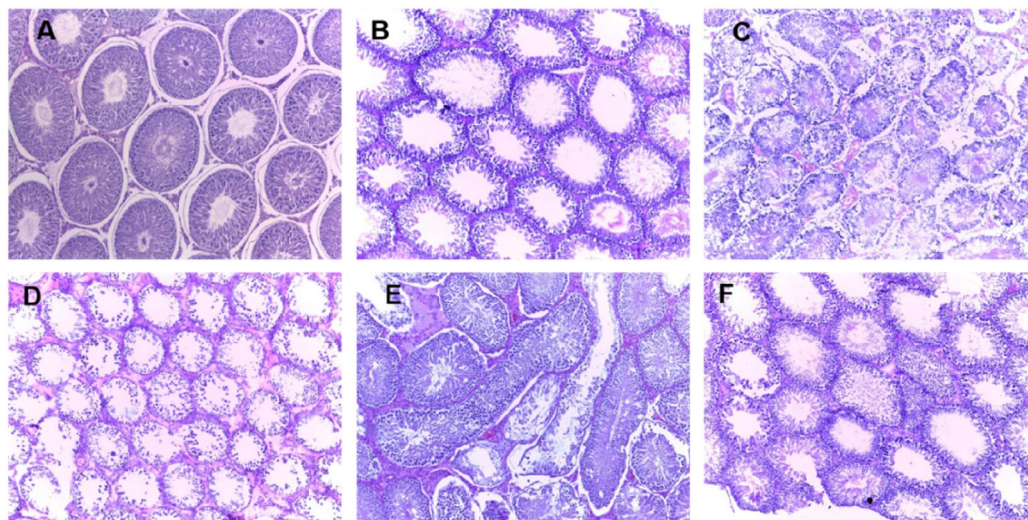


Figure 2. Histopathological section of the testis stained with hematoxylin and eosin (x100). **A** Negative control group without morphological alterations. **B** 33mg/kg Omeo and **F** 52mg/kg Terpinen-4-ol presented mild testicular atrophy. **C** 100mg/kg Omeo presented moderate testicular atrophy. **D** 300mg/kg Omeo presented severe atrophy, with testicular degeneration. **E** 77mg/kg γ -terpinene presented very mild testicular atrophy.

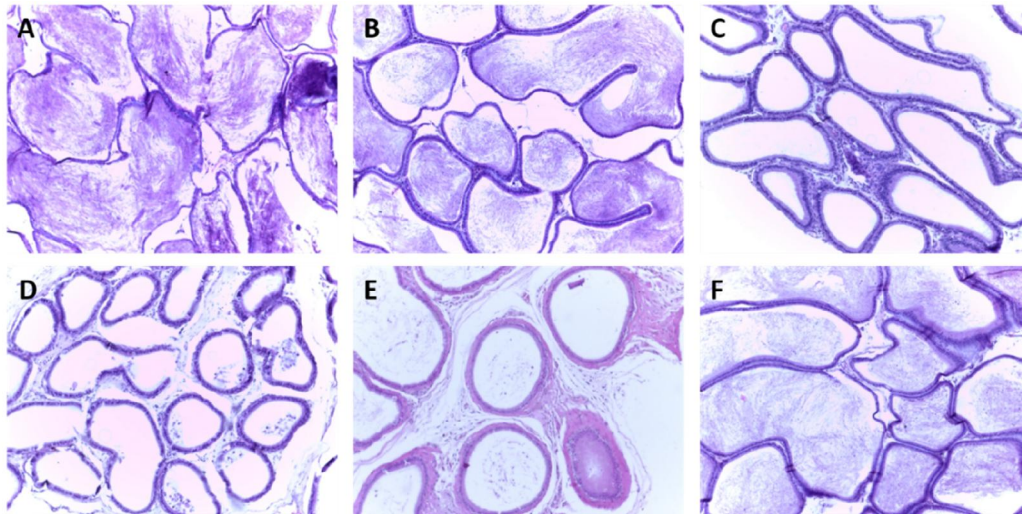


Figure 3. Histopathological section of the epididymis stained with hematoxylin and eosin (x100). **A** Negative control group, **B** 33mg/kg Omeo and **F** 52mg/kg Terpinen-4-ol with normal presence of spermatozoa. **C** 100mg/kg Omeo, **D** 300mg/kg Omeo and **E** 77mg/kg γ -terpinene presented few spermatozoa.

Table 2. Final body weight (g) and organ relative weights (g%) of male rats treated with different concentrations of *O. majorana* essential oil (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) and major compounds (77mg/kg γ -terpinene and 52mg/kg Terpinen-4-ol)

	Negative Control	<i>O. majorana</i> essential oil			γ -terpinene	Terpinen-4-ol
		33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg	77mg/kg	52mg/kg
BW (g) ^a	465.7 \pm 23.0	463.7 \pm 21.3	417.2 \pm 19.4*	408.6 \pm 21.7*	451.0 \pm 20.8*	454.7 \pm 21.1
BW gain (%) prior mating	17.43 \pm 0.05	19.55 \pm 0.10	10.14 \pm 0.04*	8.18 \pm 0.03*	30.90 \pm 0.07*	21.28 \pm 0.07
BW gain (%) during mating	3.59 \pm 0.02	3.00 \pm 0.06	4.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.03	3.00 \pm 0.02	0.00 \pm 0.03
Heart	0.28 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02
Spleen	0.24 \pm 0.04	0.20 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02
Liver	3.30 \pm 0.22	3.70 \pm 0.15*	3.16 \pm 0.14	3.64 \pm 0.22*	3.72 \pm 0.32*	3.49 \pm 0.34
Kidney right	0.36 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.40 \pm 0.03	0.34 \pm 0.02	0.37 \pm 0.02
Kidney left	0.34 \pm 0.02	0.37 \pm 0.04	0.36 \pm 0.02	0.38 \pm 0.03	0.33 \pm 0.02	0.35 \pm 0.03
Testis right	0.44 \pm 0.03	0.41 \pm 0.09	0.47 \pm 0.06	0.23 \pm 0.04*	0.40 \pm 0.04	0.37 \pm 0.09
Testis left	0.43 \pm 0.03	0.41 \pm 0.08	0.46 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04*	0.42 \pm 0.05	0.38 \pm 0.10
Epididymis right	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01*	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02
Epididymis left	0.14 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01*	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
Seminal vesicle	0.19 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03	0.21 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04	0.18 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02
Prostate	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04

^a BW: Final body weight (at euthanasia day) expressed in grams. All other values in percentage. Data are expressed as Mean \pm SEM. *Significantly different from the negative control group ($p < 0.05$; ANOVA).

Table 3. Chemical composition of the *Origanum majorana* essential oil

Compound	RI ^a	%
α -thujene	921	3.96
α -pinene	927	1.24
Sabinene	966	10.80
Myrcene	986	2.08
α -phellandrene	1000	1.70
α -terpinene	1012	17.35
<i>o</i> -cymene	1019	2.24
β -phellandrene	1023	7.05
γ -terpinene	1053	25.73
Terpinolene	1082	3.76
N.I.	1097	1.06
Terpinen-4-ol	1174	17.24
<i>trans</i> -sabinene hydrate acetate	1248	0.13
Linalool acetate	1251	1.38
Terpinen-4-ol acetate	1293	0.88
(<i>Z</i>)-caryophyllene	1404	2.72
N.I.	1480	0.67
Total identified		96.02

^aRelative retention index experimentally determined against n-alkanes on Durabond-DB5 column

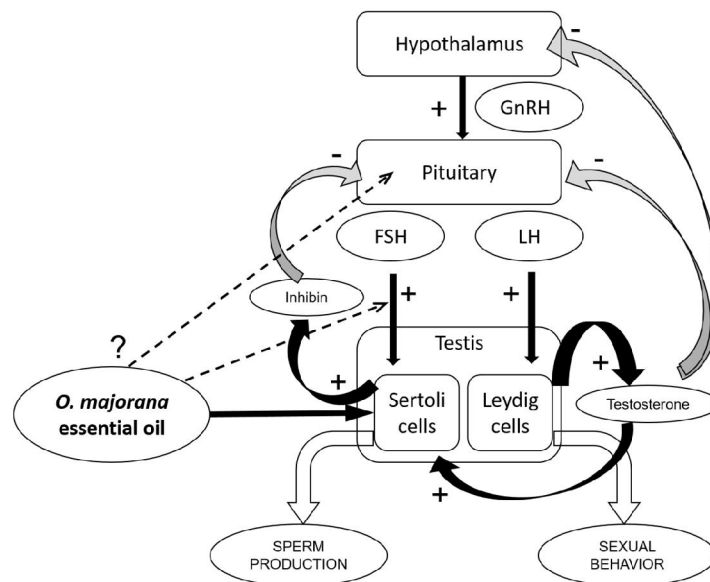


Figure 4. Schematic diagram of possible mechanisms mediating *Origanum majorana* essential oil decrease fertility. The essential oil can act cytotoxic form in Sertoli cells, causing blocking the path of FSH, or interact with the pituitary gland, reducing the production of sperm in the testis.

ARTIGO II

Potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar

Artigo a ser submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira

Potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar¹

Andrea dos Santos Dantas^{2,3*}, Clarissa Boemler Hollenbach², Luciana Dalazen dos Santos^{2,3}, Lismara do Castro Nascimento⁴, Luiz Carlos Klein-Júnior⁵, Fernanda Bastos de Mello², David Driemeier^{3,4}, João Roberto Braga de Mello^{2,3}

ABSTRACT - Dantas A.S., Hollenbach C.B., Santos L.D., Nascimento L.C., Klein-Júnior L.C., Mello F.B., Driemeier D., Mello J.R.B., 2016. [The teratogenic potential of *Origanum majorana* essential oil and major compounds γ -terpinene and terpinen-4-ol in Wistar rats offspring]. Potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica - Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Pesquisa de Doutorado com apoio CNPq. E-mail: asdmedina@gmail.com. *Origanum majorana* is a plant rich in essential oils that have important actions including antioxidant and antimicrobial, and on the central nervous system. Previous studies has reported efficiency antifungal *in vitro* against *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp and *Trichosporon asahii*, and safety *in vivo* toxicology tests. This study evaluated the teratogenic potential of the 33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg *Origanum majorana* essential oil (Omeo) and its major compounds 77mg/kg γ -terpinene and 52mg/kg terpinen-4-ol on the offspring of female rats Wistar treated during pregnancy. The Omeo doses have been established according to previous studies. The pregnant females were monitored daily for weight gain and intake of water and food. The treatment was carried out orally from 6th to 15th day of gestation, which covers the period of fetal skeletal development. After Cesarean, fetuses were diaphanized, stained and evaluated individually for the presence of skeletal alterations. Maternal toxicity was not observed. However, fetal development was affected by the treatments, demonstrated by skeletal development delay in all treated groups. The highest doses of Omeo and terpinen-4-ol may cause skeletal malformation, suggesting that the administration of these doses during pregnancy should be avoided.

INDEX TERMS: teratogenicity, embriotoxicity, sweet marjoram, essential oil

¹ Recebido em..... Aceito para publicação em....

² Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica - Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Pesquisa de Doutorado com apoio CNPq. *Autor para correspondência: Andrea dos Santos Dantas. E-mail: asdmedina@gmail.com.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵ Laboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO – *Origanum majorana* é uma planta rica em óleos essenciais que tem apresentado importantes funções terapêuticas, incluindo ações sobre sistema nervoso central, antioxidante e antimicrobiana. Nosso grupo tem relatado eficiência antifúngica *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii* e segurança *in vivo* em ensaios de toxicidade. O presente estudo avaliou o potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) nas doses 33mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg e de seus compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol sobre a prole de ratas Wistar tratadas durante período gestacional. As doses do Omeo foram estabelecidas de acordo com estudos prévios *in vitro* e os compostos majoritários foram estabelecidos conforme análise cromatográfica de Omeo. As fêmeas gestantes foram acompanhadas diariamente quanto ao ganho de peso e ingestão de água e alimento. O tratamento foi realizado por via oral do 6º ao 15º dia da gestação, que compreende o período do desenvolvimento esquelético fetal. Após cesárea, os fetos foram diafanizados, corados com vermelho de alizarina e avaliados individualmente quanto à presença de alterações ósseas

incluindo posição, ausência, forma (malformação óssea) e problemas de calcificação óssea (retardo ósseo), de acordo com atlas de anomalias ósseas e externas de ratos. Não foi observada toxicidade materna em nenhum dos grupos. No entanto, os tratamentos interferiram no desenvolvimento fetal demonstrado pelo retardo no desenvolvimento esquelético em todos os grupos. As doses mais altas de Omeo e o composto terpinen-4-ol causam malformação esquelética, sugerindo que a administração dessas doses em fêmeas gestantes deve ser evitado.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: teratogenicidade, embriotoxicidade, manjerona, óleo essencial

INTRODUÇÃO

Origanum majorana L. ou *Majorana hortensis* Moench é uma planta aromática da família Lamiaceae rica em óleos essenciais. Conhecida como manjerona ("sweet marjoram"), é nativa da região do Mar Mediterrâneo, mas cultivada mundialmente ao longo do ano. No uso popular, infusões são utilizadas em distúrbios do sistema respiratório (como asma, tosse, sinusite), do sistema nervoso central (depressão, tonturas) e do sistema gastrointestinal, além de febre do feno, dor de cabeça, dor de dente, como diurético e indutor da menstruação (El-Ashmawy et al. 2007, Ramadan et al. 2012).

A avaliação de eficácia de extratos de *Origanum majorana* relatam potencial uso como anticâncer (Al Dhaheri et al. 2013, Rao et al. 2014), imunoestimulante, antígeno tóxico e antimutagênico (Al-Harbi 2011, Ramadan et al. 2012, Khan et al. 2013), além de ação antibacteriana e antifúngica (Abdel-Massih e Abraham 2014). Estudos prévios relacionados à toxicidade reprodutiva, sugerem que o potencial antioxidante do extrato das folhas de *Origanum majorana* atenuam o dano oxidativo testicular e a indução de apoptose induzida pela exposição a metomil (Heikal 2015). Na Ásia e África, extratos também são utilizados como sedativo e neurotônico (Raafat et al., 2013). O monoterpeno γ -terpinene (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4), um dos compostos majoritários do óleo essencial de *Origanum majorana* também está presente no óleo essencial de *Centella asiatica* (Umbelliferae) utilizada na medicina Chinesa em casos de exaustão física ou mental e para restaurar juventude, memória e longevidade (Howes and Houghton, 2003). Derivados de monoterpenos com estrutura similar ao γ -terpinene tem mostrado atividade no sistema nervoso central, incluindo efeitos sedativo, antidepressivo e antinociceptivo (Passos et al., 2009).

Estudos indicam que o óleo essencial de *Origanum majorana* pode ser usado na prevenção de doenças relacionadas à idade (Jun et al. 2001, Alizadeh et al. 2011, Roby et al. 2013) e distúrbios no sistema nervoso central (El-Ashmawy et al. 2007, Rezaie et al. 2011), por causa de seus efeitos antioxidantes. Em aromaterapia, o óleo essencial de *Origanum majorana* tem apresentado efeitos indutores do sono em mulheres com pobre ou boa qualidade de sono (Jung e Choi 2012).

Importantes atividades do óleo essencial de *Origanum majorana* também incluem inibição do crescimento de bactérias e fungos, ação antioxidante e aumento na função do fígado e rins (Busatta et al. 2008, Prakash et al. 2012). Nosso grupo tem identificado atividade antifúngica *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii* (Santim 2013).

No entanto, é necessário avaliar o potencial toxicológico do óleo para garantir a segurança de suas propriedades terapêuticas. Em baixas doses (0,16mL/kg), o óleo essencial de *Origanum majorana* foi capaz de prevenir danos induzidos pelo etanol como diminuição na qualidade de esperma, dos níveis de testosterona e do peso de órgãos reprodutivos em ratos machos (El-Ashmawy et al. 2007). No entanto, quando avaliado em doses mais altas (100mg/kg e 300mg/kg) foi observada alteração nas taxas de fertilidade de ratos machos Wistar relacionada com diminuição na qualidade do sêmen e espermatozoides (Dantas et al. 2014). Sabe-se que o tratamento de progenitores pode resultar em infertilidade, morte embrionária e anomalias não específicas, bem como em redução do peso ao nascer, diminuição do tamanho de progênes e retardo no desenvolvimento fetal (Lemônica 2008, Hollenbach et al. 2010).

Dessa forma, para que um feto apresente um desenvolvimento normal, faz-se necessária harmonia entre a herança genética adequada e o meio ambiente intrauterino. Quando uma fêmea prenha é exposta a um agente químico, o organismo embriofetal é um alvo secundário da substância em teste, e seu efeito sobre esse organismo dependerá da ação sobre

o organismo primário (progenitora), do estágio de desenvolvimento do feto, entre outros fatores (Lemonica 2008).

Considerando o potencial farmacológico e a ausência de estudos de toxicidade pré-natal, o presente estudo pretende investigar o potencial teratogênico do óleo essencial de *Origanum majorana* e de seus compostos majoritários sobre a prole de fêmeas Wistar tratadas durante período gestacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra. Folhas secas de *Origanum majorana* foram adquiridas da empresa Luar Sul (Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) e o óleo essencial foi obtido por destilação a vapor utilizando um aparato de Clevenger modificado. Cromatografia gasosa foi conduzida em um espectrofotômetro de massa (Shimadzu GC/MS-QP5000). Coluna apolar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foi utilizada. Para confirmar a identidade dos compostos, uma coluna polar (LM-120) também foi utilizada. GC-FID foi utilizado para quantificação (Limberger et al. 2004, Simões-Pires et al. 2005). A composição percentual do óleo foi obtida eletronicamente e a identificação dos compostos foi baseada na comparação dos índices de retenção, determinada relativamente aos tempos de retenção de homólogos n-alcenos, pelo banco de dados (NIST) e literatura (Adams 2007). Demais substâncias utilizadas no experimento foram adquiridas de fornecedores padrão e apresentando grau analítico.

Animais. O estudo foi conduzido com 96 ratos Wistar adultos (n= 72 fêmeas, 90 dias, 200-300g; n= 24 machos, 90 dias, 300-400g). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) e aclimatados no biotério do Departamento de Farmacologia sete dias antes do início do experimento. As condições do biotério incluem ambiente com temperatura e umidade relativa controladas (22 ±2°C; 50%UR ±5), ciclo de 12h luz/escuro, dieta padrão ração Nuvilab CR1 (Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água ad libitum durante todo o experimento. Os animais foram individualizados em caixas de propileno (40x33x16,5cm) com fundo coberto de maravalha. Todas as fases foram realizadas de acordo com normas e princípios éticos do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, UFRGS; Protocolo n. 23613/2013).

Protocolo experimental. Fêmeas virgens foram colocadas nas caixas de machos durante 2h por dia ao fim do período escuro. Após esse período, foi coletado lavado vaginal em busca de espermatozoides ou presença de tampão vaginal. O dia zero da gestação foi considerado quando um desses indicativos foi observado. Fêmeas prenhas foram separadas e fêmeas não prenhas seguiram em acasalamento por até 21 dias. As fêmeas prenhas foram divididas em seis grupos de 12 fêmeas cada um. As doses do óleo essencial de *Origanum majorana* foram estabelecidas de acordo com estudos prévios de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados por Santim (2013) sendo 33mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg. Os dois compostos majoritários foram estabelecidos conforme análise cromatográfica e as doses conforme a concentração na dose terapêutica *in vitro* (77mg/kg γ-terpinene e 52mg/kg terpinen-4-ol). Foi constituído um grupo Controle Negativo que recebeu o veículo da solução. O tratamento foi realizado por via oral através de sonda oro gástrica flexível (10ml/kg massa corporal) do 6º ao 15º dia da gestação. As fêmeas foram pesadas diariamente e monitoradas quanto à ingestão de água e alimento, e sinais de toxicidade, como lacrimação, piloereção, respiração alterada, tremores, diarreia, aborto e morte (OECD 414, 2011).

Cesárea e coleta de órgãos. No 21º dia da gestação, as fêmeas foram submetidas ao parto cesárea, sendo anestesiadas previamente com 10mg/kg Xilazina 2% e 50mg/kg Tiopental sódico® por via intraperitoneal. Após alcançar estado de anestesia foram submetidas à celiotomia. O útero gravídico foi removido e sua massa com fetos foi mensurada. A eutanásia das fêmeas foi realizada com sobredose de Tiopental sódico® por via endovenosa. Coração, fígado, baço e rins foram coletados, pesados e avaliados macroscopicamente. O peso relativo dos órgãos foi calculado por peso do órgão/peso corporal x 100. Fragmentos teciduais foram coletados e fixados em formalina tamponada 10%, processados pelos métodos de rotina histológica, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) e avaliados histologicamente. Os fetos foram removidos do útero gravídico, enxugados, e avaliados quanto a alterações

macroscópicas externas. A eutanásia dos fetos foi realizada com Isoflurano® via inalatória. Posteriormente, os fetos foram identificados, pesados, sexados e fixados em formol 10%. Após remoção dos fetos, os sítios de implantação no útero foram avaliados.

Processo de diafanização de fetos. Os fetos foram submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor & Van Dyke (1985) para avaliação de alterações esqueléticas. Fetos fixados em formol 10% foram desidratados por 24 horas em álcool etílico 70% e em álcool etílico 96° GL. Na sequência foram eviscerados e imersos em solução tampão de borato de sódio 30% durante 2 dias, com troca da solução em 24h. A clarificação dos fetos foi realizada em solução de borato de sódio 30% acrescido de 1g/L de tripsina, em temperatura ambiente, pelo período necessário, sendo a solução trocada sempre que turva. Para coloração dos esqueletos foi utilizada solução de hidróxido de potássio a 1,5% adicionada de corante vermelho de alizarina, por 24h. Após, os fetos passaram por solução de glicerina em hidróxido de potássio a 1,5%, em concentrações de 30% e 70%, 48h em cada e foram armazenados em glicerina PA, para posterior avaliação.

Análise estatística. Variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Bonferroni quando necessário. Variáveis qualitativas foram avaliadas através do teste Qui-quadrado. Nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos avaliando efeitos de xenobióticos sobre a formação fetal devem levar em consideração que o equilíbrio do organismo materno é essencial para o desenvolvimento embriofetal normal, uma vez que compõem a unidade “materno-placentária-fetal (Chahoud et al. 2002, Lemônica, 2001). Por esse motivo, resultados de toxicidade materna são tão importantes antes de se considerar efeitos sobre a progênie.

Observações relacionadas à toxicidade materna incluem perda de peso e alterações na ingestão de água e alimento. Não foi observada diferença significativa na ingestão de água e alimento pelas fêmeas durante o tratamento, assim como também não houve sinais de toxicidade. Conforme descrito no Quadro 1, houve aumento de peso das fêmeas do grupo 33mg/kg Omeo em relação ao grupo Controle negativo, mas não foi observada redução no ganho de peso em nenhum dos grupos. Também não foi observada diferença de peso entre os órgãos, e as análises histológicas apresentaram resultados normais, indicando que o óleo essencial de *Origanum majorana* e os compostos majoritários nas doses testadas não induzem toxicidade sistêmica ou morte em fêmeas prenhas.

A literatura refere doses muito superiores às testadas para toxicidade oral (2,24g/kg) e dérmica (>5g/kg) do óleo essencial de *Origanum majorana* (Opdyke, 1976; Tisserand e Young, 2014), confirmando nossos resultados negativos para toxicidade sistêmica. Da mesma forma, os compostos majoritários têm apresentado doses tóxicas mais altas do que as testadas. A DL50 oral em ratos do γ -terpinene foi relatada como sendo 3,65g/kg e a dermal em coelhos excedeu 5g/kg (Moreno 1973). Já o terpinen-4-ol apresentou efeitos tóxicos *in vitro* no ensaio *Salmonella*/microsoma em concentrações superiores a 1500 μ L/mL (Fletcher et al. 2005, Hollenbach et al. 2015).

No entanto, índices reprodutivos apresentados no Quadro 2 mostram diminuição do tamanho da progênie nos grupos tratados com os compostos majoritários γ -terpinene e terpinen-4-ol com diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo. O grupo 300mg/kg Omeo apresentou redução significativa no peso dos fetos. Também foi observada redução significativa nos sítios de implantação do grupo terpinen-4-ol sugerindo toxicidade fetal tanto no grupo com a mais alta concentração de Omeo, quanto dos compostos majoritários de forma isolada.

Os efeitos de um agente embriofetotóxico podem aparecer na forma de malformações, déficit funcional, retardo de desenvolvimento geral ou específico ou ainda letalidade, dependendo do tipo de agente, da dose e frequência de exposição e do estágio de desenvolvimento no qual se encontra o feto no momento da exposição, sendo caracterizado embriofetotoxicidade, retardo do crescimento intrauterino ou alterações morfológicas viscerais ou esqueléticas (Pinto 2005, Lemônica 2008). Com relação a malformação externa foram observados dois fetos incompletamente formados no grupo 100mg/kg Omeo e um feto com cabeça e tronco emendados no grupo 300mg/kg Omeo. Diferença estatística foi encontrada no grupo terpinen-4-ol que apresentou dois fetos com cabeça e tronco emendados.

O Quadro 3 apresenta alterações ósseas de posição, ausência, forma (malformação óssea) e problemas de calcificação óssea (retardo ósseo). Foi observada diferença estatística para pobre ossificação e ossificação incompleta da cabeça sugerindo atraso no desenvolvimento esquelético para todos os grupos tratados em relação ao Controle Negativo. Essas alterações relacionadas a retardo do desenvolvimento já foram observadas em estudo avaliando embriotoxicidade de outro monoterpene, α -terpinene em doses de 60mg/kg ou mais (Araújo et al. 1996).

O grupo 300mg/kg Omeo apresentou diferença significativa para outras alterações importantes na cabeça: fusão do zigomático, fusão do supraoccipital com interparietal, justaposição de interparietais, parietais e frontais, além de irregularidades na formação dos ossos mandíbula, nasal, palatino e processo zigomático (Figura 1). O palatino irregular também apresentou diferença significativa nos grupos 100mg/kg Omeo e terpinen-4-ol. Tendo em vista esses achados, o retardo na ossificação pode ser considerado secundário.

No esterno, houve diferença na ossificação e tamanho de esternébras para todos os grupos em relação ao Controle Negativo, também indicando retardo no desenvolvimento. Na coluna vertebral, pode ser observada diferença significativa para o grupo 100mg/kg Omeo na formação do atlas na região cervical. As vértebras da região torácica apresentaram alterações nos grupos tratados com Omeo nas diferentes doses e as da região lombar apresentaram redução no tamanho para o grupo 33mg/kg Omeo. Na região sacral, ficou evidente um aumento nas alterações relacionadas a incompleta ossificação nos grupos tratados com o óleo essencial de *Origanum majorana*. Como não foram observados sinais de toxicidade materna, as alterações fetais encontradas devem estar relacionadas a uma ação direta sobre o desenvolvimento esquelético fetal.

Algumas irregularidades esqueléticas observadas na dose 300mg/kg Omeo não foram igualmente encontradas nos grupos γ -terpinene e terpinen-4-ol isoladamente, sugerindo que as alterações sejam causadas pela associação dos demais componentes do óleo essencial e não apenas pelos majoritários. A literatura descreve a presença de γ -terpinene e terpinen-4-ol no óleo essencial de *Origanum majorana* com algumas variações quantitativas, confirmando o perfil químico da amostra utilizada (Rodrigues et al. 2002, Vági et al. 2005, Busatta et al. 2008, Alizadeh et al. 2011, Jelali et al. 2011, Ramos et al. 2011, Tisserand e Young 2014).

CONCLUSÃO

O presente estudo indica que o óleo essencial de *Origanum majorana* nas doses 33mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg e seus compostos majoritários γ -terpinene (77mg/kg) e terpinen-4-ol (52 mg/kg) não causam toxicidade materna quando administrados do 6º ao 15º de gestação. No entanto, interferem no desenvolvimento fetal demonstrado pelo retardo no desenvolvimento esquelético em todos os grupos. As doses mais altas do óleo e o composto terpinen-4-ol podem inclusive causar malformação esquelética, sugerindo que a administração dessas doses deve ser evitada em fêmeas durante período gestacional.

Agradecimentos. Projeto financiado pelo CNPq (Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, Phd). Agradecimentos à Prof. Dra. Amélia T. Henriques (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pela contribuição com as análises cromatográficas e Prof. Dr. David Driemeier (Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pela contribuição com as análises histopatológicas.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Massih, RM, Abraham A, 2014. Extracts of Rosmarinus officinalis, Rheum rhaponticum, and Origanum majorana exhibit significant anti-staphylococcal activity. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 5, 819-828.
- Adams, RP, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatograph/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing, Carol Stream.
- Al Dhaheri, Y, Attoub, S, Arafat, K, AbuQamar, S, Viallet, J, 2013. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of Origanum majorana on highly metastatic human breast cancer cells: Inhibition of NF κ B signaling and reduction of nitric oxide production. PLoS ONE. 8, e68808.

- Al-Harbi, NO, 2011. Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(23), 5479-5485.
- Alizadeh, A, Khosh-khui, M, Javidnia, K, Firuzi, OR, Jokar, SM, 2011. Chemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*. 5, 2326-2331.
- Araújo, IB, Souza, CAM, de Carvalho, RR, 1996. Study of the embryofetotoxicity of α -terpinene in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 34: 477-482.
- Busatta, C, Vidal, RS, Popiolski, AS, Mossi, AJ, Dariva, C, Rodrigues, MRA, Corazza, FC, Corazza, ML, Vladimir Oliveira J, Cansian, RL, 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25, 207-211.
- Chahoud, I, Faqi, AS, 1997. Atlas of External and skeletal anomalies in rats. Berlin: Institute for Clinical Pharmacology and Toxicology/Leipzig. CD-ROM.
- Chahoud, I, Koriyama, S, Paumgarten, FJR, 2002. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. *Toxicology*. 179(1-2), 137-49.
- Dallegre, E, Mantese, FD, Coelho, RS, Pereira, JD, Dalsenter, PR, Langeloh, A, 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. *Toxicology Letters*. 142, 45-52.
- Dantas, AS, Dafré, JC, Barroco, CA, Santos, LD, Klein-Júnior, LC, Leite Filho, RV, Driemeier, D, Mello, FB, Mello, JRB, 2014. Evaluation of fertility in rats treated with different concentrations of *Origanum majorana* essential oil. *Simpósio de Pesquisa em Medicina Veterinária 2014*. Viçosa, MG, Brasil. Disponível em: <http://www.simposiovet2014.blogspot.com.br/>. Acesso em 01 fev. 2016.
- El-Ashmawy, IM, Saleh, A, Salama, OM, 2007. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101, 320-327.
- Fletcher, JP, Cassela JP, Hughes, D, Cassela, S, 2005. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. *International Journal of Aromatherapy*. 15, 81-86.
- Heikal, TM, 2015. Antioxidant potentials of *Origanum majorana* leaves extract against reproductive toxicity and apoptosis-related gene expression resulted from methomyl exposure in male rat. *Planta Medica*. 81, PM_13. DOI: 10.1055/s-0035-1565390.
- Hollenbach, CB, Bortolini, CE, Batista, JM, Hollenbach, EB, Schuch, TL, Pacheco, MH, Mello, FB, Mello, JRB, 2010. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(4), 845-852.
- Hollenbach, CB, Bing, RS, Stedile, R, Mello, FPS, Schuch, TL, Rodrigues, MRA, Mello, FB, Mello, JRB, 2015. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43, 1295-1301.
- Howes, MJR, Houghton, PJ, 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75, 513-527.
- Jelali, N, Dhifi, W, Chahed, T, Marzouk, B, 2011. Salinity effects on growth, essential oil yield and composition and phenolic compounds content of marjoram leaves. *Journal of Food Biochemistry*. 35, 1443-1450.
- Jun, WJ, Han, BK, Yu, KW, Kim, MS, Chang, IS, Kim, HY, 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*. 75, 439-444.
- Jung, HN, Choi, HJ, 2012. Effects of *Origanum majorana* essential oil aroma on the electroencephalograms of female young adults with sleep disorders. *Journal of Life Science*. 22, 1077-1084. DOI: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.8.1077>.
- Khan, JA, Jalal, JA, Ioannides, C, Moselhy, SS, 2013. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. *Toxicology and Industrial Health*. 29, 142-148.
- Lemônica, IP, 2001. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: Spritzer, DT, Sanseverino, MTV, Schuller-Faccini, L. *Manual de Teratogênese*. Porto Alegre, RS, Brasil: Editora UFRGS. p.19-39.
- Lemônica, IP, 2008. Toxicologia da Reprodução. In: Oga, S, Camargo, MMA, Batistuzzo, JAO. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, SP, Brasil: Atheneu Editora. p.103-113.

- Limberger, RP, Sobral, M, Henriques, AT, Menut, C, Bessière, J-M, 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*. 27, 916-919.
- Lorke, D, 1977. Evaluation of skeleton. In: Neubert, D, Merker, HJ, Kwasigroch, TE. *Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag. p.52-71.
- Opdyke, DLJ, 1976. Marjoram oil sweet. *Food and Cosmetics Toxicology*. 14 (5), 469.
- OECD 414, 2011. Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: 10.1787/9789264070820-en.
- Passos, CS, Arbo, MD, Rates, SMK, Von Poser, GL, 2009. Terpenoids with activity in the Central Nervous system (CNS). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19, 140-149.
- Pinto, FCM, 2005. Estudo da embriotoxicidade da beta-ionona em ratos. Tese de doutorado. Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/4968>. Acesso em: 01 fev. 2016. p.81.
- Prakash, B, Singh, P, Kedia, A, Dubey, NK, 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*. 49(1), 201-208.
- Raafat, K, Jassar, H, Aboul-Ela, M, El-Lakany, A, 2013. Protective effects of *Origanum majorana* L. against neurodegeneration: fingerprinting, isolation, and *in vivo* glycine receptors behavioral model. *International Journal of Phytomedicine*. 5, 46-57.
- Ramadan, G, El-Beih, NM, Zahra, MM, 2012. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. *British Journal of Nutrition*. 108, 1059-1068.
- Ramos, S, Rojas, LB, Lucena, ME, Meccia, G, Usabillaga, A, 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum majorana* L. essential oil from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*. 23, 45-49.
- Rao, S, Timsina, B, Nadumane, VK, 2014. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum majorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4, 389-394.
- Rezaie, A, Mousavi, G, Nazeri, M, Jafari, B, Ebadi, A, Ahmadeh, C, Habibi, E, 2011. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. *Research Journal of Biological Sciences*. 6, 611-614.
- Roby, MHH, Sarhana, MA, Selima, KAH, Khalela, KI, 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43, 827-831.
- Rodrigues, MRA, Caramão, EB, Arce, L, Ríos, A, Valcárcel, M, 2002. Determination of monoterpene hydrocarbons and alcohols in *Majorana hortensis* Moench by micellar electrokinetic capillary chromatographic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4215-4220.
- Santim, R. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da Família Lamiaceae. Tese de doutorado. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, 2013. <http://hdl.handle.net/10183/75649>. Acesso em: 01 fev. 2016. p.104.
- Simões-Pires, CA, Debenedetti, S, Spegazzini, E, Mentz, LA, Matzenbacher, NI, Limberger, RP, Henriques, AT, 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution*. 253, 23-32.
- Taylor, WR, VanDyke, GC, 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*. 9(2), 107-119.
- Tisserand, R, Young, R. *Essential oil safety. A guide for health care professionals*. 2ed. London, UK: Churchill Livingstone Elsevier, 2014. ISBN 978-0-443-06241-4.
- Vági, E, Simándi, B, Suhajda, Á, Héthelyi, É, 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*. 38, 51-57.

Quadro 1. Efeitos do tratamento de fêmeas prenhas com óleo essencial de *O. majorana* (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol sobre o ganho percentual de peso corporal (%) e peso relativo de órgãos (%)

	Controle Negativo	<i>Origanum majorana</i>			γ -terpinene	terpinen-4-ol
		33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg		
Ganho de peso corporal (g%)	37.32 \pm 0.06	52.97 \pm 0.09*	43.77 \pm 0.05	37.59 \pm 0.08	38.62 \pm 0.08	30.11 \pm 0.07
Coração (g%)	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05	0.24 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01
Baço (g%)	0.22 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04	0.20 \pm 0.02	0.23 \pm 0.03	0.25 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01
Fígado (g%)	3.71 \pm 0.21	3.98 \pm 0.20	3.96 \pm 0.34	3.98 \pm 0.36	4.60 \pm 0.30	4.14 \pm 0.10
Rim direito (g%)	0.33 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.30 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04	0.28 \pm 0.02
Rim esquerdo (g%)	0.31 \pm 0.01	0.26 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03	0.29 \pm 0.03	0.29 \pm 0.04	0.27 \pm 0.01
Útero com fetos (g%)	20.36 \pm 3.77	21.10 \pm 4.87	22.98 \pm 2.65	19.42 \pm 3.86	20.06 \pm 4.52	15.81 \pm 3.98

Resultados são expressos como Média \pm SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

Quadro 2. Índices reprodutivos de fêmeas tratadas com óleo essencial de *O. majorana* (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol do 6° ao 15° dia da gestação

	Controle Negativo	<i>Origanum majorana</i>			γ -terpinene	terpinen-4-ol
		33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg		
Progenitoras (fetos) (n)	12 (139)	8 (84)	9 (104)	9 (93)	8 (68)	8 (58)
Fetos por progênie (n)	11,58 \pm 1,53	10,50 \pm 2,50	11,56 \pm 1,16	10,33 \pm 2,37	8,50 \pm 2,25*	7,25 \pm 2,75*
Sítios de Implantação (n)	12,17 \pm 2,03	11,35 \pm 2,75	12,22 \pm 0,74	11,00 \pm 2,44	9,50 \pm 2,25	7,50 \pm 3,00*
Perda pós- implantação (%)	4,79 \pm 0,78	6,67 \pm 0,84	5,45 \pm 0,84	6,06 \pm 0,84	5,26 \pm 0,32	3,33 \pm 3,33
Peso médio dos fetos (g)	4,76 \pm 0,37	4,88 \pm 0,24	4,75 \pm 0,33	4,42 \pm 0,22*	5,23 \pm 0,39	5,29 \pm 0,32*
Proporção Macho/Fêmea	0,99 : 1	1,15 : 1	0,89 : 1	0,90 : 1	0,89 : 1	1,23 : 1
Malformação externa (n)	0	0	2 ^a	1 ^b	0	2 * ^b

^aFetos incompletamente formados, não avaliados para alteração esquelética. ^bCabeça e tronco emendados. Resultados quantitativos são expressos como Média \pm SEM e analisados por ANOVA. Resultados qualitativos são expressos como percentual e analisados por Qui-quadrado.

*Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$).

Quadro 3. Percentual de alterações esqueléticas em fetos de fêmeas tratadas com óleo essencial de *O. majorana* (33mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg) e compostos majoritários 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol do 6° ao 15° dia da gestação

	Controle Negativo	<i>Origanum majorana</i>			γ -terpinene	terpinen-4-ol
		33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg		
Fetos avaliados (n)	139	84	102	93	68	58
Fetos com alteração esquelética (%)	45,3	85,7*	92,2*	100,0*	76,5*	100,0*
CABEÇA						
Pobremente ossificada	33,1	70,2*	45,1*	24,7	60,3*	100,0*
Incompleta ossificação	10,1	45,2*	8,8	11,8	0,0	0,0
Outras anormalidades						
Fusão do zigomático	0,0	0,0	0,0	15,1*	0,0	0,0
Fusão do supraoccipital com interparietal	0,0	0,0	0,0	5,4*	0,0	0,0
Justaposição de interparietais, parietais e frontais	7,9	0,0	8,8	45,2*	0,0	0,0
Mandíbula irregular	2,9	2,4	8,8	24,7*	0,0	0,0
Nasal irregular	0,0	0,0	0,0	7,5*	0,0	0,0
Palatino irregular	2,9	2,4	7,8*	9,7*	0,0	10,3*
Processo zigomático irregular	9,4	0,0	0,0	25,8*	0,0	0,0
ESTERNO						
Alteração em esternébras						
Incompleta ossificação	2,9	9,5*	9,8*	12,9*	39,7*	24,1*
Esternébras irregulares	18,0	52,4*	63,7*	72,0*	20,6	25,9*
COLUNA VERTEBRAL						
Cervical						
Atlas irregular	2,9	2,4	27,5*	9,7	0,0	0,0
Torácica						
Redução no tamanho	0,0	22,6*	0,0	5,4*	0,0	0,0
Centros vertebrais irregulares	1,4	4,8	8,8*	7,5	0,0	0,0
Lombar						
Redução no tamanho	0,0	25,0*	0,0	2,2	0,0	0,0
Sacral						
Incompleta ossificação	2,9	15,5*	36,3*	24,7*	0,0	0,0

Resultados são expressos como percentual (%). *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; Qui-Quadrado).

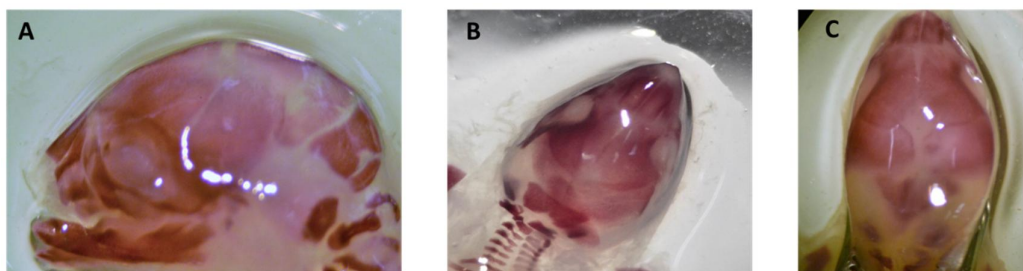


Fig 1. Algumas das alterações esqueléticas observadas em fetos de fêmeas tratadas com 300mg/kg Omeo (A, B) e 100mg/kg Omeo (C) do 6° ao 15° dia da gestação. (A) Mandíbula irregular, nasal irregular e incompleta ossificação, fusão do zigomático, parietais e interparietais pobremente ossificados. (B) Justaposição de interparietais e parietais. (C) Incompleta ossificação de interparietais e supraoccipital, justaposição de parietais e frontais.

ARTIGO III

**Efeitos da exposição de ratas Wistar ao óleo essencial de *Origanum majorana* sobre
parâmetros reprodutivos e comportamentais da progênie**

Artigo a ser submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira

Efeitos da exposição de ratas Wistar ao óleo essencial de *Origanum majorana* sobre parâmetros reprodutivos e comportamentais da progênie¹

Andrea dos Santos Dantas^{2,3,*}, Laís Hartmann Jardim^{2,4}, Luciana Dalazen dos Santos^{2,3},
Fernanda Bastos de Mello², João Roberto Braga de Mello^{2,3,4}

ABSTRACT - Dantas A.S., Jardim L.H., Santos L.D., Mello F.B., Mello J.R.B., 2016. [Reproductive parameters and behavior effects in rat offspring exposed to *Origanum majorana* essential oil prenatally and during lactation]. *Origanum majorana* L., a plant rich in essential oils, presents antifungal activity *in vitro* against *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp and *Trichosporon asahii* (Santim 2013), and other antimicrobial activities (Busatta et al., 2008, Prakash et al. 2012). However, maternal exposure to chemicals, including herbal medicines, can cause embryotoxic effects on offspring. Therefore, this study investigated the *Origanum majorana* essential oil (Omeo) effects and major compounds on the development of reproductive and behavioral parameters of exposed offspring during pre- and postnatal. The tested doses were 33mg/kg, 100mg/kg or 300mg/kg Omeo, 77mg/kg γ -terpinene or 52mg/kg terpinen-4-ol. Male parents were treated for 70 days and females for 14 days prior to mating, during pregnancy and lactation. Signs of maternal toxicity, reproductive rates, maternal behavior, offspring reproductive parameters, behavior in open field and sexual behavior were evaluated. Maternal toxicity was not observed. At doses 300mg/kg Omeo and 52mg/kg terpinene-4-ol was not observed pregnancy, probably by a reduction in male fertility (Dantas et al. 2014). The maternal behavior related to the nest was reduced with 100 mg/kg Omeo, but the maternal responsiveness was maintained by the nursing behavior. The dose of 100mg/kg Omeo induced reduction in the number of offspring per parent, increase in the time of pregnancy and changes in the development of males characterized by delayed preputial separation. Other reproductive and behavioral parameters of the male offspring were not affected. These results indicate that high doses of Omeo induce changes in reproductive rates and adverse effects on the developing offspring, and should not be used during pregnancy and lactation.

INDEX TERMS: toxicity in vivo, embriotoxicity, sweet marjoram, essential oil, behavior

¹ Recebido em..... Aceito para publicação em.....

² Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica - Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Pesquisa de Doutorado com apoio CNPq. *Autor para correspondência: Andrea dos Santos Dantas. E-mail: asdmedina@gmail.com.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia e Terapêutica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO - *Origanum majorana* L. é uma planta rica em óleos essenciais que apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii* (Santim 2013), além de outras atividades antimicrobianas (Busatta et al. 2008, Prakash et al. 2012). A exposição materna a substâncias químicas, incluindo fitoterápicos, pode causar efeitos embriotóxicos na progênie. Por esse motivo, o presente estudo investigou os efeitos do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) e compostos majoritários sobre o desenvolvimento de parâmetros reprodutivos e comportamentais de progênies expostas durante período pré e pós-natal. As doses avaliadas foram 33mg/kg, 100mg/kg ou 300mg/kg Omeo, 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol. Machos progenitores foram tratados por 70 dias e as fêmeas durante 14 dias antes do acasalamento, durante a gestação e lactação. Sinais de toxicidade materna, taxas reprodutivas e comportamento materno foram avaliados. Em relação à progênie foram avaliados parâmetros reprodutivos, comportamento em campo aberto e comportamento sexual. Não foram observados sinais de toxicidade materna. Fêmeas dos grupos 300mg/kg Omeo e terpinen-4-ol não gestaram, devido à redução na fertilidade dos machos (Dantas et al. 2014). O comportamento materno relacionado ao ninho foi reduzido na dose 100mg/kg, mas a capacidade de resposta materna foi mantida pelo comportamento de amamentação e cuidados com a progênie. A dose de 100mg/kg Omeo induziu redução no número de filhotes por progenitora, aumento no tempo de gestação e alteração no desenvolvimento de machos caracterizado pelo

retardo da separação prepucial. Demais parâmetros reprodutivos e comportamentais dos filhotes machos não foram alterados. Esses resultados indicam que em altas doses Omeo induz alteração em taxas reprodutivas e efeitos prejudiciais no desenvolvimento da progênie, não sendo indicado seu uso durante gestação e lactação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: toxicidade in vivo, embriotoxicidade, manjerona, óleo essencial, comportamento

INTRODUÇÃO

Durante o período gestacional, a exposição materna a substâncias químicas pode causar efeitos embriotóxicos na progênie. Muitas dessas substâncias são medicamentos ou produtos terapêuticos quem em outra fase do ciclo reprodutivo não causariam maior impacto. Por esse motivo, tem-se a necessidade de se estudar o risco toxicológico de toda substância com potencial uso farmacológico.

Origanum majorana L. ou *Majorana hortensis* Moench é uma planta aromática da família Lamiaceae rica em óleos essenciais cujo uso popular inclui distúrbios do sistema respiratório (como asma, tosse, sinusite), do sistema nervoso central (depressão, tonturas) e do sistema gastrointestinal (El-Ashmawy et al. 2007, Ramadan et al. 2012).

Nosso grupo tem investigado a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii* (Santim 2013), confirmando outros estudos que relatam importante atividade antimicrobiana (Busatta et al. 2008, Prakash et al. 2012). Outras propriedades encontradas incluem prevenção de doenças relacionadas à idade (Jun et al. 2001, Alizadeh et al. 2011, Roby et al. 2013) e distúrbios no sistema nervoso central (El-Ashmawy et al. 2007, Rezaie et al. 2011), por causa de seus efeitos antioxidantes. A avaliação de eficácia de extratos de *O. majorana* relatam ainda potencial uso como anticâncer (Al Dhaheri et al. 2013, Rao et al. 2014), imunoestimulante, antienotóxico e antitumagênico (Al-Harbi 2011, Ramadan et al. 2012, Khan et al. 2013), além de ação antibacteriana e antifúngica (Abdel-Massih e Abraham 2014).

Estudos sugerem que o potencial antioxidante do extrato das folhas de *O. majorana* atenuam o dano oxidativo testicular e a indução de apoptose induzida pela exposição a metomil (Heikal 2015). Em baixas doses (0,16mL/kg), Omeo foi capaz de prevenir danos induzidos pelo etanol como diminuição na qualidade de espermatozoides, dos níveis de testosterona e do peso de órgãos reprodutivos em ratos machos (El-Ashmawy et al. 2007). No entanto, quando avaliado em doses mais altas (100mg/kg e 300mg/kg) foi observada alteração nas taxas de fertilidade de ratos machos Wistar relacionada com diminuição na qualidade do sêmen e espermatozoides (Dantas et al. 2014).

Sabe-se que o tratamento de progenitores pode resultar em infertilidade, morte embrionária e anomalias não específicas, bem como em redução do peso ao nascer, diminuição do tamanho de progênies e retardo no desenvolvimento fetal (Lemônica 2008, Hollenbach et al. 2010). Por esse motivo, a necessidade de investigar os efeitos do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários sobre o desenvolvimento de parâmetros reprodutivos e comportamentais de progênies expostas durante período pré e pós-natal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e condições ambientais. Ratos Wistar foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) e aclimatados no biotério do Departamento de Farmacologia por sete dias antes do início do experimento. As condições do biotério incluem ambiente com temperatura e umidade relativa controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; $50\% \text{UR} \pm 5$), ciclo de 12h luz/escuro, dieta padrão ração Nuvilab CR1 (Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água ad libitum durante todo o experimento. Os animais foram individualizados em caixas de propileno (40x33x16,5cm) com fundo coberto de maravalha. Todas as fases foram realizadas de acordo com normas e princípios éticos do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, UFRGS; Protocolo n. 23613/2013).

Amostra e compostos majoritários. Folhas secas de *O. majorana* foram adquiridas da empresa Luar Sul (Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) para obtenção do óleo essencial (Omeo)

através de destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger modificado. Análise cromatográfica permitiu a identificação e quantificação dos compostos majoritários presentes na amostra, confirmando a composição química do óleo essencial de acordo com a literatura (Rodrigues et al. 2002, Vági et al. 2005, Busatta et al. 2008, Alizadeh et al. 2011, Jelali et al. 2011, Ramos et al. 2011, Tisserand e Young 2014). A análise identificou o composto γ -terpinene como majoritário (25,73g%), seguido por terpinen-4-ol (17,24g%), os quais foram utilizados no experimento.

Grupos experimentais. Cada grupo foi composto por dez machos e trinta fêmeas (90dias), submetidos diariamente a tratamento por via oral (10ml/kg de peso corporal) (OECD 414 2011). As doses de Omeo foram determinadas a partir dos estudos *in vitro* que apresentaram interessante atividade antifúngica (solução 3g%) (Santim 2013). Outras duas doses foram selecionadas a partir dessa. Os compostos majoritários constituíram dois grupos experimentais isolados visando correlacionar possíveis resultados de Omeo a um desses compostos. O veículo (Tween 80®) utilizado na emulsão do óleo essencial serviu como Controle negativo. Dessa forma, foram constituídos seis grupos experimentais: 33, 100 ou 300mg/kg Omeo; 77mg/kg γ -terpinene; 52mg/kg terpinen-4-ol; e Controle Negativo. As doses foram administradas aos machos durante 70 dias antes do acasalamento. As fêmeas receberam tratamento por 14 dias antes do acasalamento, durante o período de acasalamento, durante a gestação e lactação, diariamente.

Acasalamento, Gestação e Lactação. Após 14 dias de tratamento para fêmeas e 70 dias para machos, fêmeas nulíparas foram colocadas nas caixas de machos (3:1) durante duas horas por dia ao fim do período escuro, respeitando o grupo experimental dos animais. Lavado vaginal foi coletado em busca de espermatozoides ou presença de tampão vaginal. O dia zero da gestação foi considerado quando um desses indicativos foi observado. Fêmeas prenhas foram separadas e fêmeas não prenhas seguiram em acasalamento por até 21 dias. Fêmeas foram pesadas diariamente e monitoradas quanto à ingestão de água e alimento, sinais de toxicidade, como lacrimação, pilo ereção, respiração alterada, tremores, diarreia, aborto e morte, e data do parto (OECD 414, 2011). A data do parto foi determinada como dia zero (PPD 0). No dia pós-parto 1 (PPD 1), a progênie foi padronizada em oito filhotes (4 machos e 4 fêmeas, preferencialmente) e foi avaliada conforme descrito a seguir. Fêmeas lactantes foram avaliadas quanto a alterações no comportamento materno e no 21º dia pós-parto foram submetidas a eutanásia sendo anestesiadas com 10mg/kg Xilazina 2% e 50mg/kg Tiopental sódico® por via intraperitoneal. Após alcançar estado de anestesia foram submetidas à celiotomia. A eutanásia das fêmeas foi realizada com sobredose de Tiopental sódico® por via endovenosa. Coração, fígado, baço, rins, ovários e útero foram coletados, pesados e avaliados macroscopicamente. O peso relativo dos órgãos foi calculado por peso do órgão/peso corporal x 100. Fragmentos teciduais foram coletados e fixados em formalina tamponada 10%, processados pelos métodos de rotina histológica, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) e avaliados histologicamente. Os sítios de implantação no útero foram avaliados para calcular perdas pós implantação.

Parâmetros reprodutivos maternos. Foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas: taxa de natalidade $[(N^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos} / N^\circ \text{ de filhotes nascidos}) \times 100]$; taxa de viabilidade $[(N^\circ \text{ de filhotes vivos até dia 4 pós-parto} / N^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}) \times 100]$; taxa de perdas pós-implantação $[(N^\circ \text{ de sítios de implantação} - N^\circ \text{ de fetos nascidos}) / N^\circ \text{ de sítios de implantação}] \times 100$. Além dessas variáveis foram avaliadas duração da gestação em dias, número de fetos por progênie, peso médio ao nascer e ao desmame e proporção de machos e fêmeas por progênie (Müller et al. 2013).

Comportamento materno em caixa moradia. Avaliação baseada em Arrati et al. (2006), Champagne et al. (2003), Pereira e Ferreira (2006), Souza et al. (2010) e Souza et al. (2012). Comportamento foi observado nos dias pós-parto 1, 5 e 10, durante o ciclo claro e antes do tratamento materno. A rata lactante foi removida da caixa moradia e o ninho foi destruído. Os filhotes foram distribuídos no lado oposto ao ninho desfeito e após 1 minuto a mãe foi recolocada na caixa. O comportamento materno foi registrado durante 25 minutos. Foram avaliados: tempo da mãe envolvida em lamber os filhotes; tempo dispensado na construção do ninho; qualidade do novo ninho (em escore que varia de 0 a 3, onde 0 significa ausência e 3 significa ninho com paredes altas e progênie agrupada); e tempo dispensado na amamentação e cuidados com a progênie.

Parâmetros reprodutivos da progênie. A partir do dia 65 pós-parto, um macho e uma fêmea de cada ninhada, selecionados aleatoriamente, foram submetidos à eutanásia conforme o procedimento com as progenitoras. Foram feitas coletas de amostra sanguínea a partir de venopunção da veia cava caudal sob visualização direta. O sangue foi armazenado em tubos siliconizados sem anticoagulante e após a retração do coágulo foi centrifugado por 15 minutos a 2500rpm, para obtenção de soro. Foi realizado doseamento hormonal de testosterona em kit diagnóstico (Testosterone ELISA, IBL International GMBH). Rins, fígado, baço e coração foram removidos e avaliados em relação alterações macroscópicas. Os órgãos sexuais testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal (livre de conteúdo) foram removidos. A massa destes órgãos também foi mensurada, exceto os ductos deferentes, e relacionada com a massa corporal. Após a remoção da túnica albugínea e dos vasos principais de cada um dos testículos, os mesmos foram triturados e homogeneizados em 10mL de solução de NaCl 0,9% contendo 0,5% de Triton X-100, em homogeneizador tecidual Fisaton 720® a uma velocidade de 600 rpm, durante 1 minuto. Cem microlitros do macerado homogeneizado de cada testículo foram diluídos em 900µl de solução de NaCl 0,9% e acondicionados em *eppendorfs* individuais. A cauda de cada um dos epidídimos foi macerada, homogeneizada e diluída de forma semelhante ao realizado com os testículos. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer do número total de espermatozoides da cauda do epidídimo e do número de espermátides do testículo. Para o cálculo do número total de espermátides ou espermatozoides foi multiplicada a contagem obtida por 10^6 (diluição) e por 1,25 (fator da câmara). Para o cálculo da produção diária, o número total foi dividido por 6,1 (Robb et al. 1978; Amann 1982, Hollenbach et al. 2010, Hollenbach et al. 2015). Para avaliação morfológica dos espermatozoides, um ducto deferente de cada animal foi lavado com 0,5mL de solução de NaCl 0,9%, para obtenção de uma suspensão de espermatozoides. Uma gota da suspensão foi misturada a uma gota de eosina 2% para preparação do esfregaço em lâmina. Foram avaliados 200 espermatozoides por animal em microscópio óptico (40x) para determinação do percentual de defeitos de cabeça e/ou cauda espermática. Para avaliação histopatológica, um testículo e um epidídimo por grupo foi fixado em formol 10% e os órgãos coletados foram fixados com solução de formalina tamponada.

Comportamento em campo aberto. A metodologia foi baseada em Sandini et al. (2014), Ponchio et al. (2015), Laureano-Melo et al. (2015) com algumas adequações. O teste avaliou variáveis comportamentais de um macho por progênie aos 75 dias de idade, colocado individualmente em uma caixa de madeira de 1m² com paredes de 50cm de altura e base dividida em quadrantes de 20cm² (total de 25 quadrados). Cada animal foi colocado, delicadamente, em um dos cantos, virados para a parede da caixa e seu comportamento foi registrado durante 5 minutos. Foram analisadas as atividades: locomotora exploratória (caracterizada pela locomoção total e permanência no centro) e levantar-se ou “rearing” (permanecer sobre duas patas traseiras investigando o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais). O número de ações de autolimpeza e de bolos fecais também foram registrados. No início e entre os testes, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%.

Comportamento sexual. Cada macho aos 100 dias recebeu em sua caixa moradia uma fêmea do mesmo grupo experimental, não consanguínea, identificada como em estro. As atividades do casal foram registradas durante 25 minutos. As variáveis avaliadas foram: latência para a primeira monta incompleta, primeira intromissão, primeira ejaculação e monta pós-ejaculação; número de montas incompletas e intromissões até a ejaculação; número total de ejaculações; e total de montas nos 25 min. (Rodrigues-Alves et al. 2008).

Análise estatística. Variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Bonferroni ou Newman-Keuls, quando necessário. Variáveis qualitativas serão avaliadas através do teste Qui-quadrado. Nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição de progênie a substâncias químicas enquanto na vida uterina ou durante a lactação pode trazer prejuízos diretos ao desenvolvimento de diversas características físicas, comportamentais ou sexuais dos filhotes. Por outro lado, também pode causar alterações no comportamento materno ou induzir toxicidade materna que causará lesões indiretamente aos

filhotes. Em alguns casos, como extrato de *Trichilia catigua* (catuaba) há redução na fertilidade das fêmeas adultas, mas nenhum dano nos filhotes machos (Santos et al. 2015).

Os resultados do presente estudo permitem identificar as alterações induzidas direta ou indiretamente pelo tratamento materno com Omeo e compostos majoritários sobre os parâmetros reprodutivos e comportamentais dos filhotes.

Resultados relacionados aos parâmetros reprodutivos das fêmeas progenitoras são apresentados na Tabela 1. Fêmeas dos grupos 300mg/kg Omeo e 52mg/kg terpinen-4-ol não gestaram. As taxas de natalidade e de viabilidade, peso médio dos filhotes ao nascer e ao desmame não foram afetados pelo tratamento com 33mg/kg, 100mg/kg Omeo ou γ -terpinene. Assim como a proporção de machos e fêmeas por progênie. A taxa de perda pós implantação do grupo γ -terpinene foi reduzida em relação aos outros grupos. Duração prolongada da gestação foi observada no grupo 100mg/kg Omeo, bem como significativa redução no número de fetos por progênie.

A administração de 33mg/kg, 100mg/kg ou 300mg/kg de Omeo, 77mg/kg γ -terpinene ou 52mg/kg terpinen-4-ol, não induziu morte ou sinais de toxicidade sistêmica nas fêmeas tratadas. Com relação a ingestão de água e alimento pelas mães, não foi observada diferença estatística. Houve aumento no ganho de peso no grupo 33mg/kg Omeo e 77mg/kg γ -terpinene antes e durante acasalamento, como demonstrado na Tabela 2, mas nenhuma diferença entre os grupos durante o período de lactação. Também podem ser observados os resultados para peso relativo de órgãos, onde os grupos 33mg/kg Omeo, 77mg/kg γ -terpinene, 52mg/kg terpinen-4-ol apresentaram diferença significativa em comparação com o Controle negativo no peso relativo dos rins e fígado. Nenhuma alteração histopatológica foi observada nos órgãos das fêmeas tratadas.

Com relação ao comportamento materno, ratas lactantes que receberam 100mg/kg Omeo diminuíram o tempo envolvido na construção do ninho durante os dias avaliados (PPD1 $p=0,0059$; PPD5 $p=0,0024$; PPD10 $p=0,0046$) (Fig. 1A). Também foi observada redução na qualidade do ninho dessas mães (PPD1 $p=0,0139$; PPD5 $p=0,0003$; PPD10 $p=0,0188$) (Fig. 1B). As mães avaliadas não apresentaram alteração no comportamento de lambear o corpo e região anogenital dos filhotes (PPD1 $p=0,6293$; PPD5 $p=0,8828$; PPD10 $p=0,1128$) (Fig. 2A). Resultados do comportamento de amamentação e cuidados com a progênie, incluindo posição arqueada, posição “cobertor” ou postura passiva são apresentados na Figura 2B. Houve aumento com diferença significativa no tempo dispensado nesse comportamento em todos os grupos no PPD 1 em comparação com o Controle negativo (PPD1 $p=0,0093$). Não foi observada alteração significativa no PPD5 ($p=0,1453$) ou no PPD10 ($p=0,0697$).

O comportamento materno é uma ferramenta de avaliação de toxicidade materna induzida por agentes externos, incluindo substâncias com potencial farmacológico (Vilela et al. 2011, Vilela et al. 2014, Santos et al. 2015). A redução no comportamento materno relacionado às atividades de construção e qualidade do ninho na dose 100mg/kg Omeo poderia estar relacionado a uma ação em sistema nervoso central sugerida em diferentes estudos, uma vez que os marcadores de capacidade de resposta materna, amamentação e cuidados com a progênie, permaneceram inalterados (Pereira et al. 2005, Agrati et al. 2008).

Na Ásia e África, extratos de *O. majorana* também são utilizados como sedativo e neurotônico (Raafat et al. 2013). Em aromaterapia, Omeo tem apresentado efeitos indutores do sono em mulheres com pobre ou boa qualidade de sono (Jung e Choi 2012). O óleo essencial de *Centella asiatica* (Umbelliferae) utilizada na medicina Chinesa em casos de exaustão física ou mental e para restaurar juventude, memória e longevidade também possui em sua composição o monoterpeneo γ -terpinene (Howes and Houghton, 2003). Derivados de monoterpeneos com estrutura similar ao γ -terpinene também tem apresentado atividade no sistema nervoso central, incluindo efeitos sedativo, antidepressivo e antinociceptivo (Passos et al. 2009). No entanto, o composto γ -terpinene de maneira isolada não induziu diferença no comportamento materno. Além disso, os parâmetros maternos indicam que a dose 100mg/kg Omeo pode induzir alterações no desenvolvimento gestacional, pela redução no número de filhotes da progênie e pelo prolongamento da gestação, sugerindo que essa dose induz toxicidade reprodutiva.

Os efeitos do tratamento materno sobre parâmetros reprodutivos das progênies são apresentados na Tabela 3. Há um retardo no desenvolvimento da característica sexual de separação prepucial nos machos de progênies do grupo 100mg/kg em relação ao Controle negativo, e aumento no peso dos machos no dia da separação prepucial. No entanto, parâmetros espermáticos e dosagem hormonal de testosterona não apresentaram diferença entre os grupos. A característica de abertura vaginal das fêmeas das progênies também não mostrou alteração.

Análise histopatológica dos órgãos de filhotes machos e fêmeas não identificou nenhuma alteração em órgãos sistêmicos ou sexuais.

Resultados da atividade sexual dos filhotes machos que receberam 33mg/kg, 100mg/kg Omeo ou γ -terpinene pré e pós-natal durante lactação são apresentados na Tabela 4. Não houve diferença significativa nas latências de primeira monta, primeira intromissão, primeira ejaculação ou monta pós-ejaculação. A frequência dessas ocorrências também não difere entre os grupos e o Controle negativo. Avaliação através do teste de campo aberto indica que não há diferença no comportamento dos filhotes machos em relação ao Controle negativo quando colocados na caixa. Não há diferença estatística nas atividades exploratórias.

Importante considerar que a redução no número de filhotes na progênie pode estar relacionada ao tratamento dos progenitores pais, uma vez que já temos reportado que em doses de 100mg/kg Omeo, há uma redução nas taxas reprodutivas de machos Wistar (Dantas et al. 2014). Da mesma forma, grupos 52mg/kg terpinen-4-ol e 300mg/kg Omeo não apresentaram nenhuma fêmea prenha para que fosse acompanhado o desenvolvimento da progênie. Nesse caso, cabem maiores estudos avaliando se a infertilidade é causada apenas pelos machos progenitores ou as fêmeas também apresentam redução na capacidade reprodutiva com esses tratamentos.

CONCLUSÃO

O presente estudo indica que o óleo essencial de *Origanum majorana* na dose 33mg/kg e seu composto majoritário γ -terpinene (77mg/kg) não induzem toxicidade materna caracterizada por alterações físicas na progenitora. Por outro lado, a dose 100mg/kg Omeo altera o comportamento materno, aqui observado pela redução no tempo dispendido na construção do ninho. O número de filhotes por progênie e a duração da gestação também são alterados por esse tratamento.

O tratamento de fêmeas durante gestação e lactação com 100mg/kg Omeo induz alteração nas características sexuais de filhotes machos, retardando a separação prepucial. No entanto, não altera demais parâmetros reprodutivos da progênie, nem interfere no comportamento dos filhotes. A dose 33mg/kg Omeo e seu composto majoritário γ -terpinene (77mg/kg) não induzem alterações importantes no desenvolvimento pré e pós-natal.

Concluindo, a administração de altas doses de Omeo deve ser evitada em fêmeas em período gestacional e lactação por induzir efeitos no desenvolvimento da progênie.

Agradecimentos. Projeto financiado pelo CNPq (Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, Phd).

Referências

- Agrati, D, Zuluaga, MJ, Fernández-Guasti, A, Meikle, A, Ferreira, A, 2008. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and Behavior*. 53, 232-240.
- Alizadeh, A, Khosh-khui, M, Javidnia, K, Firuzi, OR, Jokar, SM, 2011. Chemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*. 5, 2326-2331.
- Amann, RP, 1982. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology*. 2, 13-25.
- Busatta, C, Vidal, RS, Popiolski, AS, Mossi, AJ, Dariva, C, Rodrigues, MRA, Corazza, FC, Corazza, ML, Vladimir Oliveira J, Cansian, RL, 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25, 207-211.
- Dantas, AS, Dafré, JC, Barroco, CA, Santos, LD, Klein-Júnior, LC, Leite Filho, RV, Driemeier, D, Mello, FB, Mello, JRB, 2014. Evaluation of fertility in rats treated with different concentrations of *Origanum majorana* essential oil. *Simpósio de Pesquisa em Medicina Veterinária 2014*. Viçosa, MG, Brasil. Disponível em: <http://www.simposiovet2014.blogspot.com.br/>. Acesso em 01 fev. 2016.

- El-Ashmawy, IM, Saleh, A, Salama, OM, 2007. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101, 320-327.
- Hollenbach, CB, Bing, RS, Stedile, R, Mello, FPS, Schuch, TL, Rodrigues, MRA, Mello, FB, Mello, JRB, 2015. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43:1295-1301.
- Hollenbach, CB, Bortolini, CE, Batista, JM, Hollenbach, EB, Schuch, TL, Pacheco, MH, Mello, FB, Mello, JRB, 2010. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(4), 845-852.
- Howes, MJR, Houghton, PJ, 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75, 513-527.
- Jun, WJ, Han, BK, Yu, KW, Kim, MS, Chang, IS, Kim, HY, 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*. 75, 439-444.
- Jung, HN, Choi, HJ, 2012. Effects of *Origanum majorana* essential oil aroma on the electroencephalograms of female young adults with sleep disorders. *Journal of Life Science*. 22, 1077-1084. DOI : <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.8.1077>.
- Laureano-Melo, R, Império, GE, Silva-Almeida, C, Kluck, GEG, Seara, FAC, Rocha, FF, Silveira, ALB, Reis, LC, Ortega-Carvalho, TM, Côrtes, WS, 2015. Sodium selenite supplementation during pregnancy and lactation promotes anxiolysis and improves mnemonic performance in wistar rats offspring. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 138, 123-132.
- Lemônica, IP, 2008. Toxicologia da Reprodução. In: Oga, S, Camargo, MMA, Batistuzzo, JAO. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, SP, Brasil: Atheneu Editora. p.103-113.
- Müller, JC, Boareto, AC, Lourenço, ELB, Zaia, RM, Kienast, MF, Spercoski, KM, Morais, RN, Martino-Andrade, AJ, Dalsenter, PR, 2013. In Utero and Lactational Exposure to Fluoxetine in Wistar Rats: Pregnancy Outcomes and Sexual Development. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 113, 132-140.
- OECD 414, 2011. Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: 10.1787/9789264070820-en.
- Passos, CS, Arbo, MD, Rates, SMK, Von Poser, GL, 2009. Terpenoids with activity in the Central Nervous system (CNS). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19, 140-149.
- Pereira, M, Ferreira, A, 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural Brain Research*. 175, 139-148.
- Ponchio, RA, Teodorov, E, Kirsten, TB, Coelho, CP, Oshiro, A, Florio, JC, Bernardi, MM, 2015. Repeated methylphenidate administration during lactation reduces maternal behavior, induces maternal tolerance, and increases anxiety-like behavior in pups in adulthood. *Neurotoxicology and Teratology*. 50, 64-72.
- Prakash, B, Singh, P, Kedia, A, Dubey, NK, 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*. 49(1), 201-208.
- Raafat, K, Jassar, H, Aboul-Ela, M, El-Lakany, A, 2013. Protective effects of *Origanum majorana* L. against neurodegeneration: fingerprinting, isolation, and in vivo glycine receptors behavioral model. *International Journal of Phytomedicine*. 5, 46-57.
- Ramos, S, Rojas, LB, Lucena, ME, Meccia, G, Usubillaga, A, 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum majorana* L. essential oil from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*. 23, 45-49.
- Rezaie, A, Mousavi, G, Nazeri, M, Jafari, B, Ebadi, A, Ahmadeh, C, Habibi, E, 2011. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. *Research Journal of Biological Sciences*. 6, 611-614.

- Robb, GW, Amann, RP, Killian, GJ, 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54, 103-107.
- Roby, MHH, Sarhana, MA, Selima, KAH, Khalela, KI, 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43, 827-831.
- Rodrigues, MRA, Caramão, EB, Arce, L, Ríos, A, Valcárcel, M, 2002. Determination of monoterpene hydrocarbons and alcohols in *Majorana hortensis* Moench by micellar electrokinetic capillary chromatographic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4215-4220.
- Rodrigues-Alves, PSB, Lebrun, I, Flório, JC, Bernardi, MM, Spinosa, HS, 2008. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. *Research in Veterinary Science*. 84, 100–106.
- Sandini, TM, Udo, MSB, Reis-Silva, TM, Bernardi, MM, Spinosa, HS, 2014. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 36, 53–63.
- Santim, R, 2013. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da Família Lamiaceae. Tese de doutorado. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Santos, AH, Ramos, AC, Silveira, KM, Kiss, ACI, Longhini, R, Diniz, A, Mello, JCP, Gerardin, DCC, 2015. The exposure to *Trichilia catigua* (cauaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. *Journal of Ethnopharmacology*. 166, 86-91.
- Sousa, FL, Lazzari, V, Azevedo, MS, Almeida, S, Sanvitto, GL, Lucion, AB, Giovenardi, M, 2010. Progesterone and maternal aggressive behavior in rats. *Behavioural Brain Research*. 212, 84–89.
- Souza, MA, Szawka, RE, Centenaro, LA, Diehl, LA, Lucion, AB, 2012. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology & Behavior*. 105, 850-855.
- Vági, E, Simándi, B, Suhajda, Á, Héthelyi, É, 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*. 38, 51-57.
- Vilela, FC, Giusti-Paiva, A, 2011. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. *Endocrinology*. 152 (12), 4838-4845.
- Vilela, FC, Giusti-Paiva, A, 2014. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. *Behavioural Brain Research*. 263, 190-197.

Tabela 1. Efeitos do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários sobre parâmetros reprodutivos das fêmeas submetidas a tratamento

	Controle Negativo	γ -terpinene	Terpinen-4-ol	<i>Origanum majorana</i>		
				33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
Progenitoras (fetos) (n)	22 (216)	23 (231)	0 (0)	12 (127)	6 (37)	0 (0)
Dias de gestação	22,0 \pm 0,2	21,71 \pm 0,4	-	21,9 \pm 0,2	22,5 \pm 0,5*	-
Perda pós implantação (%)	7,45 \pm 6,0	2,2 \pm 3,3*	-	7,3 \pm 6,7	9,7 \pm 9,7	-
Taxa de natalidade (%)	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	-	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	-
Fetos por progênie (n)	9,8 \pm 1,7	10,0 \pm 2,0	-	10,6 \pm 1,8	6,2 \pm 1,8*	-
Peso médio ao nascer (g)	6,6 \pm 0,3	6,8 \pm 0,3	-	6,7 \pm 0,5	7,2 \pm 0,2	-
Peso médio ao desmame (g)	43,1 \pm 1,8	46,8 \pm 2,7	-	45,6 \pm 2,4	44,4 \pm 7,9	-
Taxa de viabilidade (%)	100,0 \pm 0,0	97,8 \pm 5,0	-	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	-
Proporção macho/fêmea	0,99:1	0,89:1	-	1,15:1	0,89:1	-

Resultados quantitativos são expressos como Média \pm SEM e analisados por ANOVA. Resultados qualitativos são expressos como percentual e analisados por Qui-quadrado. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$).

Tabela 2. Efeitos do óleo essencial de *Origanum majorana* e compostos majoritários sobre o ganho de peso corporal (%) e peso relativo de órgãos (%) das fêmeas tratadas

	Controle Negativo	γ -terpinene	Terpinen-4-ol	<i>Origanum majorana</i>			Valor <i>p</i>
				33mg/kg	100mg/kg	300mg/kg	
Antes da gestação (ganho %)	7,48 \pm 0,04	16,74 \pm 0,05*	10,31 \pm 0,03	20,95 \pm 0,07*	8,66 \pm 0,03	12,20 \pm 0,05	0,0010
Durante gestação (ganho %)	39,12 \pm 0,05	47,98 \pm 0,04*	-	52,77 \pm 0,04*	32,70 \pm 0,06	-	<0,0001
Durante lactação (ganho %)	11,74 \pm 0,03	10,87 \pm 0,05	-	11,57 \pm 0,04	9,50 \pm 0,04	-	0,8978
Corção (%)	0,35 \pm 0,04	0,32 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,31 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02	0,0563
Baço (%)	0,29 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	0,35 \pm 0,09	0,24 \pm 0,03	0,22 \pm 0,08	0,27 \pm 0,09	0,1806
Fígado (%)	5,40 \pm 0,48	5,16 \pm 0,19	3,82 \pm 0,21*	5,36 \pm 0,31	4,92 \pm 0,34	4,35 \pm 0,21	<0,0001
Rim Direito (%)	0,50 \pm 0,04	0,37 \pm 0,02*	0,41 \pm 0,02*	0,38 \pm 0,02*	0,47 \pm 0,02	0,44 \pm 0,04	<0,0001
Rim Esquerdo (%)	0,47 \pm 0,06	0,34 \pm 0,03*	0,39 \pm 0,03	0,37 \pm 0,03*	0,45 \pm 0,01	0,42 \pm 0,03	0,0003
Ovário Direito (%)	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,1074
Ovário Esquerdo (%)	0,03 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,0815
Útero (%)	0,16 \pm 0,07	0,09 \pm 0,02	0,21 \pm 0,07	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,19 \pm 0,05	0,1584

Resultados são expressos como Média \pm SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

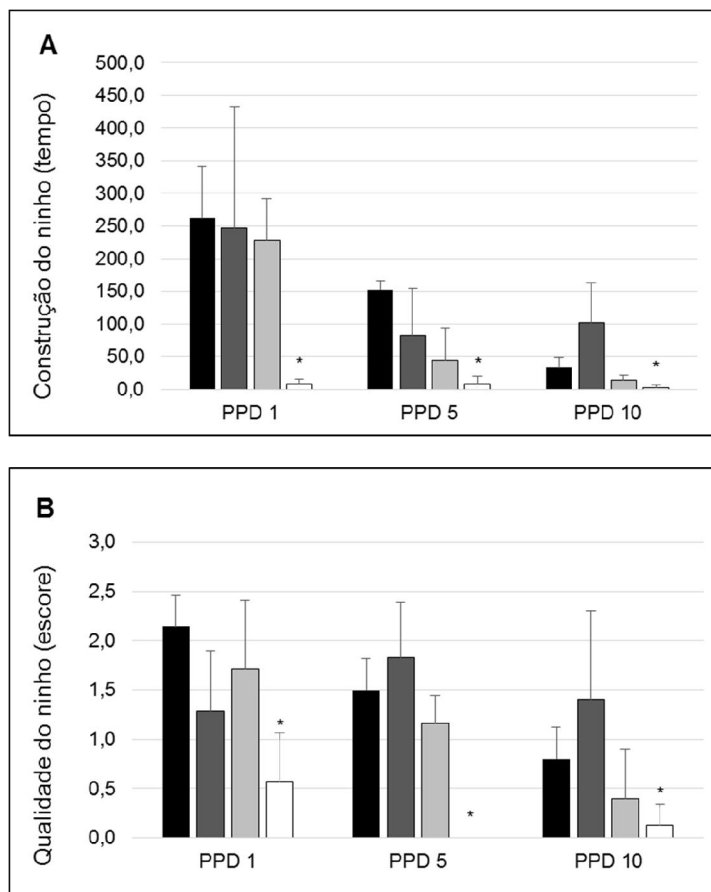


Figura 1. Comportamento materno em relação à construção e qualidade do ninho de ratas lactantes nos dias 1, 5 e 10 pós-parto (PPD1, 5 e 10). Controle Negativo: coluna preta; γ-terpinene: coluna cinza escuro; 33mg/kg Omeo: coluna cinza claro; 100mg/kg Omeo: coluna branca. (A) Tempo total dispensado na construção do ninho em segundos; (B) Qualidade do ninho ao término do tempo de observação em escore (0 significa ausência de ninho e 3 significa ninho muito bem construído). Resultados são expressos como Média \pm SEM do tempo dispensado em cada comportamento. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

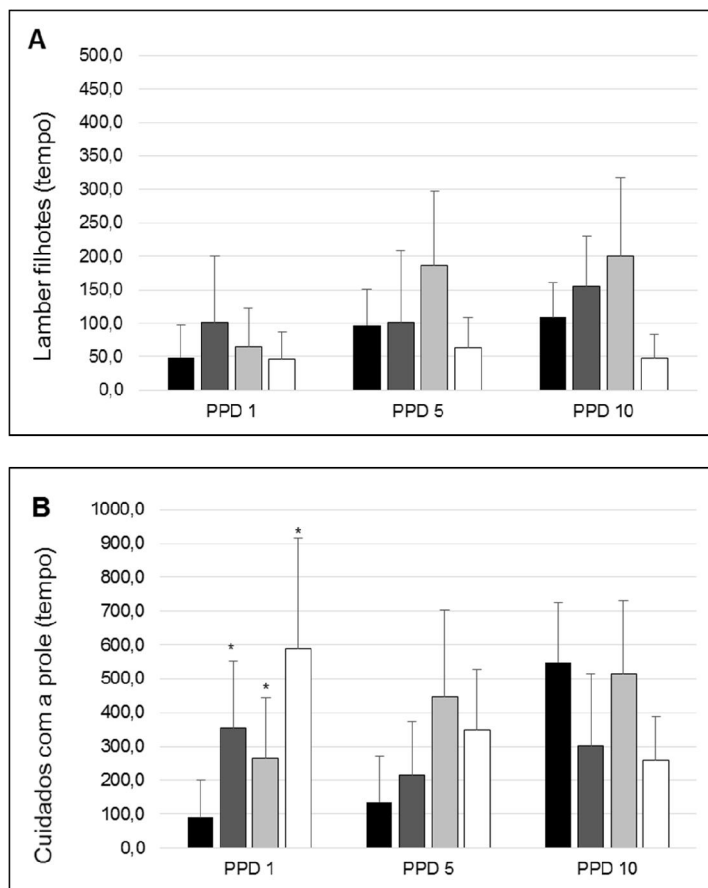


Figura 2. Comportamento materno em relação à ninhada nos dias 1, 5 e 10 pós-parto (PPD1, 5 e 10). Controle Negativo: coluna preta; γ -terpinene: coluna cinza escuro; 33mg/kg Omeo: coluna cinza claro; 100mg/kg Omeo: coluna branca. (A) Tempo total dispensado em lamber os filhotes registrados em segundos; (B) Tempo total dispensado em atividades de cuidado da prole. Resultados são expressos como Média \pm SEM do tempo dispensado em cada comportamento. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

Tabela 3. Efeitos do tratamento materno com óleo essencial de *Origanum majorana* (33mg/kg e 100mg/kg) e composto majoritário γ -terpinene (77mg/kg) sobre parâmetros reprodutivos das progênes

	Controle Negativo	γ-terpinene	Origanum majorana		Valor p
			33mg/kg	100mg/kg	
Machos					
Separação prepucial completa (dias)	43,0 ±1,1	44,5 ±3,4	43,3 ±0,9	48,3 ±1,0*	<0,0001
Peso corporal na separação prepucial (g)	191,7 ±5,1	181,1 ±15,3	181,8 ±10,8	211,9 ±18,0*	0,0005
Número de Espermatozoides (x10 ⁶ /epidídimo)	545,5 ±92,6	528,8 ±102,5	578,8 ±176,3	507,5 ±97,5	0,8694
Produção diária (x10 ⁶ /animal)	63,9 ±14,1	65,2 ±14,1	60,0 ±13,9	70,5 ±31,1	0,8735
Anomalias espermáticas (%)	3,6 ±0,01	1,9 ±0,00	4,0 ±0,02	4,3 ±0,03	0,1864
Doseamento de Testosterona (ng/mL)	4,8 ±3,0	4,3 ±1,1	4,1 ±1,0	4,4 ±1,4	0,9577
Fêmeas					
Abertura canal vaginal (dias)	37,4 ±1,3	36,7 ±2,2	36,3 ±1,6	38,8 ±1,7	0,0733
Peso corporal na abertura vaginal (g)	130,7 ±16,4	134,9 ±3,0	124,2 ±4,1	132,4 ±5,7	0,1690

Resultados são expressos como Média \pm SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

Tabela 4. Efeitos do tratamento materno com óleo essencial de *Origanum majorana* (33mg/kg e 100mg/kg) e composto majoritário γ -terpinene (77mg/kg) sobre comportamento sexual de machos expostos no útero e durante lactação

	Controle Negativo	γ -terpinene	<i>Origanum majorana</i>		Significância <i>p</i>
			33mg/kg	100mg/kg	
Latência (min)					
Primeira Monta	0,39 \pm 0,23	0,55 \pm 0,31	0,48 \pm 0,22	0,39 \pm 0,20	0,8292
Primeira Intromissão	0,80 \pm 0,34	1,18 \pm 0,72	1,31 \pm 0,75	0,78 \pm 0,42	0,6982
Primeira Ejaculação	14,79 \pm 3,91	16,48 \pm 3,66	15,92 \pm 3,16	15,67 \pm 3,98	0,7590
Monta pós-ejaculação	18,50 \pm 3,90	19,18 \pm 3,51	19,99 \pm 3,62	18,64 \pm 4,18	0,7754
Frequência Pré-Ejaculação (n)					
Montas incompletas	16,6 \pm 5,3	16,6 \pm 7,9	10,0 \pm 6,4	18,0 \pm 5,6	0,4201
Intromissões	21,6 \pm 2,9	16,4 \pm 4,1	24,2 \pm 4,6	23,2 \pm 5,4	0,1773
Montas pré-ejaculação	38,2 \pm 7,4	33,0 \pm 9,0	34,2 \pm 9,4	41,2 \pm 10,6	0,6632
Ejaculações (n)	2,3 \pm 0,7	1,8 \pm 0,7	1,8 \pm 0,3	1,8 \pm 0,6	0,5925
Total de montas (n)	52,8 \pm 6,2	39,9 \pm 14,1	47,6 \pm 10,5	48,2 \pm 13,4	0,7876

Resultados são expressos como Média \pm SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

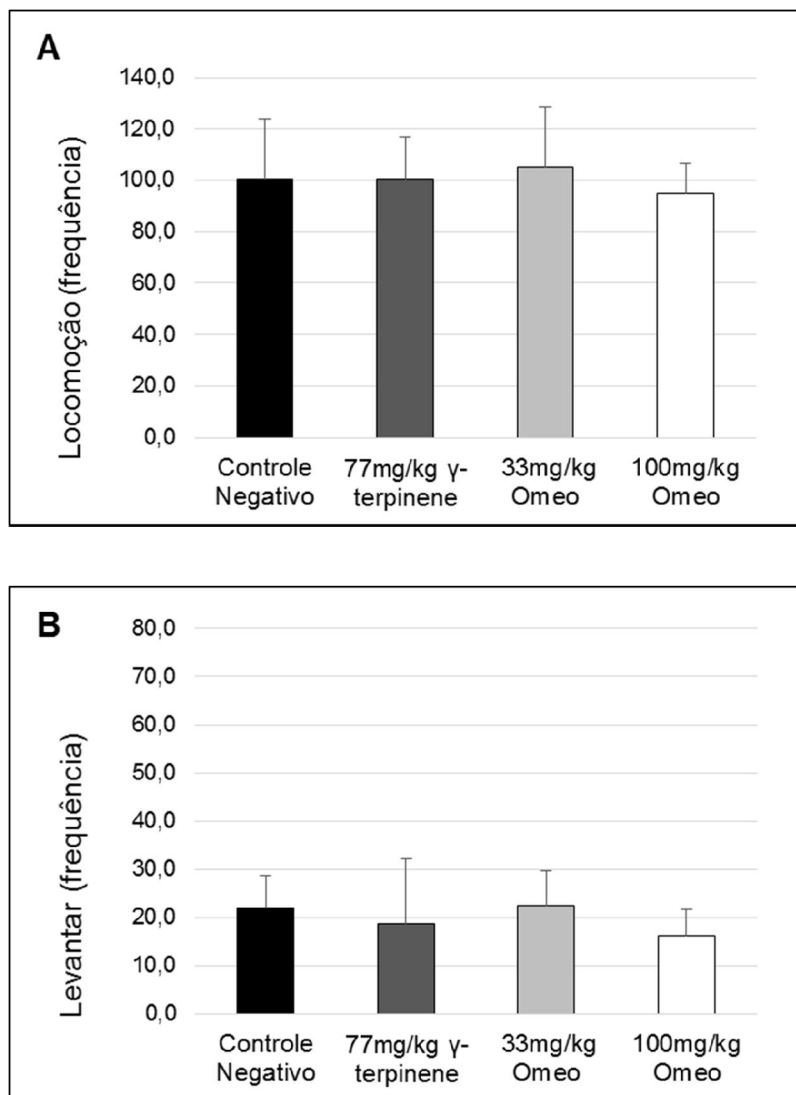


Figura 3. Comportamento de machos em teste de campo aberto. (A) Frequência de locomoção dentro da caixa; (B) Frequência da atividade de levantar-se nas patas traseiras. Resultados são expressos como Média \pm SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo Controle Negativo ($p < 0,05$; ANOVA).

ARTIGO IV

***Origanum majorana* essential oil lacks mutagenic activity in the
Salmonella/microsome and micronucleus assays**

Artigo submetido à Food and Chemical Toxicology

***Origanum majorana* essential oil lacks mutagenic activity in the
Salmonella/microsome and micronucleus assays**

Andrea dos Santos Dantas^{a,c,*}, Luiz Carlos Klein-Júnior^d, Miriana S. Machado^e,
Temenouga N. Guecheva^e, Luciana D. dos Santos^{a,c}, Régis A. Zanette^{b,c},
Fernanda B. de Mello^c, João Antonio Pêgas Henriques^e, João Roberto Braga de
Mello^{a,b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre,
RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, UFRGS, Porto
Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica - Farmacologia e Toxicologia
Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^dLaboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos,
Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^eLaboratório de Reparação de DNA em Eucariotos, Departamento de
Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Andrea dos Santos Dantas; Rua Sarmento Leite, 500,
CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; asdmedina@gmail.com.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the *in vitro* mutagenic activity of *Origanum majorana* essential oil. The most abundant compounds identified by GC-MS were γ -terpinene (25.73%), α -terpinene (17.35%), terpinen-4-ol (17.24%) and sabinene (10.8%). Mutagenicity was evaluated by the *Salmonella*/microsome test using the preincubation procedure on TA98, TA97a, TA100, TA102 and TA1535 *Salmonella typhimurium* strains, in the absence or in the presence of metabolic activation. Cytotoxicity was detected at concentrations higher than 0.04 μ L/plate in the absence of S9 mix and higher than 0.08 μ L/plate in the presence of S9 mix and no gene mutation increase was observed. For the *in vitro* mammalian cell micronucleus test, it was used V79 Chinese hamster lung fibroblasts. Cytotoxicity was only observed at concentrations higher or equal to 0.05 μ g/mL. Moreover, when tested in non-cytotoxic concentrations, *O. majorana* essential oil was not able to induce chromosome mutation. The results from this study therefore suggest that *O. majorana* essential oil is not mutagenic at the concentrations tested in the *Salmonella*/microsome and micronucleus assays.

Key words: Marjoram; genotoxicity; Ames test; Micronucleus; *in vitro* toxicity

1. Introduction

The *Origanum* genus belongs to the Lamiaceae family and includes species with interesting pharmacological effects (Abdel-Massih and Abraham, 2014). *Origanum majorana* L. or *Majorana hortensis* Moench is an aromatic plant rich in essential oils and commercially grown in southern Europe and in the Mediterranean region (El-Ashmawy et al., 2007; Ramadan et al., 2012). It is popularly known as marjoram and has been used in the form of herbal infusions in folk medicine for asthma, cold, coughs, cramps, depression, dizziness, gastrointestinal disorders, hay fever, headache, toothache and sinus congestions, and as a diuretic and to promote menstruation (El-Ashmawy et al., 2007; Ramadan et al., 2012).

O. majorana crude extract, dichloro-methane, ethyl acetate and aqueous fractions (Abdel-Massih and Abraham, 2014) and *O. majorana* essential oil (Busatta et al., 2008) have shown significant results in inhibiting the growth of bacteria and fungi (Prakash et al., 2012) and the synthesis of microbial metabolites. Because of its antioxidant effects (Jun et al., 2001; Alizadeh et al., 2011; Roby et al., 2013), *O. majorana* essential oil or extract can be used in the prevention of ageing-related diseases and central nervous system disorders (El-Ashmawy et al., 2007; Rezaie et al., 2011). *O. majorana* essential oil was also able to partially prevent the ethanol-induced decline in sperm quality, testosterone levels and in the weight of reproductive organs in male rats (El-Ashmawy et al., 2007). Previous studies have reported the potential use of *O. majorana* ethanolic extract as anticancer agent (Al Dhaheri et al., 2013; Rao et al., 2014), whereas the tea extract has been shown to have immunostimulant, antigenotoxic and antimutagenic properties (Ramadan et al., 2012; Khan et al.,

2013). These activities are attributed to the chemical composition, which is characterized as rich in flavonoids and terpenoids (Vági et al., 2005).

In spite of the growing interest in using essential oils and other extracts in the treatment of diseases, it is necessary to perform toxicological studies to ensure that the chemical compounds found in the plant under study exert no adverse effects that would impair its use for therapeutic purposes. Genetic toxicology data are employed as a surrogate for long-term carcinogenicity data during early drug development and must be conducted when there is an indication of continuous use or prolonged therapeutic treatment. The genotoxicity battery includes gene and chromosome mutation detection tests for products for human use (Kirklander et al., 2011; ICH S2 (R1), 2011).

Therefore, this study was performed to investigate the mutagenic activity of *O. majorana* essential oil using five strains of bacteria in the *Salmonella*/microsome test, with or without metabolic activation, and in the *in vitro* mammalian cell micronucleus test using Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). Essential oil chemical characterization was also performed to identify the major components of the oil.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Diethyl ether was acquired from Tedia Company, Inc. (Fairfield, OH, USA). Aflatoxin B₁ (CAS 1162-65-8), 2-aminofluorene (CAS 153-78-6), 4-nitroquinoline-oxide (CAS 56-57-5), sodium azide (CAS 26628-22-8), colchicine (CAS 64-86-8), etoposide (CAS 33419-42-0), cytochalasin B (14930-96-2), dimethyl sulfoxide

(DMSO) (CAS 67-68-5), glucose-6-phosphate (CAS 56-73-5) and NADH (CAS 606-68-8) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). The Aroclor 1254 induced male Sprague Dawley rat liver S9 fraction was obtained from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Sample and analysis by GC-MS

O. majorana dried leaves, acquired from Luar Sul Company (Santa Cruz do Sul, RS, Brazil) with an Egyptian Certificate of Origin and free of macroscopic contaminants, were used. The essential oil was obtained by steam distillation using a modified Clevenger device. The GC-MS was carried out on a Shimadzu mass spectrometer (GC/MS-QP5000) connected with cylindrical quadrupole and operated at 70 eV ionization energy. An apolar Durabond-DB5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) was used. To confirm the identity of the compounds, a polar column was also used (LM-120). The temperature was programmed from 60 to 300 °C at 3 °C/min and the injector and detector temperatures were set at 220 °C and 250 °C, respectively. GC-FID was used for quantification (Limberger et al., 2004; Simões-Pires et al., 2005). The relative composition of the oils was obtained by electronic integration and the identification of the compounds was based on comparison to retention indices, determined relatively to the retention times of an homologous series of n-alkanes, and mass spectra of commercial database (NIST) and literature (Adams, 2007).

2.3 Bacterial and mammalian strains

Salmonella typhimurium strains TA98, TA97a, TA100, TA102 and TA1535 were obtained from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA). *Chinese hamster lung fibroblast* V79 cells were obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). V79 cells were chosen in this study because this cell line is largely adopted in cytogenetic assays mainly because of its stable karyotype and relatively short cellular cycle, varying between 12 and 16 h (Bradley et al., 1981).

2.4 Salmonella/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the preincubation procedure with and without metabolic activation in five strains of *S. typhimurium*. The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames (Maron and Ames, 1983). Briefly, 100 μ L of test bacterial cultures ($1-2 \times 10^9$ cells/mL) were incubated at 37 °C with different concentrations of *O. majorana* essential oil in the presence or absence of S9 mix for 20-30 min, without shaking. Subsequently, 2 mL of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 μ M histidine, 50 μ M biotin, pH 7.4, 42 °C) were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose).

Aflatoxin B₁ (1 μ g/plate) was used as positive control in the presence of metabolic activation (with S9 mix) for TA97a, TA98 and TA100 strains, and 2-aminofluorene (2-AF, 10 μ g/plate) for TA102 and TA1535 strains. In the absence of metabolic activation, 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO, 0.5 μ g/plate) was used for TA97a, TA98 and TA102 strains, and sodium azide (1 μ g/plate) for TA100 and TA1535

strains. Plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting the revertant colonies.

2.5 *In vitro* mammalian cell micronucleus test (MNvit)

V79 cells were cultivated in standard conditions with high glucose DMEM medium supplemented with inactivate 10% FBS and antibiotics. Cells were maintained in 25 cm² culture bottles at 37 °C and humid atmosphere with 5% CO₂. For harvesting and culture establishment, PBS (phosphate buffer saline) and trypsin-EDTA were used. For the experiments, *O. majorana* essential oil was diluted in DMSO and further diluted in DMEM culture medium obtaining different concentrations in which 5 µL/mL was used as the highest test concentration. This concentration was chosen considering the extract solubility in the culture medium and the OECD suggestion for mutagenesis analysis (OECD 487, 2010). The final concentration of DMSO in the cultures was 0.5%.

Thus, to verify the potential mutagenic effects of *O. majorana* essential oil, the MNVit assay was performed as described by OECD 487 (2010) and Gonçalves et al. (2014), with minor modifications. For this, 1 x 10⁵ V79 cells were seeded per well in 6-well plates and exposed to 0.003125, 0.00625, 0.0125 and 0.025 µL/mL of *O. majorana* essential oil for 3 or 21 h. 0.5% DMSO was used as negative control and 0.75 µg/mL colchicine and 0.250 µg/mL etoposide were used as positive controls. In the 3 h treatment experiments, the medium was removed after treatment and replaced with fresh medium containing 3 µg/mL cytochalasin B to block the cytokinesis and then incubated for 21 h (period corresponding to 1.5 – 2 normal cell cycles). In the 21 h treatment experiments, cultures were exposed to *O. majorana* essential oil in the presence of

cytochalasin B. In both experiments, after the cytochalasin incubation the cells were incubated in hypotonic solution (KCl 0.075M) for 3 min at 4 °C, pre-fixed and fixed with methanol and acetic acid (3:1) solution. This process was repeated and the cells were stored at 4 °C overnight. Fixed cells were dropped on to microscope slides and stained with 2% Giemsa. The slide analysis was performed by means of a semi-automated scoring PathFinder Screen Tox system (IMSTAR, France) (Decordier et al., 2011) or manually scored in optical microscope. It is important to note that the semi-automated scoring was previously validated in the laboratory demonstrating high correlation with the manual scoring results. Thus, for the analysis, the cell viability was first evaluated by the replication index (OECD 487, 2010). For this, the number of mononucleated, binucleated and multinucleated cells were counted in 500 cells/slide (manual analysis) or in all cells localized in a pre-selected area by slide (semi-automated analysis). For the analysis of micronucleus formation, at least 500 binucleated cells were considered for the presence of micronucleus, totalizing around 3000 cells per test group (two slides per treatment well, three wells per treatment group) when manual scoring was used. In the semi-automated scoring, the system identified in a pre-selected area the number of binucleated cells and the number of binucleated cells with micronucleus. Then, the technician confirmed the real presence of micronuclei in each binucleated cell previously identified by the software.

2.6 Statistical analysis

The results of the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay were analyzed using by the *Salmonella* Assay Software (Environmental Monitoring System

Laboratory, EPA - Software version 2.3). This program allows assessment of the dose-response effect by calculating the analysis of variance (ANOVA) between the measurements of the average number of revertants tested at different concentrations and the average number of revertants per plate from the negative control (mutagenicity index - MI). A test substance was considered mutagenic when significant dose response and ANOVA variance were observed, and the increase in the mean number of revertants on test plates was at least two-fold higher than that observed in the negative control plates (or $MI \geq 3$ for TA1535 strain).

In the MNvit test, all experiments were independently repeated at least three times, with duplicate samples for each treatment. The results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test or Student *t* Test when needed by using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1 Essential oil characterization

The analysis of the chemical composition of samples obtained from different geographical locations indicates that the biological activity is directly related to the concentration of the essential oil components, which may vary according to the region (Bussata et al., 2008; Alizadeh et al., 2011; Jelali et al., 2011; Ramos et al., 2011). Moreover, season, climate, stage of plant development at harvest

and the technique of extraction of the product may influence on the quantity of the plant compounds (Jelali et al., 2011; Ncube et al., 2012).

Fifteen compounds were identified in the *O. majorana* essential oil (Table 1). The most abundant compounds were γ -terpinene (25.73%), α -terpinene (17.35%), terpinen-4-ol (17.24%) and sabinene (10.8%). This chemical profile is in accordance with what is reported in the literature, with some quantitative variations. Rodrigues et al. (2002) and Vági et al. (2005) also reported the presence of terpenes as the major components of the *O. majorana* essential oil. Usually, terpinen-4-ol and γ -terpinene are described as the most abundant compounds in *O. majorana* essential oil and sabinene and α -terpinene are also observed (Vági et al., 2005; Busatta et al., 2008; Alizadeh et al., 2011; Jelali et al., 2011; Ramos et al., 2011).

3.2 Evaluation of mutagenesis in bacteria

The dose range of the *O. majorana* essential oil was determined in range finding experiments using the TA100 strain, with or without S9 mix, using five serially diluted concentrations (0.008 - 5 μ L/plate), where the highest dose tested was determined by the solubility of the substance and as suggested by the Ames Test Guideline (OECD 471, 1997). Cytotoxicity (mutagenic index ≤ 0.6) was observed at concentrations higher than 0.04 μ L/plate and higher than 0.08 μ L/plate in the absence and in the presence of S9 mix, respectively (data not show). Thus, in the mutagenicity test the dose ranged between 0.0025 and 0.04 μ L/plate in the absence of S9 mix and between 0.005 and 0.08 μ L/plate in the presence of S9 mix. It can be seen in Table 2 that no mutagenic effect was detected on strains TA98 (detects frameshifts in the DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G) and TA97a

(detects frameshift mutations in -C-C-C-C-C-C-; +1 cytosine) in the presence or absence of metabolic activation. In addition, no mutagenicity was seen in the strains detecting base pair substitutions, TA1535 and its corresponding isogenic strain TA100 (detect base pair substitutions of a leucine [GAG] by proline [GGG]). Negative results were also observed in the TA102 strain, which is sensitive to oxidative and alkylating mutagens (detects transversions or transitions in TAA DNA sequences) (Maron and Ames, 1983).

3.3 Evaluation of mutagenesis in mammalian cells

The MNvit assay is a genotoxicity test for the detection of micronuclei in the cytoplasm of interphase cells (Fenech et al., 2011) and was carried out to evaluate the potential of the *O. majorana* essential oil to induce chromosome mutation. The *O. majorana* essential oil concentrations were chosen based on replication index previously analyzed at 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{L/mL}$ (Table 3), where a dose-dependent decrease in cellular viability was observed mainly in concentrations $\geq 0.05 \mu\text{L/mL}$. Moreover, 100% cytotoxicity was observed at the concentrations of 0.5 and 5 $\mu\text{L/mL}$. The analysis of micronucleus formation was performed in concentrations lower than 0.05 $\mu\text{L/mL}$ to provide the appropriate range of cytotoxicity (up to $55 \pm 5\%$).

Micronuclei may originate from acentric chromosome fragments (i.e., lacking a centromere), or whole chromosomes that are unable to migrate to the poles during the anaphase stage of cell division. The assay detects the activity of clastogenic and aneugenic chemicals in cells that have undergone cell division during or after exposure to the test substance (Fenech et al., 2011; reviewed in OECD 487, 2014). As illustrated in the Table 4, the *O. majorana* essential oil did

not decrease the cell viability after 3 h or 21 h of exposure. In relation to micronucleus formation in binucleated cells, *O. majorana* essential oil was not able to induce increase in the micronucleus frequency when compared to the negative control, in both periods evaluated (Fig. 1).

Several studies have reported that sweet marjoram leaves, especially in the form of an herbal tea, may be useful as immunostimulant and in reducing genotoxicity in patients under chemotherapeutic interventions, besides inhibiting the production of free radicals (Jun et al., 2001; Ramadan et al., 2012). Indeed, Khan et al. (2013) proposed that reducing the availability of the genotoxic metabolites of chemical carcinogens from the body, by forming more water soluble conjugates, will consequently decrease the chance of an interaction with DNA through adduct formation that may lead to cancer.

Terpinen-4-ol, one of the main compounds found in *O. majorana* essential oil, is also the main active compound of the *Melaleuca alternifolia* essential oil. Both the *M. alternifolia* essential oil and the terpinen-4-ol compound were able to induce caspase-dependent apoptosis of melanoma cells (Calcabrini et al., 2004). Gomes Carneiro et al. (2005) reported that α -terpinene was not able to induce mutagenicity in *Salmonella* strains when tested alone.

In conclusion, the findings from the present study indicated that, at the concentrations studied, *O. majorana* essential oil is not able to induce *in vitro* gene (*S. typhimurium* strains) and chromosome (V79 Chinese hamster lung fibroblast cells) mutations, respectively, contributing to the knowledge in the safe use of this essential oil. Further studies are now in progress to explore possible reproductive toxicity, teratology and development toxicology induced by *O. majorana* essential oil *in vivo*.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest involved in this study.

Acknowledgments

This work was supported by the CNPq, Brazil.

References

1. Abdel-Massih, RM, Abraham A, 2014. Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 5, 819-828.
2. Adams, RP, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatograph/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing, Carol Stream.
3. Al Dhaheri, Y, Attoub, S, Arafat, K, AbuQamar, S, Viallet, J, 2013. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of *Origanum majorana* on highly metastatic human breast cancer cells: Inhibition of NF κ B signaling and reduction of nitric oxide production. *PLoS ONE*. 8, e68808.
4. Alizadeh, A, Khosh-khui, M, Javidnia, K, Firuzi, OR, Jokar, SM, 2011. Chemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*. 5, 2326-2331.
5. Bradley, MO, Bhuyan, B, Francis, MC, Langenbach, R, Peterson, A, Huberman, E, 1981. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 87, 81-142.
6. Busatta, C, Vidal, RS, Popiolski, AS, Mossi, AJ, Dariva, C, Rodrigues, MRA, Corazza, FC, Corazza, ML, Vladimir Oliveira J, Cansian, RL, 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25, 207-211.

7. Calcabrini, A, Stringaro, A, Toccaceli, L, Meschini, S, Marra, M, Colone, M, Salvatore, G, Mondello, F, Arancia, G, Molinari, A, 2004. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. 122, 349-360.
8. Decordier, I, Papine, A, Vande Loock, K, Plas, G, Soussaline, F, Kirsch-Volders, M, 2011. Automated image analysis of micronuclei by IMSTAR for biomonitoring. *Mutagenesis*. 26, 163-168.
9. El-Ashmawy, IM, Saleh, A, Salama, OM, 2007. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101, 320-327.
10. Fenech, M, Kirch-Volders, M, Natarajan, AT, Surrales, J, Crott, JW, Parry, J, Norppa, H, Eastmond, DA, Tucker, JD, Thomas, P, 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26, 125-132.
11. Gomes-Carneiro, MR, Viana, MES, Felzenszwalb, I, Paumgartten, FJR, 2005. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+)- and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 247–252.
12. Gonçalves, TS, Menezes, LM, Trindade, C, Machado, MS, Thomas, P, Fenech M, Henriques, JA, 2014. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 762, 1-8.
13. ICH S2 (R1) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. 2011.
14. Jelali, N, Dhifi, W, Chahed, T, Marzouk, B, 2011. Salinity effects on growth, essential oil yield and composition and phenolic compounds content of marjoram leaves. *Journal of Food Biochemistry*. 35, 1443–1450.
15. Jun, WJ, Han, BK, Yu, KW, Kim, MS, Chang, IS, Kim, HY, 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*. 75, 439-444.
16. Khan, JA, Jalal, JA, Ioannides, C, Moselhy, SS, 2013. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. *Toxicology and Industrial Health*. 29, 142-148.

17. Kirkland, D, Reeve, L, Gatehouse, D, Vanparys, P, 2011. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* Micronucleus Test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutation Research*. 721(1), 27-73.
18. Limberger, RP, Sobral, M, Henriques, AT, Menut, C, Bessière, J-M, 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*. 27, 916-919.
19. Maron, DM, Ames, BN, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113, 173-215.
20. Ncube, B, Finnie, JF, Van Staden J, 2012. Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 82, 11-20.
21. OECD, 1997. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. Doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
22. OECD, 2014. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. Doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224438-en>.
23. Prakash, B, Singh, P, Kedia, A, Dubey, NK, 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*. 49(1), 201-208.
24. Ramadan, G, El-Beih, NM, Zahra, MM, 2012. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. *British Journal of Nutrition*. 108, 1059-1068.
25. Ramos, S, Rojas, LB, Lucena, ME, Meccia, G, Usubillaga, A, 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum majorana* L. essential oil from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*. 23, 45-49.
26. Rao, S, Timsina, B, Nadumane, VK, 2014. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum majorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4, 389-394.
27. Rezaie, A, Mousavi, G, Nazeri, M, Jafari, B, Ebadi, A, Ahmadedh, C, Habibi, E, 2011. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect

- of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. Research Journal of Biological Sciences. 6, 611-614.
28. Roby, MHH, Sarhana, MA, Selima, KAH, Khalela, KI, 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products. 43, 827-831.
29. Rodrigues, MRA, Caramão, EB, Arce, L, Ríos, A, Valcárcel, M, 2002. Determination of monoterpene hydrocarbons and alcohols in *Majorana hortensis* Moench by micellar electrokinetic capillary chromatographic. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 4215-4220.
30. Simões-Pires, CA, Debenedetti, S, Spegazzini, E, Mentz, LA, Matzenbacher, NI, Limberger, RP, Henriques, AT, 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. Plant Systematics and Evolution. 253, 23-32.
31. Vági, E, Simándi, B, Suhajda, Á, Héthelyi, É, 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International. 38, 51-57.

Table 1. Chemical composition of the *Origanum majorana* essential oil.

Compound	RI ^a	%
α -thujene	921	3.96
α -pinene	927	1.24
Sabinene	966	10.80
Myrcene	986	2.08
α -phellandrene	1000	1.70
α -terpinene	1012	17.35
<i>o</i> -cymene	1019	2.24
β -phellandrene	1023	7.05
γ -terpinene	1053	25.73
Terpinolene	1082	3.76
N.I.	1097	1.06
Terpinen-4-ol	1174	17.24
<i>trans</i> -sabinene hydrate acetate	1248	0.13
Linalool acetate	1251	1.38
Terpinen-4-ol acetate	1293	0.88
(<i>Z</i>)-caryophyllene	1404	2.72
N.I.	1480	0.67
Total identified		96.02

^aRelative retention index experimentally determined against n-alkanes on Durabond-DB5 column

Table 2. Induction of *his*⁺ revertants in *S. typhimurium* strains by *Origanum majorana* essential oil with and without metabolic activation (S9 mix).

Substance	Concentration (µg/plate)	S. typhimurium strains									
		TA98		TA97a		TA100		TA1535		TA102	
		Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate ^a	MI ^b
Without metabolic activation (-S9)											
NC ^c	-	19.7 ± 8.2	-	69.7 ± 3.1	-	103.7 ± 6.1	-	4.3 ± 2.5	-	291.7 ± 10.5	-
Essential oil	0.0025	24.7 ± 6.4	1.03	91.7 ± 7.5	1.32	102.3 ± 9.3	0.99	4.7 ± 2.1	1.09	268 ± 12.5	0.92
	0.005	14.5 ± 3.4	0.74	84.7 ± 18.9	1.22	110.7 ± 10.5	1.07	6.3 ± 4	1.45	255.3 ± 26.5	0.88
	0.01	15.2 ± 6.2	0.77	89.3 ± 23	1.28	95.7 ± 15.6	0.92	2 ± 0	0.46	253 ± 46.5	0.87
	0.02	10.5 ± 2.3	0.53	71.7 ± 15.5	1.03	75.5 ± 30.4	0.73	4 ± 1.7	0.92	174.7 ± 15.6	0.60
	0.04	9.2 ± 2.5	0.47	72 ± 13.1	1.03	41.7 ± 4	0.40	1.3 ± 1.2	0.31	111.3 ± 9.1	0.38
PC ^d	0.5 (4NQO)	332 ± 22.6***	20.68	464.3 ± 91.8***	6.66	-	-	-	-	1031 ± 93.5***	3.54
	1 (NaN ₃)	-	-	-	-	427.3 ± 31.2***	4.12	312.3 ± 9***	72.13	-	-
With metabolic activation (+S9)											
NC ^c	-	15.3 ± 1.5	-	100.7 ± 9.9	-	179.7 ± 11.1	-	9.3 ± 2.9	-	325.7 ± 15.5	-
Essential oil	0.005	19 ± 3.6	1.24	109.3 ± 8.5	1.09	155.7 ± 10	0.87	10.3 ± 4.5	1.1	310 ± 3.6	0.95
	0.01	23.3 ± 1.5	1.52	112 ± 20.1	1.11	141.3 ± 12.6	0.79	8 ± 3	0.86	338 ± 12.7	1.04
	0.02	15.7 ± 1.5	1.01	115 ± 10.5	1.14	135.3 ± 6.7	0.75	7.7 ± 1.5	0.83	332.7 ± 29	1.02
	0.04	21 ± 9.5	1.37	113.7 ± 8.7	1.13	112 ± 14.9	0.62	8.3 ± 3.5	0.89	301.7 ± 26	0.93
	0.08	18.7 ± 1.2	1.22	131.7 ± 10.6	1.31	99.3 ± 14	0.55	7.7 ± 2.3	0.83	295.7 ± 31.1	0.91
PC ^e	1 (AFB ₁)	1587 ± 91.1***	103.5	587 ± 88.5**	5.83	660.7 ± 59.9**	3.68	-	-	-	-
	10 (2-AF)	-	-	-	-	-	-	104.3 ± 12.1**	11.18	767.3 ± 53.6***	2.36

^aNumber of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; ^bMI: mutagenic index (n° of *his*⁺ induced in the sample/n° of spontaneous *his*⁺ in the negative control); ^cNegative control: DMSO (10 µl) used as solvent for the extract; ^dPositive control (-S9): NaN₃ (sodium azide) to TA100 and TA1535 and 4-NQO to TA97a, TA98 and TA102; ^ePositive control (+S9): AFB₁ (aflatoxin B₁) for TA97a, TA98 and TA100 and 2-aminofluorene for TA102 and TA1535; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, in relation to the negative control.

Table 3. Replication index of cultures exposed to *Origanum majorana* essential oil.

Substance	Concentration	Replication Factor (mean \pm S.D.)	Replication Index (%)
NC ^a	-	0.809 \pm 0.012	100
	0.0005 μ L/mL	0.823 \pm 0.027	101.69
Essential oil	0.005 μ L/mL	0.800 \pm 0.035	98.93
	0.05 μ L/mL	0.126 \pm 0.028	15.54
	0.5 μ L/mL	0 \pm 0	0
	5 μ L/mL	0 \pm 0	0

^aNegative control: DMSO (0.5%).

Table 4. Replication index of cultures exposed to *Origanum majorana* essential oil for 3 h or 21 h.

Substance	Concentration	3 h		21 h	
		Replication Factor (mean \pm S.D.)	Replication Index (%)	Replication Factor (mean \pm S.D.)	Replication Index (%)
NC ^a	-	0.726 \pm 0.021	100	0.820 \pm 0.050	100
Essential oil	0.003125 μ L/mL	0.735 \pm 0.019	101.29	0.822 \pm 0.036	100.28
	0.00625 μ L/mL	0.698 \pm 0.021	96.14	0.809 \pm 0.014	98.62
	0.0125 μ L/mL	0.731 \pm 0.012	100.69	0.837 \pm 0.027	102.07
	0.025 μ L/mL	0.722 \pm 0.031	99.49	0.769 \pm 0.024	93.74
Colchicine ^b	0.75 μ g/mL	0.501 \pm 0.013	69.04	-	-
Etoposide ^b	0.25 μ g/mL	-	-	0.767 \pm 0.028	93.58

^aNegative control: DMSO (0.5%); ^bPositive control.

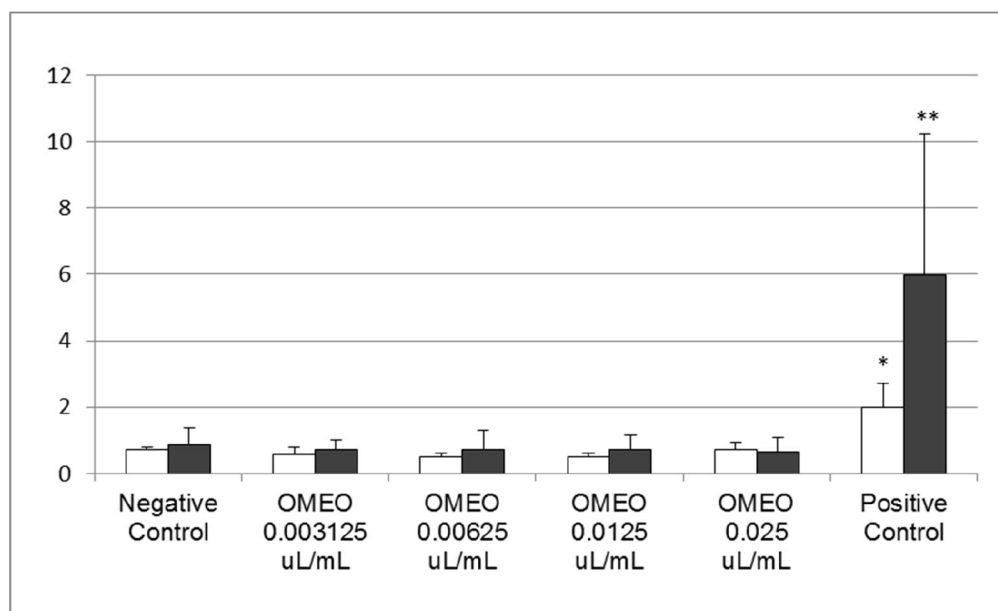


Figure 1. Micronucleus frequency of V79 cells exposed to different *O. majorana* essential oil (OMEO) concentrations for 3 h (white columns) and 21 h (black columns). Negative control: DMSO (0.5%); Positive control: Colchicine 0.75 ug/mL (3 h) and etoposide 0.25ug/mL (21 h). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, in relation to the negative control (Student t test).

5 DISCUSSÃO GERAL

Desde a antiguidade, produtos naturais são utilizados popularmente como agentes terapêuticos em diferentes patologias, quer físicas ou psíquicas. Suas propriedades empíricas são repassadas entre as gerações e seu uso disseminado a partir de experiências pessoais. Com o avanço científico, o uso popular serviu de base para descoberta de princípios ativos a partir de infusões ou extratos de plantas utilizadas com fins curativos. Além disso, as plantas podem apresentar além de propriedades medicinais, efeitos aromatizantes, conservantes, inseticidas, entre outros.

Origanum majorana L. é uma planta rica em óleos essenciais, cultivada e distribuída mundialmente, que apresenta algumas propriedades interessantes. Dependendo do local de cultivo, época de colheita e método de extração do seu óleo essencial, pode apresentar variações na sua composição. No entanto, o perfil químico do óleo essencial de *O. majorana* (Omeo) já está bem estabelecido, havendo dois quimiotipos bem definidos: um rico em terpenos (GUENTER et al., 1952, apud SOLIMAN et al., 2009) e outro rico em timol e carvacrol (FISHER et al., 1987, apud SOLIMAN et al., 2009). Essas composições tem se confirmado em estudos recentes, identificando os componentes do óleo em diferentes localidades (RODRIGUES, 2002; VÁGI et al., 2005; BUSATTA, 2006; EL-AKHAL et al., 2014). O perfil químico da amostra utilizada nesse trabalho está de acordo com o descrito por Guenter et al (1952, apud SOLIMAN et al., 2009) apresentando como compostos majoritários γ -terpinene (25,73%), α -terpinene (17,35%), terpinen-4-ol (17,24%) and sabinene (10,8%).

Em estudos *in vitro* realizados por nosso grupo de pesquisa, Santim (2013) identificou atividade antifúngica de Omeo contra *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp and *Trichosporon asahii*. Outro trabalho avaliando atividade antimicrobiana também apresenta resultado positivo de ação antifúngica *in vitro*, inclusive com atividade comparada ao cetoconazol (MATHEW e PADMANABHAN, 2015). Partindo desse potencial uso terapêutico, o presente estudo avaliou efeitos *in vitro* e *in vivo*, relacionados à toxicologia genética e reprodutiva de Omeo.

A distribuição do material genético a células filhas durante a divisão mitótica envolve eventos coordenados que vão desde a replicação do DNA até a segregação cromossômica. A manutenção da normalidade de células germinativas é vital para integridade informacional dos gametas que será repassada à próxima geração (MACHADO-SANTELLI e SIVIERO, 2008).

Quando avaliado nesse estudo sobre o ponto de vista genotóxico, Omeo apresentou resultados negativos *in vitro* para mutagenicidade gênica e cromossômica. No Ensaio *Salmonella*/microsoma, foi observada citotoxicidade na linhagem TA100 de *Salmonella thyphimurium* em doses superiores a 0,04µL/placa ou 0,08µL/placa, em ausência do sistema de metabolização ou em presença, respectivamente. Nas doses testadas de 0,0025 a 0,04µL/placa em ausência de metabolização e de 0,005 a 0,08µL/placa em presença não foi detectado efeito mutagênico em nenhuma das linhagens utilizadas. O estudo foi conduzido utilizando cinco linhagens que permitem avaliar amplamente a indução de mutagenicidade por um composto. Dessa forma, Omeo não induziu mutação do tipo substituição de pares de bases (TA1535, TA100 e TA102) ou do tipo deslocamento em quadro de leitura (TA97a e TA98).

No Teste de Micronúcleos, capaz de detectar atividade clastogênica e aneugênica de substâncias químicas (OECD 487, 2014), Omeo não foi capaz de induzir mutagenicidade cromossômica em células V79 em concentrações até 0,05µL/mL. Esses resultados são similares a estudos que indicam que *O. majorana* não induz efeitos genotóxicos e que apresenta inclusive ação inibitória contra agentes mutagênicos (QARI, 2008; AL-HARBI, 2011; RAMADAN et al., 2012).

No entanto, a administração contínua por 90 dias de Omeo nas doses de 33mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg, bem como do composto majoritário terpinen-4-ol interfere na fertilidade de ratos machos Wistar. Os efeitos prejudiciais podem ser observados pela redução nas taxas de acasalamento e alteração nos parâmetros reprodutivos. Esses efeitos parecem estar diretamente relacionados a lesões celulares nos órgãos sexuais, considerando a alta incidência de atrofia testicular. A concentração de testosterona permaneceu inalterada, e portanto, possibilitou a atividade sexual, apesar de reduzida, conforme observado pelas taxas de acasalamento.

Importante considerar que com o aumento da dose, os efeitos também são aumentados, tornando evidente a relação dose-dependente. Isso esclarece porque em baixas doses (0,16mL/kg), Omeo não apresentou prejuízo e foi inclusive capaz de prevenir danos reprodutivos induzidos pelo etanol como diminuição na qualidade de esperma, dos níveis de testosterona e do peso de órgãos reprodutivos em ratos machos (EL-ASHMAWY et al., 2007).

Com a inibição da fertilidade dos machos tratados com a dose mais alta (300mg/kg Omeo) e terpinen-4-ol, e consequente ausência de gestações, não pode ser observado o impacto na progênie desses grupos. Os filhotes machos expostos in útero e

durante a lactação à dose de 100mg/kg apresentaram retardo na separação prepucial. Essa característica poderia estar associada com efeito antiandrogênico, conforme descrito para ftalatos por Botelho (2009), no entanto, nenhuma outra alteração nos parâmetros espermáticos ou na concentração de testosterona foi observada. Igualmente, o comportamento sexual dos animais quando em idade adulta e o comportamento em teste de campo aberto também não foram alterados.

As fêmeas submetidas ao tratamento 100mg/kg Omeo não apresentaram toxicidade sistêmica caracterizada por redução de peso ou consumo de alimento e água, mas apresentaram redução no tamanho da progênie e aumento do período gestacional em relação ao Controle negativo, o que pode indicar toxicidade reprodutiva na fêmea. O comportamento materno também sofreu alterações, havendo manutenção na capacidade materna em promover cuidados com a progênie, mas redução no comportamento relacionado à construção do ninho. Essa característica pode estar relacionada a uma ação de Omeo em sistema nervoso central, causando algum efeito sedativo ou ansiolítico conforme sugerido por Rezaie et al. (2011), ou ainda ser atribuída à redução no tamanho das ninhadas, onde há um maior tempo de permanência da mãe com a ninhada visando protegê-la (MARQUES, 2014).

Fêmeas acasaladas com machos não tratados e submetidas a tratamento durante o período de desenvolvimento esquelético fetal (6º ao 15º dia) também não apresentaram sinais de toxicidade materna. No entanto, o número de fetos por progênie foi menor nos grupos dos compostos majoritários e o peso médio dos filhotes apresentou redução significativa em relação ao Controle negativo no grupo 300mg/kg Omeo, confirmando os resultados descritos anteriormente e indicando toxicidade reprodutiva.

Os efeitos teratogênicos observados pela exposição a Omeo parecem estar relacionados a uma interação entre os componentes do óleo, uma vez que isoladamente os compostos majoritários não apresentaram resultados idênticos aos do grupo 300mg/kg Omeo. De fato, estudo conduzido por Araújo et al. (1996) avaliando o potencial teratogênico de α -terpinene identificou que doses acima de 30mg/kg desse composto causam malformação fetal. O α -terpinene é um dos compostos encontrados na amostra deste estudo, e na dose 300mg/kg Omeo, são encontrados 52mg/kg α -terpinene. Em doses de 60mg/kg ou mais de α -terpinene, Araújo et al. (1996) descreve retardo importante na ossificação dos fetos, além de alterações esqueléticas principalmente em cabeça. Isso colabora com nossos resultados onde as principais alterações observadas foram em ossos da cabeça, além do retardo na ossificação.

Os efeitos observados para as doses utilizadas nesse experimento indicam toxicidade reprodutiva, mas sem causar toxicidade sistêmica, confirmando a literatura que refere doses muito superiores para toxicidade oral (2,24g/kg) e dérmica (>5g/kg) de Omeo (OPDYKE, 1976; TISSERAND e YOUNG, 2014).

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta resultados inéditos sobre a ação do óleo essencial de *Origanum majorana* (Omeo) sobre a fertilidade de ratos Wistar em modelo pré-clínico de avaliação de toxicidade reprodutiva, assim como também descreve embriofetotoxicidade e efeitos sobre o desenvolvimento de progênes expostas durante gestação e lactação.

Em síntese, os resultados indicam que:

= Não há indução de mutagenicidade quando avaliado *in vitro* em estudos de genotoxicidade, indicando que os efeitos observados não estão relacionados a uma ação direta sobre o código genético.

= A fertilidade de machos Wistar é afetada pela administração do óleo essencial de *O. majorana* de maneira dose dependente, sendo que na dose 300mg/kg os machos apresentam degeneração testicular e azoospermia. Nas doses 33mg/kg e 100mg/kg Omeo e composto majoritário terpinen-4-ol os parâmetros reprodutivos são afetados, há redução na qualidade espermática e também atrofia testicular. Não houve alteração na concentração de testosterona, sugerindo que a ação possa ocorrer em nível celular, diretamente nas células de Sertoli.

= Não há sinais de toxicidade materna induzida pelos tratamentos. Houve alteração no comportamento, mas não na capacidade materna de cuidados com a progênie na dose 100mg/kg Omeo. O número de filhotes por progênie e a duração da gestação também foram alterados por esse tratamento. Os grupos 300mg/kg Omeo e terpinen-4-ol não apresentaram fêmeas gestantes, provavelmente devido à incapacidade reprodutiva dos machos progenitores submetidos aos tratamentos.

= O tratamento de fêmeas durante gestação e lactação com 100mg/kg Omeo induz alteração nas características sexuais de filhotes machos, retardando a separação prepucial, apesar de não alterar demais parâmetros reprodutivos da progênie, nem interferir no comportamento dos filhotes.

= Alterações esqueléticas foram observadas em todos os grupos com tratamento materno durante o período de desenvolvimento fetal (6º ao 15º dia de gestação), sendo que nos grupos 33mg/kg Omeo e γ -terpinene as alterações são relacionadas a pobre ou completa ossificação. Malformação esquelética foi principalmente observada nos grupos 100mg/kg e 300mg/kg Omeo.

= Os resultados parecem estar relacionados a uma interação entre os componentes do óleo, uma vez que isoladamente os compostos majoritários não apresentaram resultados idênticos aos do grupo 300mg/kg Omeo.

Concluindo, a administração de altas doses de Omeo deve ser muito bem avaliada em machos em período reprodutivo, uma vez que causa danos severos em testículos e epidídimos, reduzindo a qualidade do sêmen. Da mesma forma, não é aconselhável a utilização em período gestacional e lactação por induzir efeitos adversos no desenvolvimento da progênie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MASSIH, R.M.; ABRAHAM, A. Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, p.819-828, 2014.

ABDEL-MASSIH, R.; ABDOL, E.; BAYDOON, E.; BAYDOON, Z. Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli. **Journal of Botany**, v.2, Article ID 464087, 8p., 2010. DOI:10.1155/2010/464087.

AL DHAHERI, Y.; ATTOUB, S.; ARAFAT, K.; ABUQAMAR, S.; VIALLET, J. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of *Origanum majorana* on highly metastatic human breast cancer cells: Inhibition of NF κ B signaling and reduction of nitric oxide production. **PLoS ONE**. 8, e68808, 2013.

AL-HARBI, N.O. Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.23, p.5479-5485, 2011.

ALIZADEH, A.; KHOSH-KHUI, M.; JAVIDNIA, K.; FIRUZI, O.R.; JOKAR, S.M. Chemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. **Advances in Environmental Biology**, v.5, p.2326-2331, 2011.

AMMAM, R.P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.2, p.13-24, 1982.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

ARAÚJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; DE CARVALHO, R.R. Study of the embryofetotoxicity of α -terpinene in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.477-482, 1996.

BARATTA, M.T. et al. Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal Essential Oil Research**, v.10, n.6, p.618-627, 1998.

BOTELHO, G.G.K. **Efeitos reprodutivos e endócrinos do di(2-etilexil)ftalato (DEHP) isolado e associado a antioxidantes em ratos Wistar**. 2009. 119f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.162-167, 2003.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, RS, 2006.

COOPAFLOA. Arvoredo Brasil. **Manjerona**. In: <http://www.arvoredobrasil.com.br/especies-cultivadas/ervas-aromaticas-e-medicinais/manjerona>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

DE SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, T. O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA FILHO, J.M. Orégano (*Origanum vulgare* L, Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n.132, p.40-45, 2005.

DI STASI, L.C. (org). **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DIFERERA, D.J. et al. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2576-2581, 2000.

EL-AKHAL, F., LALAMI, A.E.Q.; ZOUBI, Y.E.; GRECHE, H.; GUEMMOUH, R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.9, 746-750, 2014.

EL-ASHMAWY, I.M.; SALEH, A.; SALAMA, O.M. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.101, p.320-327, 2007.

EL-ASHMAWY, I.M., EL-NAHAS, A.F., SALAMA, O.M. Protective Effect of Volatile Oil, Alcoholic and Aqueous Extracts of *Origanum majorana* on Lead Acetate Toxicity in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.97, p.238-243, 2005.

EPA. Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register 61(212):56274-56322. October, 1996.

ERENLER, R.; SEN, O.; AKSIT, H.; DEMIRTAS, I.; YAGLIOGLU, A.S.; EKMASTASA, M.; TELCI, I. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.822-836, 2016. DOI: 10.1002/jsfa.7155.

FERRARA, L.K.; MONTESANTO, D.; CHIANTESE, C. *Origanum marjorana* L. in medicine and foods. **Ingredientia Alimentaria**, v.2, p.23-25, 2003.

HEIKAL, T.M. Antioxidant potentials of *Origanum majorana* leaves extract against reproductive toxicity and apoptosis-related gene expression resulted from methomyl exposure in male rat. **Planta Medica**, v.81, PM_13, 2015. DOI: 10.1055/s-0035-1565390.

JUN, W.J.; HAN, B.K.; YU, K.W.; KIM, M.S.; CHANG, I.S.; KIM, H.Y. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. **Food Chemistry**, v.75, p.439-444, 2001.

JUNG, H.N.; CHOI, H.J. Effects of *Origanum majorana* essential oil aroma on the electroencephalograms of female young adults with sleep disorders. **Journal of Life Science**, v.22, p.1077-1084, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.8.1077>.

KHAN, J.A.; JALAL, J.A.; IOANNDES, C.; MOSELHY, S.S. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. **Toxicology and Industrial Health**, v.29, p.142-148, 2013.

LAMBERT, R.J.W. et al. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p.

LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: Spritzer, D. T.; Sanseverino, M.T.V.; Schüler-Faccini, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, p. 19-39, 2001.

LEMÔNICA, I.P. Toxicologia da Reprodução. In: Oga, S, Camargo, MMA, Batistuzzo, JAO. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ed., São Paulo: Atheneu Editora, p.103-113, 2008.

MACHADO, M.S.; VILLELA, I.V.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; SALVADOR, M.; LOPES, N.P.; BRAGA, A.L.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. 313-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. **Mutation Research**, v.673, p.133-140; 2009.

MACHADO-SANTELLI, G.M., SIVIERO, F. Mutagênese e Carcinogênese. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu Editora, p.83-99, 2008.

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

MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-251, 1983.

MARQUES, S.E. **Influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno e respostas comportamentais e endócrinas na prole na fase adulta**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

MATHEW, P.A.; PADMANABHAN, M.N. Quality control profiling, antifungal and in vivo cytotoxic potential of *Origanum majorana*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.6, n.2, p. 634-640, 2015.

MELLO, M.S.C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 2007. 131f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29-60, 2000.

OECD 443, 2011. Test No. 443: **Extended One-generation Reproductive Toxicity Study**, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: 10.1787/9789264122550-en.

OECD 471, 1997. Test No. 471: **Bacterial Reverse Mutation Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

OECD 487, 2014. Test No. 487: **In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224438-en>.

OLIVEIRA, J.L.T.M. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, n.1, p. 45-50, 2009.

OMARA, S.T.; EL-MOEZ, S.A.; MOHAMED, A.M. Antibacterial Effect of *Origanum majorana* L. (Marjoram) and *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) Essential Oils on Food Borne Pathogens Isolated from Raw Minced Meat in Egypt. **Global Veterinaria**, 13(6), p.1056-1064, 2014. DOI: 10.5829/idosi.gv.2014.13.06.9149.

OPDYKE, D.L.J. Marjoram oil sweet. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.14, n.5, p.469, 1976.

OSHIO, L.T.; GUERRA, M.O. Métodos em Toxicologia do Sistema Reprodutor Masculino e Fertilidade em Roedores. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.3, p. 148-152, 2009.

QARI, S.H. Assessment of Antimutagenic and Genotoxic Potential of *Origanum majorana* Aqueous Extract using *in vitro* Assays. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n.15, n.2, p.207-212, 2008.

QUER, P.F. **Plantas Medicinales – Labiadas – Mayorana**. 11 ed. Editora Labor S.A: Barcelona, 1988.

RAAFAT, K.; JASSAR, H.; ABOUL-ELA, M.; EL-LAKANY, A. Protective effects of *Origanum majorana* L. against neurodegeneration: fingerprinting, isolation, and *in vivo* glycine receptors behavioral model. **International Journal of Phytomedicine**, v.5, p.46-57, 2013.

RAMADAN, G., EL-BEIH, N.M., ZAHRA, M.M. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. **British Journal of Nutrition**, v.108, p.1059-1068, 2012.

RAO, S.; TIMSINA, B.; NADUMANE, V.K. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum majorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, p.389-394, 2014.

RECEITA CASEIRA. Receita Natural. **Manjerona: propriedades medicinais**. In: <http://natural.enternauta.com.br/plantas-medicinais/manjerona-propriedades-medicinais/> Acesso em: 19 de junho de 2012.

REZAIE, A.; MOUSAVI, G.; NAZERI, M.; JAFARI, B.; EBADI, A.; AHMADEH, C.; HABIBI, E. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. **Research Journal of Biological Sciences**, v.6, p.611-614, 2011.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra, p. 173-200, 2003.

RITA, F.; SALLES, L.B.; BARBOZA, R.A.; OLIVEIRA, M.C.; PRESTES, R.A.; ALMEIDA, D.M. Atividade antimicrobiana de biofilme com óleos essenciais para conservação pós-colheita de tomate cv rasteiro. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, suplemento, p.466-474, 2011. DOI: 10.3895/S1981-36862011000100010S1.

ROBY, M.H.H.; SARHANA, M.A.; SELIMA, K.A.H.; KHALELA, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.827-831, 2013.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 163f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2002.

SANTIM, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da Família Lamiaceae**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

SBMCTA. Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Teste de Mutação Reversa com *Salmonella typhimurium*. Teste do Micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. **Série Documentos – SBMCTA**, n.1, 2004.

SCHULER-FACCINI, L.; LEITE, J.C.L.; PERES, R.M. Teratogênese e Ambiente. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

SILVA, J.; FONSECA, M.B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p.

SOLIMAN, F.M.; YOUSIF, M.F.; ZAGHLOUL, S.S.; OKBA, M.M. Seasonal Variation in the Essential Oil Composition of *Origanum majorana* L. Cultivated in Egypt. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.64, 611-614, 2009.

SOUZA, N.A.B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential oil safety**. A guide for health care professionals. 2ed. London, UK: Churchill Livingstone Elsevier, 2014. ISBN 978-0-443-06241-4.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, v.64, 373-378, 2001.

VON HERTWIG, I.G. **Plantas Aromáticas e Medicinais – *Origanum majorana* L.** Ícone Editora Ltda: São Paulo, SP; 1986.

WALL, M.E; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p.239-254, 1996.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989.

ANEXO A – Carta de Aprovação do CEUA/UFRGS



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23613

Título: Estudo de Toxicidade Reprodutiva e Genotoxicidade do Óleo Essencial de Origanum majorana

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JOAO ROBERTO BRAGA DE MELLO - coordenador desde 30/08/2012
FERNANDA BASTOS DE MELLO - pesquisador desde 30/08/2012
Andrea dos Santos Dantas - pesquisador desde 30/08/2012
Rosema Santin - pesquisador desde 30/08/2012

Equipe Externa:

Mário Carlos de Araújo Meireles - pesquisador desde 30/08/2012
Marlete Brum Cleff - pesquisador desde 30/08/2012
Fernanda Bastos de Mello - coordenador desde 30/08/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 17/12/2012 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 200 ratos (50 machos e 150 fêmeas), Wistar, com idade inicial de 120 dias, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 4 de Janeiro de 2013



STELA MARIS KUZÉ RATES
Coordenador da comissão de ética