

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

**ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) EM RATOS WISTAR**

CLARISSA BOEMLER HOLLENBACH

**Porto Alegre/RS
2013**

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

**Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*
L.) em ratos Wistar**

Autor: Clarissa Boemler Hollenbach
Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias, junto à
Faculdade de Veterinária da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul na área de Morfologia,
Cirurgia e Patologia Animal,
especialidade: Toxicologia Animal.
Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Braga de Mello
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda
Bastos de Mello

Porto Alegre, RS

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Hollenbach Boemler, CLarissa
Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial
de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar /
CLarissa Hollenbach Boemler. -- 2013.
107 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.
Coorientador: Fernanda Bastos de Mello.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. Toxicidade reprodutiva. 2. Óleo essencial. 3.
Orégano. 4. Fertilidade. 5. Ratos Wistar. I. Braga
de Mello, João Roberto, orient. II. Bastos de Mello,
Fernanda, coorient. III. Título.

CLARISSA BOEMLER HOLLENBACH

**Estudo da Toxicidade Reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*
L.) em ratos Wistar**

Aprovada em

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Dorneles
Membro da Comissão

Profa. Dra. Marlete Brum Cleff
Membro da Comissão

Profa. Dra. Márcia de Oliveira Nobre
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, por toda contribuição imprescindível. Em especial à minha filha Elisa, que nasceu durante este projeto, aprendeu a falar durante o experimento e quer ser pesquisadora quando crescer.

Ao meu orientador prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, pela atenção, confiança, aprendizado e apoio em todos os momentos necessários.

À minha coorientadora Profa. Dra. Fernanda Bastos de Mello, por toda a ajuda, pela gentileza e alegria de sempre.

Aos colegas de laboratório: Rafael, Fabíola, Mariani, Andrea, e as bolsistas: Tatiana, Jacqueline, Lisiane, Rafaela, Patrícia e Jéssica, por todo o seu apoio e motivação.

Ao caríssimo Edgar Witkowsky, da empresa Schmitt e Vaz Indústria e Comércio de Óleos Vegetais, Máquinas e Equipamentos, que extraíu voluntariamente todo o óleo essencial usado neste experimento.

À profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues, pelas análises cromatográficas do óleo essencial do orégano, pelas boas sugestões e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

RESUMO

No presente trabalho avaliaram-se os efeitos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre a fertilidade, desenvolvimento ponderal de ratos Wistar, potencial teratogênico, bem como o desenvolvimento físico, motor e comportamental das progênes. A dosagem inicial do óleo essencial foi obtida através de ensaio *in vitro* frente a linhagens de isolados de *Candida spp.* O óleo foi extraído pelo processo arraste de vapor e analisado por cromatografia GC/MS. Constituíram-se cinco grupos experimentais com 10 machos e 30 fêmeas cada, um grupo controle negativo (GC-) que recebeu o veículo da emulsão do óleo de orégano (água destilada + Tween 80 0,001%) um grupo controle positivo (GC+) que recebeu os compostos majoritários do óleo, timol 3% e terpine-4-ol 3%, e três grupos tratados com a emulsão contendo óleo essencial do orégano contendo 3% V / V (GO1), 9% V / V (GO2) e 27% V / V (GO3). Os animais foram tratados diariamente por via oral usando sonda oro-gástrica flexível, com mesmo volume (10 mg / mL). Os machos foram tratados durante 91 dias, sendo 70 dias antes do acasalamento e 21 dias de acasalamento, após este período, os machos foram eutanasiados para coleta de órgãos para análise histopatológica, coleta de sangue e processamento dos órgãos sexuais para contagens espermáticas. As fêmeas foram tratadas antes (14 dias) e durante o acasalamento, gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Metade das fêmeas prenhes sofreu cesariana no 21º dia de gestação, e os fetos foram usados para a avaliação de teratogenia. O restante das fêmeas pariu a termo, tiveram o comportamento maternal avaliado e as suas proles foram avaliadas a partir do nascimento, quanto às características de desenvolvimento e testes reflexos. Na puberdade, aos 65 dias, um filhote de cada sexo por ninhada foi eutanasiado para avaliação histopatológica e contagens espermáticas e aos 75 dias de idade um macho de cada ninhada teve seu comportamento testado em campo aberto. Na idade adulta a prole formou casais não consanguíneos para a realização do comportamento sexual. Os resultados mostram que a administração do óleo essencial nas diferentes doses não interferiu no desenvolvimento ponderal de machos e fêmeas tratados nem das suas progênes (ANOVA $p > 0,05$). Nos machos, o óleo essencial de orégano interferiu diminuindo o número de células espermáticas, o número total de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo e os níveis de testosterona plasmática, na morfologia espermática o óleo aumentou o percentual de malformações espermáticas nos grupos tratados, de forma dose dependentes, igualmente no controle positivo. Nas fêmeas a taxa de acasalamento apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo nas duas doses mais altas de óleo essencial (9% e 27%). Na dose mais alta houve perdas pós-implantação,

diferentes estatisticamente do GC-. Na avaliação esquelética dos fetos, houve diferença estatisticamente significativa no percentual geral de fetos com anomalias esqueléticas, em relação ao controle negativo, em 3%, 9% e GC+. Com relação às progênes, não houve alterações estatisticamente significativas nos grupos, no que se refere ao desenvolvimento ponderal, nos testes reflexos, nas contagens espermáticas e dosagem de testosterona plasmática realizadas na puberdade, no teste de campo aberto e no teste de comportamento sexual. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a dose inicial (3%), considerada terapêutica, é segura para a reprodução de ratos Wistar, no entanto quando esta dose é aumentada para 9% e 27%, alterações nas variáveis reprodutivas dos machos podem acontecer.

Palavras chave: orégano, óleo essencial, toxicidade reprodutiva, fertilidade, ratos Wistar, teratogenia.

ABSTRACT

*In the present study were evaluated the effects of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) on fertility and weight development of rats on the teratogenic potential as well as the physical, motor and behavioral of the progenies. The initial dose was obtained by in vitro against strains of *Candida isolates spp*. The oil was extracted by the process of steam drag chromatography and analyzed by GC / MS. Constituted five experimental groups with 10 males and 30 females each, a negative control group (GC-) who received vehicle emulsion emulsion of oil of oregano (distilled water + Tween 80 0, 001%) a positive control group (CG +) receiving the major compounds from the oil, thymol 3% and terpine-4-ol 3% and three groups treated with the emulsion containing essential oil of oregano containing 3% V / V (GO1), 9% V / V (GO2) and 27% V / V (GO3). The animals were treated daily orally using orogastric tube flexible, with the same volume (10 mg / ml). Males were treated for 91 days with 70 days prior to mating and during mating 21 days, after this period, males were euthanized to collect organs for histopathology, blood collection and processing of sexual organs for sperm counts. Females were treated before (14 days) and during mating, gestation (21 days) and lactation (21 days). Half of pregnant females underwent cesarean section on day 21 of gestation, and the fetuses were used for the evaluation of teratogenicity. The rest of the females gave birth at term, had evaluated whether maternal behavior and their offspring were evaluated from birth, for the development traits and reflex tests. At puberty, 65 days, a pup of each sex per litter was euthanized for histopathological assessment and sperm counts at 75 days of age a male from each litter had tested their behavior in the open field. In adulthood the offspring formed consanguineous couples not to perform sexual behavior. The results showed that administration of essential oil at different doses did not affect the weight development of males and females treated or their progeny (ANOVA $p > 0.05$). In males, the essential oil of oregano interfered decreasing the number of sperm cells, total number of sperm stored in the cauda epididymis and plasma testosterone levels on sperm morphology oil increasing the*

percentage of sperm abnormalities in the treated groups in a dose dependent manner, equally positive control. In females mating rate was statistically significantly different compared to negative control group in the two higher doses of essential oil (GO2 and GO3). At the higher dose (GO3) losses occurred before and after deployment, the GC- statistically different. In assessing skeletal fetuses of females who underwent cesarean section, there was a statistically significant difference in the overall percentage of fetuses with skeletal anomalies, relative to the negative control in GO1, GO2 and GC +. Regarding progenies, no significant statistics changes in groups, with regard to weight development, testing reflexes, sperm counts and measurement of plasma testosterone at puberty, in open field test, in the test of sexual behavior Based on these results, we conclude that the initial dose (3%), considered therapy is safe for reproduction of rats, however when this dose is increased to 9% and 27%, changes in the male reproductive variables can occur.

Key words: *oregano, essential oil, reproductive toxicology, fertility, Wistar rats.*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1. Destilador artesanal por arraste a vapor. Foto: Edgar Witkowsky, 2011..... 6

FIGURA 2. Detalhe da planta *O. vulgare* (L.) com inflorescências violáceas. Fonte: Grannnutrile, 2012. 7

FIGURA 3 Período de tratamento, no teste dos três segmentos (LEMÔNICA, 2001). 17

FIGURA 4 Esquema de tempo de tratamento dos animais no estudo de toxicidade crônica, segundo a OECD 421..... 19

FIGURA 5 Resultados de uma possível exposição materna à agentes químicos durante o período de gestação (LEMONICA, 2001). 21

FIGURA 6 Construção do ninho para proteção dos filhotes de ratos Wistar, um comportamento maternal. Fonte: Clarissa Hollenbach, 2011. 22

ARTIGO I

Figure 1.Total ion chromatogram (GC / MS) of the essential oil of oregano..... 30

Figure 2. Plasma testosterone levels of rats treated for 91 days with an emulsion containing essential oil of oregano 31

ARTIGO II

Figure 1.Total ion chromatogram (GC / MS) of the essential oil of oregano..... 46

Figure 2. Duration of licking behavior in the rat pups 48

Figure 3.Duration of breast-feeding with back arched behavior in the rat pups 49

ARTIGO III

Figura 1. Cromatograma do íon total (GC/MS) do óleo essencial de orégano..... 65

Figura 2. Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%) das progênes desde o nascimento até o 37º dia. 65

Figura 3. Tempo de resposta ao reflexo de endireitamento (A), resposta à geotaxia negativa (B), resposta ao reflexo de agarrar (C) das progênes. 68

Figura 4. Frequência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear” da progênes. 70

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1. Final body weight and organ relative weights of male rats: negative control (GC-), positive control (GC+), GO1, GO2 e GO3.	31
Table 2. Reproductive indexes of females treated with: negative control (GC-), positive control (GC+), GO1, GO2 e GO3.	32
Table 3. Adult male rat sperm parameters (numbers and morphology): negative control (GC-), positive control (GC+), GO1, GO2 e GO3.	33

ARTIGO II

Table 1. Initial and final body weight of gestation and relative organs weight (%) from dams treated during pre mating, mating, pregnancy and lactation periods.	46
Table 2. Outcome of fertility tests in female rats.	47
Table 3. Reproductive index from dams to give birth.	47
Table 4 . Reproductive index from dams with the caesarian section performed on pregnancy day 21.	48
Table 5. Occurrence of skeletal abnormalities from dams treated with essential oil of oregano in two concentrations: GO1, GO2 and positive control (GC+)	50

ARTIGO III

Tabela 1. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual de filhotes de ratos Wistar	66
Tabela 2. Parâmetros espermáticos na puberdade de filhotes de ratos Wistar.	69
Tabela 3. Parâmetros de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos, prole de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano em duas concentrações (GO1, GO2).	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS GERAIS	3
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Óleos essenciais	4
3.1.1 Análise de óleos essenciais	6
3.2 <i>Origanum vulgare</i> (L.) Orégano	7
3.2.1 Considerações botânicas e históricas	7
3.2.2 Composição química.....	8
3.3 Perspectivas terapêuticas de óleos essenciais	9
3.3.1 Emprego do óleo essencial do orégano.....	11
3.4 Toxicidade de óleos essenciais e de compostos isolados de óleos essenciais.....	13
3.4.1 Toxicologia do orégano	14
3.5 Toxicidade Reprodutiva.....	16
3.5.1 Testes de comportamento.....	21
ARTIGO I	23
Assessment of reproductive toxicity of essential oil of oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.) on male Wistar rats.....	24
ABSTRACT.....	24
Introduction.....	25
Materials and methods	26
Plant material and obtaining the essential oil.....	26
Chromatographic analysis of essential oil	26
Animals	27
Experimental groups	27
Treatment schedule	28
Mating procedure	28
Fertility evaluation.....	28

Male examination procedure.....	28
Plasma testosterone levels.....	29
Spermatid and sperm numbers.....	29
Sperm morphology assessment.....	29
Statistical analysis.....	30
Results.....	30
Chromatographic analysis.....	30
Body weight gain	30
Plasma testosterone levels.....	30
Reproductive index	32
Sperm parameters.....	32
Histology.....	33
Discussion	33
Conflict of interest	35
Acknowledgments.....	35
References.....	36
ARTIGO II.....	39
Effects of essential oil of oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.) (Lamiaceae) on general reproductive performance and teratology in Wistar rats.....	39
Abstract.....	40
1. Introduction.....	40
2. Materials and methods	41
2.1. Obtain the essential oil of oregano.....	41
2.2 Chromatographic analysis of essential oil.....	42
2.3 Animals.....	42
2.4 Treatment	43
2.5 Mating procedure and diagnosis of pregnancy	43
2.6 Fertility evaluation.....	43
2.7 Maternal reproductive performance.....	44

2.7.1 Normal Delivery	44
2.7.2 Cesarean Section	45
2.8 Statistics	45
3. Results.....	45
3.1 Chromatographic analysis.....	45
3.2 Body weight	46
3.4 Maternal Behavior	48
3.5 Histopathological evaluation.....	49
3.6 Fetal evaluation.....	49
4. Discussion.....	50
5. Conclusion	52
6. Acknowledgments.....	53
References.....	53
ARTIGO III	56
Desenvolvimento pós-natal da prole de ratos Wistar expostos ao óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) durante o período pré-natal	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
Material vegetal e obtenção do óleo essencial.....	59
Análise Cromatográfica	59
Animais	60
Protocolo experimental	60
AVALIAÇÃO DA PROLE	61
Desenvolvimento pós-natal.....	61
Testes reflexos	61
Eutanásias da prole na puberdade	62
Machos.....	62

Dosagem de testosterona plasmática.....	63
Fêmeas	63
Teste de comportamento em campo aberto.....	63
Comportamento sexual	63
Análise estatística.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
Análise do óleo essencial	64
Desenvolvimento ponderal	65
Desenvolvimento físico e motor	65
Análise histopatológica.....	68
Parâmetros espermáticos.....	68
Comportamento em campo aberto	69
Comportamento sexual	70
CONCLUSÃO	71
AGRADECIMENTOS	71
REFERÊNCIAS.....	71
4 DISCUSSÃO GERAL	75
4.1 O óleo essencial	75
4.2 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre os machos.....	75
4.3 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre as fêmeas.....	76
4.4 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre a progênie.....	78
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

No século XIX em razão do desenvolvimento da química analítica e da existência de uma sólida medicina tradicional fundamentada em farmacopeias estabelecidas internacionalmente, os fármacos eram obtidos fundamentalmente de plantas medicinais, como a salicina (1827) e a morfina (1832) (YUNES e CECHINEL FILHO, 2009).

O surgimento de novos modelos em cura na saúde a partir da segunda metade do século XX, desencadeado nos anos 60 e prolongado durante os anos 70 nos EUA e na Europa, incluiu a importação de modelos e sistemas terapêuticos distintos daqueles da nossa racionalidade médica, como a medicina tradicional chinesa e a ayurvédica, e a reabilitação das plantas medicinais populares do país. Foi um evento histórico que atingiu não apenas o Brasil, mas o conjunto dos países latino-americanos, principalmente durante a década de 80 (LUZ, 2005).

Contudo, plantas medicinais só podem ser usadas como medicamentos unicamente quando sua atividade é validada através de pesquisas científicas, pela identificação do princípio ativo e pelas evidências de ações farmacológicas, para tanto, são desenvolvidos estudos farmacológicos, pré-clínicos e toxicológicos, complementados por estudos de toxicologia aguda, subaguda e crônica. Estas etapas da validação de plantas medicinais para uso humano também servem para desaprovar o consumo daquelas que demonstraram algum risco para a saúde da população que fizer uso da planta (SIMÕES et al., 1999).

Do orégano (*Origanum vulgare* L.) é possível extrair importante óleo essencial, que possuem compostos como timol, carvacrol, além de alcoóis monoterpênicos, α -terpineol e γ -terpineno. O óleo essencial é responsável pela conhecida propriedade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (MILOS et al., 2000; CHAMI, et al., 2004; KABOUCHE et al., 2005). Porém, o principal uso da planta ainda é como condimento, fazendo parte de pratos da culinária mundial, inclusive da apregoada dieta mediterrânea (MARTOS et al., 2008).

Pesquisas científicas comprovaram a atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos diante de várias espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Penicilium italicum* e *Fusarium oxysporum* (BUCHANAN e SHEPHERD, 1981; PASTER et al., 1990; TANTAOUI-ELARAKI et al., 1993; DAOUK et al., 1995), assim como frente a

espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004, CLEFF et al., 2008; CLEFF et al., 2010).

Outros Estudos citam o uso do orégano como conservante de alimentos de origem animal e como controlador de microrganismos e endoparasitas, sendo promotor de crescimento em várias espécies de animais de produção (ALLAN e BILKEI, 2005, GIANNENAS, et al., 2003, FUKAYAMA et al., 2005, BUSSATA et al., 2007; FASSEAS et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007).

Devido aos óleos essenciais serem produtos de extração de uma espécie vegetal, são mais concentrados, apresentam toxicidade mais elevada que a planta original (SIMÕES et al., 1999). Sendo assim, é necessária a realização de estudos toxicológicos para garantir a segurança de óleos essenciais. Além disso, estudos químicos e potenciais terapêuticos do óleo essencial de orégano vem sendo desenvolvidos em cooperação com grupos de pesquisa da UFPel (Faculdade de Veterinária e Instituto de Química), sendo os estudos toxicológicos indispensáveis e complementares, tendo em vista as possibilidades terapêuticas promissoras que se apresentam no momento.

Fundamentado na necessidade de conhecimento sobre a toxicidade reprodutiva de óleos essenciais de plantas medicinais, este estudo pretende avaliar os efeitos do óleo essencial do orégano sobre a reprodução de ratos Wistar, usando os modelos internacionalmente recomendados para avaliação de toxicidade reprodutiva (EPA, 1996, OECD, 1998, FDA, 2009).

2 OBJETIVOS GERAIS

Contribuir com conhecimentos sobre a utilização do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) especialmente no que se refere à toxicidade reprodutiva.

Integrar grupos de pesquisa com experiências distintas sobre fitoterapia, na abordagem multidisciplinar necessária para elucidação de questões sobre o uso seguro e racional desse óleo essencial.

Determinar experimentalmente o grau de segurança para os testes clínicos em fitoterapia.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) e dos seus compostos majoritários sobre a fertilidade de ratos Wistar, machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, desenvolvimento pré-natal, parto e desenvolvimento pós-natal, com machos tratados antes e durante o acasalamento e fêmeas durante acasalamento, gestação e lactação.

Avaliar os efeitos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese e pesquisar a possibilidade de produzir efeitos teratogênicos.

Avaliar os efeitos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre o desenvolvimento geral e comportamental pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação até sua idade adulta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias de origem vegetal extraídas de plantas aromáticas ou de pericarpos de frutos cítricos, formados por estruturas de terpenos, compostos fenólicos, e compostos nitrogenados. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Essa denominação deriva de algumas de suas características físico-químicas, como a de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se assim de óleos fixos, obtidos geralmente de sementes (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas que conferem características organolépticas e também tem funções ecológicas importantes nos vegetais – protegem as plantas contra predadores e agem como atrativo para animais polinizadores. São solúveis em solventes orgânicos apolares, entretanto, em água apresentam solubilidade limitada. São presentes em vários componentes das plantas, como: folhas, flores, ramos, galhos, frutos e rizomas, os óleos essenciais são compostos formados por várias funções orgânicas, que variam em relação à quimiotipos, ciclo vegetativo e fatores extrínsecos como temperatura, umidade relativa, duração de exposição ao sol e regime de ventos (SIMÕES e SPITZER, 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004).

As funções dos óleos essenciais também estão relacionadas ao tipo de metabólito secundário, os terpenos, por exemplo, agem repelindo herbívoros, são tóxicos e deterrentes para muitos insetos e mamíferos herbívoros. Já os compostos fenólicos, devido à sua diversidade química, apresentam uma variedade de funções, muitos compostos fenólicos agem na defesa de patógenos e outros têm função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (alelopatia). Alguns compostos nitrogenados são bem conhecidos na defesa das plantas contra a herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos, os quais são de considerável interesse, devido ao seu efeito tóxico para humanos e suas propriedades medicinais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Segundo Bizzo e colaboradores (2009) há inúmeros conglomerados internacionais que comercializam óleos essenciais, empregando-os principalmente como

matéria-prima para a produção de aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e podem ser comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol.

Os processos de extração de óleos essenciais vão depender da localização no vegetal, da quantidade e das características requeridas para o produto final. As técnicas mais utilizadas são prensagem ou expressão, extração com solventes orgânicos, destilação por arraste de vapor e extração com fluido super crítico (CO₂) (HENRIQUES et al., 2009).

A extração do óleo essencial de plantas, a separação e a concentração de seus compostos são de importância industrial, sendo assim, a escolha do método de extração é fundamental e pode variar conforme a localização do óleo na planta e com a proposta de utilização do óleo essencial (RODRIGUES, 2002).

Entre os métodos modernos de extração estão a extração por arraste de vapor, extração por prensagem ou expressão: empregada para extração de óleos essenciais de frutos cítricos, extração com solventes orgânicos: solventes polares (acetato de etila, etanol, metanol) ou apolares (hexano, éter etílico, éter de petróleo, diclorometano) e extração com fluido supercrítico (CO₂ supercrítico).

A extração por arraste de vapor é uma destilação de misturas imiscíveis de compostos orgânicos e água. O princípio desta destilação baseia-se no fato de que óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água e por isso, são arrastados pelo vapor d'água (SIMÕES e SPITZER, 1999) O equipamento usado para este tipo de extração consiste de uma caldeira contendo água aquecida até o ponto de ebulição e logo acima dela fica um reservatório contendo as folhas da planta, onde passa uma corrente de vapor de água, quando o vapor passa subindo através do reservatório contendo o material, ele leva consigo pequenas gotas de óleo (FIGURA 1). Essas gotas seguem com o vapor de água até um condensador aonde serão resfriadas e coletadas em um balão volumétrico, já que a água e o óleo geralmente formam frações separadas, após, o óleo essencial deve ser seco com Na₂SO₄. A pressão total de vapor da mistura torna-se igual à pressão atmosférica (e a mistura ferve) numa temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes e dessa forma, a mistura evapora e resta somente a água no recipiente inicial GUIMARÃES et al., 2000).



FIGURA 1. Destilador artesanal por arraste a vapor. Foto: Edgar Witkowsky, 2011.

A extração por arraste à vapor é um dos processos mais utilizados em escala industrial no Brasil, em escala laboratorial emprega-se o aparelho clewenger que oferece algumas vantagens em relação à destilação convencional, por ser mais compacto e permitir determinações mais apuradas do teor de óleo uma vez que se utilizam pequenas quantidades de planta (RODRIGUES, 2002).

3.1.1 Análise de óleos essenciais

Por se tratar de uma mistura de constituintes voláteis, os óleos essenciais brutos podem ser analisados diretamente por cromatografia a gás, sem tratamento prévio da amostra, permitindo não somente a análise quantitativa de seus constituintes, mas também qualitativa, quando acoplada a espectrometria de massas (HENRIQUES et al., 2009).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al., 1998).

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) permite obter várias informações sobre um óleo volátil em pouco tempo e com pouca quantidade de amostra (menos que 1 μ L) e pequeno custo. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo empregada na avaliação qualitativa e quantitativa desde 1979 (SIMÕES e

SPITZER, 1999).

A cromatografia a gás acoplada a detector olfatométrico (CGO) é uma técnica para analisar aromas, atualmente esta técnica é utilizada para medir a resposta humana à separação cromatográfica dos aromas. A combinação do detector olfatométrico com espectometria de massas permite realizar identificação do analito com odor ativo (PLUTOWSKA e WARDENCKI, 2008).

3.2 *Origanum vulgare* (L.) Orégano

3.2.1 Considerações botânicas e históricas

Originário das regiões da Ásia e Europa mediterrânea, *O. vulgare* (FIGURA 2) pertence à família das Lamiaceae e apresenta muitas espécies, sendo todas aromáticas. Planta herbácea com raízes na forma de caules subterrâneos (rizomas), perene, de hastes algumas vezes roxeadas, cuja altura pode variar de 30 a 50 cm, com flores que variam de esbranquiçadas, róseas ou violáceas. No Brasil, é cultivada no sul e sudeste sendo utilizado como especiaria na culinária (LORENZI e MATOS, 2008).



FIGURA 2. Detalhe da planta *O. vulgare* (L.) com inflorescências violáceas. Fonte: Grannnutrile, 2012.

O orégano propaga-se pela divisão das touceiras, por estaquia ou por sementes. O plantio deve ser feito em solo leve e rico em matéria orgânica. A planta se desenvolve bem sob sol pleno e precisa de proteção contra ventos fortes e frios. Como as folhas do orégano são muito parecidas com as da manjerona (*Origanum*

majorana ou *Majorana hortensis Moench.*), as duas plantas são bastante confundidas, ambas pertencem ao mesmo gênero e sendo o orégano, inclusive, conhecido como manjerona-silvestre ou selvagem. Porém, as duas plantas diferem pelo tamanho, cor das flores, aroma e pelas folhas, sendo que a manjerona apresenta folhas mais ásperas, com uma textura mais firme e uma leve penugem (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2011).

A sinonímia apresentada na literatura para orégano é: *Micromeria formosana* C. Marquand, *Origanum creticum* Lour., *Origanum dilatatum* Klokov, *Origanum normale* Don e *Origanum puberulum* Klokov (LORENZI e MATOS, 2008).

A planta inteira é utilizada na medicina caseira, cujo hábito se originou na cultura italiana. O óleo da planta é usado na composição de aromatizantes de alimentos e na fabricação de perfumes. A literatura etnofarmacológica atribui a esta planta ação analgésica, espasmolítica, sudorífica, estimulante da digestão, da atividade uterina e em cólicas menstruais, bem como expectorante brando (ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1996; BOORHEM et al., 1999; BOWN, 1995; CORRÊA et al., 1998).

Os gregos deram o nome desta planta, *oros ganos*, que significa “alegria das montanhas”, pois os oréganos cobriam suas colinas e perfumavam o verão, aquele povo acreditava que a erva tinha o poder de trazer felicidade. A medicina grega usava o orégano como chá para convulsões e antídoto para venenos narcotizantes. Considerado pelos antigos romanos como símbolo da paz e da felicidade, é originário do Mediterrâneo Oriental e Ásia, em colinas com boa insolação (ENCICLOPEDIA, 1982).

Desde os tempos antigos o orégano é considerado um tônico para o aparelho digestivo e usado em infusão para tratar problemas como tosse, bronquite e cólicas intestinais. Estas propriedades eram bem conhecidas pelo povo romano, que difundiu o uso do orégano por todo o seu império. Sendo um dos temperos mais adicionados em pratos típicos da cozinha italiana, como molhos de tomate, massas e pizzas (ENCICLOPEDIA, 1982).

3.2.2 Composição química

A composição química do gênero *Origanum* pode ser influenciada pelo clima, estação do ano, variedade e espécie, região, solo, estágio de crescimento da planta, época da colheita, além do método de extração (SIMÕES et.al, 1999). De acordo com a literatura, os óleos essenciais do *Origanum vulgare* apresentam em torno de 34 compostos ativos, sendo que os compostos como carvacrol, timol, *gama* terpeno e *p* –

cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (BAMPIDIS et al. 2005).

Estudos sobre a composição química de *Origanum* utilizando extratos aquosos e óleos essenciais revelam que os flavonóides têm sido identificados como apigenina e luteolina, agliconas, alcoóis alifáticos e compostos terpênicos derivados de efenilpropano (JUSTESEN e KNUTHSEN, 2001). Em *O. Vulgare* são encontrados ácidos coumérico, caféico, p-hidrobenczóico e vanilina (MILOS et al., 2000). Os óleos essenciais de espécies de *Lippia* podem variar de acordo com o quimiotipo, mas podem conter limoneno, cariofileno- β , p-cimeno, cânfora, linalol, timol e α -pineno (PASCUAL, et al., 2001). Em *Origanum Onites* podem estar presentes o ácido ferúlico, caféico, vanilina e p- hidroxibenzzóico (GEROTHANASSIS et al., 1998).

Pode ser encontrado entre os monoterpenos um grupo de derivados fenólicos com marcante presença principalmente na família Lamiaceae. Entre os mais importantes cita-se o p-cimeno, timol e carvacrol (NIERO e MALHEIROS, 2009). Estudos mostram que os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos componentes dos óleos essenciais, possuem múltiplas atividades biológicas, são muito eficazes como inseticidas, expectorantes, antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatórios, antioxidantes (NIERO e MALHEIROS, 2009).

3.3 Perspectivas terapêuticas de óleos essenciais

A família das Lamiáceas que compreende a hortelã, o tomilho, a manjerona, o orégano, o manjerição e o alecrim, tem porcentagem muito elevada de óleos essenciais que possuem grande quantidade de compostos da classe dos terpenos, estes constituintes são capazes de agir sobre uma grande variedade de tumores, reduzindo a proliferação das células cancerosas ou provocando sua morte (SERVEN – SCHREIBER, 2001).

Muitos óleos essenciais foram avaliados por suas propriedades antioxidantes, que são muito úteis na conservação de alimentos, principalmente as espécies vegetais utilizadas como condimentos, por exemplo, Orégano (*Origanum vulgare* L.), tomilho (*Thymus* L.), menta (*Mentha* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) e Sálvia (*Salvia officinalis* L.) (BOTSOGLOU et al., 2004, FELLAH et al., 2006; LEE et al., 2005; SACHETTI et al., 2005; SAHIN et al., 2004).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido estudada

exaustivamente nos últimos anos por diversos autores. A maior parte destes trabalhos emprega técnicas de detecção da atividade antimicrobiana *in vitro*, por difusão, diluição ou bioautografia, e neste último, é possível relacionar os efeitos bacteriostáticos ou bactericidas e fungistático e fungicida com componentes da mistura (HENRIQUES et al., 2009).

Atualmente a atividade antiviral de muitos óleos essenciais tem sido intensamente investigada. Alguns compostos isolados foram testados contra DNA virais Herpes vírus (HSV), adenovírus (ADV) e vírus da hepatite B e RNA virais coxsackievirus B1 (CVB1) e enterovírus 71(EV71) os compostos utilizados foram carvona, 1,8 cineol, β - cariofileno, farnesol, fenchona, geraniol, mirceno, linalol e α -tujona (SCHUHMACHER et al., 2003; SCHINITZLER et al., 2007; CHIANG et al., 2005).

A atividade anti-helmíntica e antiparasitária dos óleos voláteis também é bastante pesquisada e podem ser utilizadas como uma alternativa ou como complemento a terapias antiparasitárias convencionais. São dois os modos de ação atribuídos a eficácia dos óleos para o tratamento de infecções parasitárias: propriedades imunomodulatórias e efeitos antiparasitários diretos (HENRIQUES et al., 2009). O Linalol, um álcool monoterpênico apresenta ação contra leishmania *in vitro* para as formas promastigota e amastigota (DL_{50} de 4,3ng/mL e 15,5ng/dL, respectivamente). Outro monoterpene oxigenado o terpinen-4-ol, demonstrou excelente ação inibitória contra tripanossoma brucei ($DL_{50} = 0,02\mu\text{g/mL}$) (MIKUS et al., 2000).

Óleos voláteis podem ter propriedades atrativas, por alimentação e polinização, e/ou inseticidas. Óleos essenciais e seus compostos isolados têm bom potencial para o controle do piolho (*Pediculus humanus capitis*), alguns dos compostos com ação sobre os ovos e sobre a fase adulta do parasita incluem o eugenol, salicilato de metila, α -pineno, β -mirceno, γ -terpineno, α -terpineol, benzaldeído, linalol, cimaldeído e saliciladeído (YANG et al., 2004; YANG et al., 2005).

Numerosos compostos provenientes de óleos voláteis apresentam potencial quimioterapêutico, tem sido sugerido como citotóxicos contra células tumorais. Diversos compostos terpênicos de óleos essenciais são descritos na literatura como agentes preventivos de câncer pela inibição da ativação de procarcinógenos e aumento da detoxificação de carcinógenos, a partir de interações com locais-alvos críticos, ou por cessar a progressão da carcinogênese (WATTENBERG et al., 1992).

A atividade antiinflamatória de óleos essenciais e seus compostos isolados

também tem sido extensivamente pesquisada. Entre as técnicas mais usadas para sua avaliação está o edema de pata de rato induzido por agentes inflamatórios dextrana e carragenina (SANTOS e RAO, 2000 apud HENRIQUES et al., 2009). Outro método utilizado é a pleurisia induzida por um agente flogístico como a carragenina, na cavidade pleural, esta técnica permite monitorar o número de leucócitos no local da inflamação (Souza et al., 2003). Pongprayoon et al (1997) observaram que os monoterpenos terpinen-4-ol e α -terpineno inibiram significativamente a formação de edema em pata de rato induzido pela carragenina. O Linalol também demonstrou atividade antiinflamatória, pelo mesmo mecanismo de ação (PEANA et al., 2002).

3.3.1 Emprego do óleo essencial do orégano

Há uma convergência mundial na indústria de alimentos a buscar compostos alternativos capazes de garantir a estabilidade microbiana dos seus produtos finais e impedir a ação de microrganismos causadores de deterioração ou causadores de doenças veiculadas por alimentos. Dentre os vários novos compostos estudados, o óleo essencial do orégano e seus constituintes químicos têm mostrado eficiência no combate do crescimento e sobrevivência de bactérias e fungos contaminantes de alimentos, bem como inibindo a produção de toxinas microbianas (DE SOUZA et al., 2005; BUSSATA, 2007).

Nos últimos anos, há uma forte tendência em substituir o uso de antibióticos como promotores de crescimento para melhorar o rendimento produtivo nas cadeias da avicultura e suinocultura e a alternativa desta substituição tem sido buscada nos compostos naturais, onde o orégano tem sido comumente usado na alimentação animal por seus efeitos antioxidantes e bacteriostáticos.

Roofchae e colaboradores (2011) conduziram estudo para investigar os efeitos da dieta com óleo essencial de orégano (OEO) sobre o desempenho de frangos de corte, a microflora cecal e atividade antioxidante do soro. Cento e oitenta pintos de corte de 1 dia de idade foram suplementados com 300, 600 e 1200 mg/kg de OEO. A inclusão de 600 mg / kg de OEO na dieta aumentou significativamente o ganho de peso corporal, a suplementação de 600 e 1200 mg / kg de OEO melhorou significativamente a conversão alimentar em comparação com o grupo controle. Em conclusão, OEO exerceu efeitos de promover o crescimento e também exibiu potentes efeitos anti-bacterianos contra *Escherichia coli* cecais.

Um estudo feito na Colômbia por Jimenéz e Gonzáles (2011) avaliaram o efeito das folhas frescas do orégano sobre o ganho de peso e a eficiência e conversão alimentar em 30 frangos tratados com uma ração comercial adicionada com 1% e 5% de folhas frescas de orégano, não foi observada diferença significativa no ganho de peso e sim na conversão e eficiência alimentar, resultados similares aos encontrados por Ayala e colaboradores (2006) que relataram que o extrato de orégano a 0,5% melhora a conversão alimentar.

Em suínos também há estudos que comprovam o aumento no desempenho reprodutivo de fêmeas. Amrik e Bilkei (2003) e Allan e Bilkei (2005) realizaram estudos para determinar o efeito da adição estratégica de orégano em dietas pré parto e lactação de fêmeas em condições de campo. Grupos alternados receberam dietas contendo 1000 ppm de folhas de orégano e 1000 ppm (folhas secas e flores de *Origanum vulgare*, enriquecido com 500 g/kg de óleo essencial de *O. vulgare* prensado a frio) respectivamente, em dietas pré parto e de lactação. Ambos os estudos puderam concluir que porcas alimentadas com orégano tiveram taxa de mortalidade anual inferior, menor taxa de descarte durante a lactação, aumento da taxa de parição, aumento do número de nascidos vivos leitões e diminuição da taxa de natimortos.

Sahin et al. (2003) conduziram um estudo para avaliar a efetividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos e observaram que o óleo essencial foi efetivo na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas, a citar *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *B. meganertium*, *Clavibacter michiganense*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em contrapartida, o extrato metanólico das partes aéreas de *O. vulgare* não mostrou nenhuma atividade antimicrobiana.

Estudos comprovaram a atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos frente a várias espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Penicilium italicum* e *Fusarium oxysporum* (BUCHANAN e SHEPHERD, 1981; PASTER et al., 1990; TANTAOUI-ELARAKI et al., 1993; DAOUK et al., 1995).

O óleo essencial do orégano também tem ação antifúngica frente a espécies de *Candida*, *Sporothrix Schenckii*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004, CLEFF et al., 2008; CLEFF et al., 2010).

A utilização de substâncias extraídas de vegetais que podem atuar na inibição de fungos fitopatogênicos tem sido uma opção no controle de doenças no campo. Relatos têm demonstrado a eficiência de óleos de plantas medicinais na inibição do crescimento de fungos (COUTINHO et al., 1999; FIORI et al., 2000). Zanandrea et al. (2004) realizaram um trabalho que objetivou testar a ação de óleos essenciais da folha de orégano, obtidos por arraste a vapor, no crescimento do micélio de fungos patogênicos do arroz. Todos os fungos testados tiveram o crescimento micelial reduzido pela presença do óleo no meio de cultura, quando comparado ao meio sem adição deste, comprovando sua ação.

3.4 Toxicidade de óleos essenciais e de compostos isolados de óleos essenciais

Atualmente muito se sabe sobre as propriedades terapêuticas e sobre a toxicidade de produtos vegetais, entretanto, estudos referentes à toxicologia do orégano são bastante escassos. Autores têm descrito que o grau da toxicidade de um extrato depende de vários fatores, entre eles da dose utilizada e da frequência de administração, em alguns casos baixas dosagens acarretam intoxicações devido à sensibilidade individual, provocando desde sensibilização, alergias, até problemas mais graves, principalmente quando utilizados por via oral (DE VICENZI et al., 2004).

Muitos trabalhos foram realizados para conhecer a mutagenicidade de compostos voláteis, pelo teste de AMES. Diversos autores observaram que os seguintes compostos não apresentam toxicidade: α – pineno, mirceno e α – terpineno (GOMES-CARNEIRO et al., 2005), 1,8 cineol (GOMES-CARNEIRO et al., 1998), β – pineno e α – terpineol (FLORIN et al., 1980), p – cimeno (ROCKWELL e RAW, 1979), limoneno (CONNOR et al., 1985), linalol (ISHIDATE et al., 1984) e terpinen-4-ol (FLETHTER et al., 2005). Ainda que os monoterpênicos sejam conhecidos por serem substâncias seguras, para a pulegona, foi detectada propriedade hepatotóxica e o safrol possui propriedade genotóxica e carcinogênica (CHAN e CALDWELL, 1992; BAKERINKE et al., 1996).

Em estudo realizado com o óleo do *tea tree* (*Melaleuca alternifolia* Cheel) foi observado que este é tóxico quando ingerido em altas doses, podendo desencadear reações alérgicas em pessoas sensíveis. Tais reações podem ser causadas pela oxidação dos compostos pela exposição à luz e o ar. O autor sugeriu que α – terpineno e β – mirceno, os principais constituintes do óleo, possam ser os responsáveis pela toxicidade

(HAMMER et al., 2006). O *d* – limoneno, um monoterpeneo cíclico, também não demonstrou ser mutagênico pelo mesmo método (IARC, 1999). Há relatos que *d* – limoneno seja tanto um agente carcinogênico renal como uma substância anticarcinogênica, dependendo da dose (GOULD, 1997). Em outro estudo envolvendo α – terpineno foi verificado dose-dependente em modelos de ratos levando à mal – formações do esqueleto (ARAUJO et al., 1996).

Henriques e colaboradores (2009) relatam que dados de citotoxicidade *in vitro* têm sido utilizados para predizer ou estimar irritações cutâneas e correlações entre os dados *in vitro* e *in vivo*. Estudo realizado para verificar a citotoxicidade em diversas linhagens celulares demonstrou que terpinen-4-ol, α – terpineol, terpinoleno, α – felandreno, aromadendreno, sabineno, 1,8 – cineol, α – pineno, β – pineno apresentaram vários graus de citotoxicidade (HAYES et al., 1997; MIKUS et al., 2000).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) limita o uso de eugenol, pelo fato de existirem evidências de carcinogenicidade em humanos e animais (HENRIQUES et al., 2009).

A Cânfora é uma cetona terpenóide, facilmente encontrada em formulações farmacêuticas, quando utilizadas em menores de dois anos pode causar irritação na pele, eczema, vertigem, vômito, convulsão e insuficiência respiratória, já que crianças pequenas não têm todas as enzimas suficientes para metabolizar a cânfora, e o risco ainda é maior quando a criança ingere acidentalmente o produto e o contato via nasal, por onde a absorção da substância é maior (HENRIQUES et al. 2009). Roehsig et al. (2011) refere que a cânfora é altamente tóxica quando administrada por via oral e pode levar ao aborto, pois atravessa a placenta e o feto também não apresenta capacidade de metabolização enzimática para eliminar este agente tóxico.

3.4.1 Toxicologia do orégano

Sabe-se que os terpenos presentes no óleo essencial do orégano têm um papel importante na interação entre plantas e insetos. Os efeitos do óleo sobre insetos variam de repelência à toxicidade ou mesmo letalidade (KARPOUHTSIS et al., 1998).

Vinte e um óleos essenciais foram testados para a atividade inseticida por via tópica contra larvas do tabaco, *Spodoptera litura*, o óleo de *Origanum creticum* produziu 90% de mortalidade larval em 24 horas com uma única dose de 100 mg (ISMAN et al., 2001). Entre outros óleos essenciais, o óleo de *Origanum vulgare* foi

testado para atividade inseticida (fumigação ou a aplicação tópica) contra larvas de *Spodoptera littoralis*, sendo o óleo essencial do orégano bastante tóxico, com DL50 entre 10,1 e 20,1 mL m³ (PAVELA, 2005).

Cleff et al. (2008) avaliaram a toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* administrado em ratas Wistar hígdas, tratadas diariamente por via oral e intra-vaginal por 30 dias, utilizando emulsão a 3% vol/vol do óleo essencial de *O. vulgare*. Os resultados não evidenciaram alteração macroscópica nos tecidos do trato reprodutivo e digestório, fígado, baço e rins. Nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas não foram observadas alterações. De acordo com os resultados, os autores concluíram que o óleo essencial do *O. vulgare* não causa alterações toxicológicas relevantes nas condições testadas, no entanto, ressaltam a necessidade de estudos adicionais incluindo um período maior de administração e, utilizando óleos com diferentes proporções de terpenos, além da avaliação da toxicidade reprodutiva.

Domaracký e colaboradores (2007) investigaram os efeitos dos óleos essenciais (OE) de canela, cravo, sálvia, orégano, tomilho sobre crescimento e desenvolvimento de pré-implantação de embriões de camundongos *in vivo*. Os óleos foram adicionados à dieta comercial, em concentrações de 0,25% para OE sálvia, OE tomilho, OE cravo, OE canela e 0,1% para OE orégano e fêmeas alimentadas por duas semanas *ad libitum*. Quanto ao OE de orégano, observou-se um aumento significativo de células mortas em embriões de pré-implantação.

Benavides e colaboradores (2010) também investigaram o efeito do orégano sobre a pré-implantação de embriões de camundongos, utilizando extrato aquoso 9, 18 e 36mg/mL, *ad libitum*, à fêmeas grávidas. Um ligeiro atraso no desenvolvimento do embrião foi observado, apenas com a dose mais elevada. Com respeito à qualidade do embrião, um aumento de embriões degenerados foi observado, mas não sendo significativo. Os autores concluíram que o extracto aquoso de *O. vulgare* não tem um efeito tóxico sobre o embrião de camundongos, só produz um ligeiro atraso no seu desenvolvimento.

Estudos da ação de compostos isolados do óleo essencial do orégano também são escassos, entretanto, a avaliação de eugenol e carvacrol em ratos demonstrou que as substâncias não causaram efeitos colaterais ou tóxicos (CHAMI et al., 2004; VICENZI et al., 2004).

Experimentos em genotoxicidade têm sido feitos para comprovar a atividade

antimutagência do óleo essencial do gênero *Origanum*. Conforme Lam e Zheng (1991) a suplementação de óleo essencial de orégano a ratos proporcionou um aumento na atividade da glutathione S – transferase (GST) nos tecidos analisados, sugerindo atividade anticancerígena, sendo que GST exerce função na detoxificação da carcinogênese química.

Ipek et al. (2005) avaliaram os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do óleo essencial de *Origanum onites* L. e de carvacrol, através do teste Ames Salmonela. A atividade mutagênica foi inicialmente rastreada usando linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, com ou sem ativação metabólica. Não foi encontrada mutagenicidade no óleo de ambas as linhagens, pelo contrário, ambas as amostras inibiram fortemente a mutagenicidade. Mezzoug et al. (2007) avaliaram a atividade antimutagênica e mutagênica do óleo essencial de *Origanum compactum* pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, não sendo observado aumento no número de mutações somáticas com o óleo essencial testado.

O óleo essencial da planta *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, foi analisado juntamente com seus principais constituintes, carvacrol e timol, quanto a atividade genotóxica por Karpouhtsis et al. (1998), revelando que entre os compostos fenólicos extraídos do óleo de orégano e avaliados pelo teste de mutação e recombinação somática em *Drosophila* apenas o timol exibe atividade genotóxicas.

3.5 Toxicidade Reprodutiva

Os estudos mais utilizados para avaliações da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade são divididos em três segmentos que são adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA) e recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (FIGURA 3), são eles:

Segmento I – toxicidade crônica: visa avaliar os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas tratados antes e durante o acasalamento e de fêmeas durante a prenhez e lactação;

Segmento II – toxicidade pré-natal: dispõe-se a avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie expostas durante a fase de organogênese;

Segmento III – toxicidade peri e pós-natal: avalia as progênies expostas durante as

fases de desenvolvimento fetal e lactação.

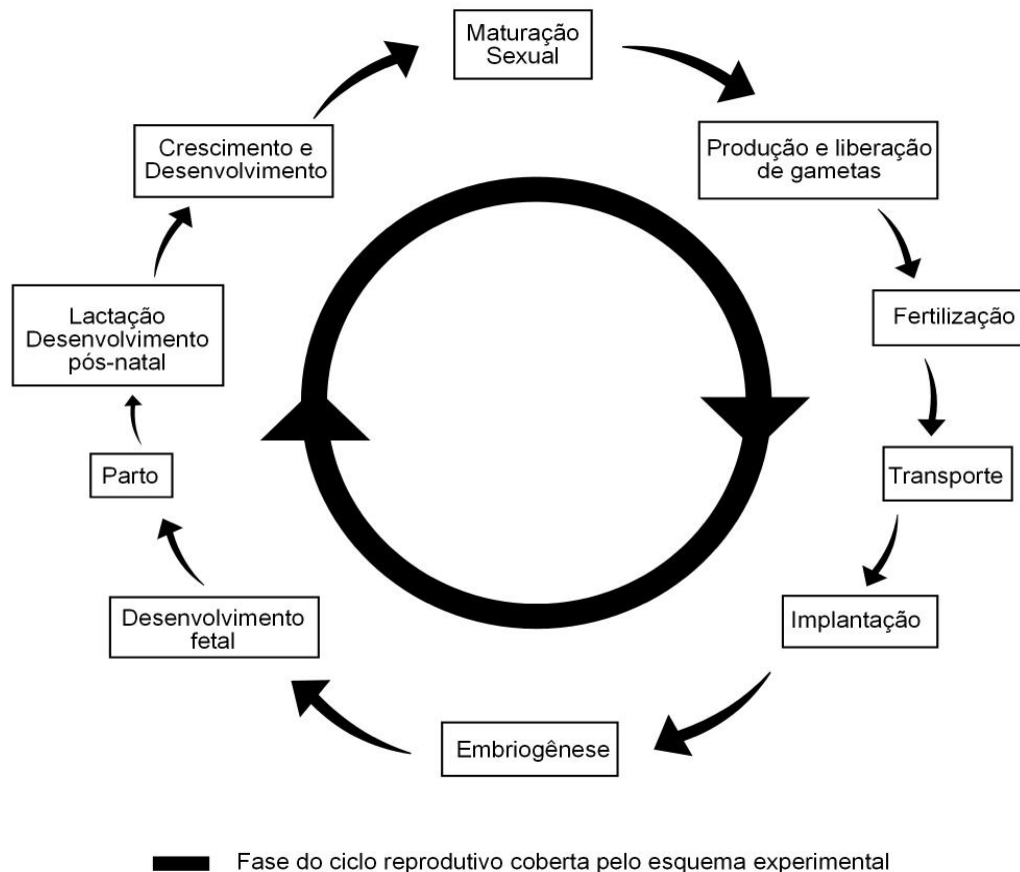


FIGURA 3 Período de tratamento, no teste dos três segmentos (LEMÔNICA, 2001).

Levando-se em conta que os objetivos da avaliação da toxicidade reprodutiva e da teratogenicidade são os de evidenciar possíveis riscos de xenobióticos para a espécie humana e para animais domésticos, os testes em toxicidade reprodutiva são realizados, em sua maioria, em mamíferos. Ratos, camundongos e coelhos reúnem diversas características que os torna animais de escolha para sustentar os testes em laboratório, como: período curto de gestação, prole numerosa, útero com dois cornos nos quais os sítios de implantação têm distribuição regular, placenta tipo hemocorial, como no ser humano (MELLO & LANGELOH, 2006).

Quanto aos roedores, o rato de laboratório utilizado é a espécie *Rattus norvegicus* pertencente à ordem Rodentia e à família Muridae. Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar, uma linhagem de ratos albinos,

pois são animais dóceis e possuem excelente desempenho reprodutivo. Os machos atingem a maturidade sexual logo após a puberdade, entre 60 e 75 dias de vida e sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias e a senescência reprodutiva se dá ao redor dos 360 dias de idade. Nas fêmeas a maturidade sexual é atingida entre 60 e 75 dias de vida, fertilidade máxima entre 90 e 120 dias e a senescência reprodutiva se dá aos 360 dias de idade. O ciclo estral é regular, de natureza poliéstrica anual, com ciclos de 4 a 5 dias. O estro dura aproximadamente 12h, geralmente no período escuro, com ovulação espontânea. O período de gestação tem duração de 21 a 23 dias, e o tamanho da prole varia entre 8 e 14 filhotes por parto, a maioria dos ratos é desmamada aos 21 dias de idade (COBEA, 1996; EBISUI, et al. 2009).

A via de administração mais utilizada nos testes de toxicidade reprodutiva é a oral, através de intubação gástrica, por permitir dosagem precisa da substância teste e padronização dos níveis plasmáticos maternos. Diferentes vias, como a via dérmica, inalatória ou outras podem ser utilizadas quando as condições de exposição ou as características físico-químicas da substância teste assim exigirem (LEMÔNICA, 2001).

A natureza das substâncias a serem testadas é outro fator de importância, de forma geral, a redução do tamanho da partícula aumenta a solubilidade, aumentando a absorção e a toxicidade de forma direta. As substâncias devem ser diluídas em um veículo, preferencialmente aquoso (ANDERSON & CONINNG, 1993).

Com relação às substâncias puras, as doses utilizadas nos testes toxicológicos devem respeitar uma escala logarítmica (ANDERSON & CONINNG, 1993), e devem ser realizadas três doses em três concentrações diferentes: a maior dose que causa o menor efeito tóxico (NOAEL dose “*no observed effect level*”), a menor dose que abaixo da dose tóxica manifesta atividade farmacológica para a espécie em estudo (LOAEL dose “*lowest observed effect level*”) e outra dose intermediária (EPA, 1996).

Para avaliar adequadamente os potenciais efeitos de um agente sobre os sistemas reprodutivos, um período prolongado de tratamento é necessário. Por exemplo, os danos causados a espermatogônias serão encontrados nas amostras da cauda do epidídimo ou em ejaculados por 8 a 14 semanas, dependendo da espécie testada. Com alguns agentes químicos que causam bioacumulação, o impacto total sobre um determinado tipo de célula poderia ser ainda mais atrasado, o que poderia causar impacto sobre parâmetros funcionais, como a fertilidade. Em tais situações, a adequação da duração da dosagem é um fator crítico na avaliação do risco (EPA, 1996).

No entanto, segundo a OECD 421 (1995), a combinação de um período de

administração pré-acasalamento de duas semanas e subsequente acasalamento, com observações de fertilidade com um período de dosagem total de, pelo menos, quatro semanas, seguido por histopatologia detalhada das gônadas masculinas, é considerado suficiente para permitir a detecção da maior parte dos efeitos sobre a fertilidade masculina e espermatogênese.

As fêmeas também devem ser dosadas ao longo do estudo. Este inclui duas semanas antes do acasalamento (com o objetivo de cobrir pelo menos dois ciclos completos de estro), o tempo variável a concepção, a duração da prenhez, até o final da lactação. A duração do estudo, após aclimatização, é dependente do desempenho da fêmea e pode durar cerca de 72 dias, (pelo menos 14 dias pré-acasalamento, acasalamento de 14 dias, 22 dias de gestação, 22 dias de lactação) (OECD, 1995). A FIGURA 4 ilustra um esquema adaptado desta norma, com a duração do tratamento em ambos os sexos.

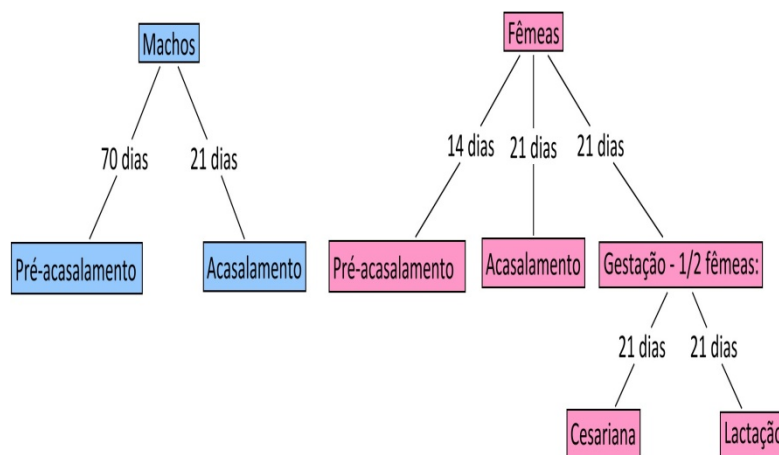


FIGURA 4 Esquema de tempo de tratamento dos animais no estudo de toxicidade crônica, segundo a OECD 421.

A duração da gestação deve ser registrada e é calculada a partir do dia 0 de gestação. Cada ninhada deve ser examinada o mais rapidamente possível após o nascimento para determinar o número e o sexo das crias, natimortos, nascimentos e a presença de anomalias externas. Filhotes vivos devem ser contados e sexados e pesagem das ninhadas a cada 24 horas após o parto (dia 0 ou 1 pós-parto) até o início da puberdade, aos 36, 37 dias pós-parto (OECD, 1995; EPA, 1996).

A utilização de alguns testes para avaliar o desenvolvimento pós-natal dos filhotes de ratos auxiliam a determinar se há alteração quanto ao peso e maturação dos

filhotes pela exposição materna a agentes potencialmente tóxicos (ROBINSON e BRUMLEY, 2005).

Já no nascimento, parte do sistema sensorial está funcionando, mesmo que a parte funcional ainda não esteja completa. Os filhotes desenvolvem respostas a estímulos e aumentam o nível de sensibilidade pouco a pouco, aumentando a capacidade de discriminação e cognição. O desenvolvimento das funções sensoriais ocorre segundo uma sequência, na seguinte ordem, para todos os vertebrados: tátil, vestibular, auditiva e visual (ALBERTS, 1984). A função tátil no recém-nascido está presente apenas em algumas regiões do corpo, a função vestibular pode ser demonstrada com testes de reflexos. Neonatos apresentam reflexo postural logo no dia 1, embora se torne mais evidente com a idade. A geotaxia (reflexo de virar 180° a partir da posição inicial) tem sido considerada uma das respostas reflexas mais características dos ratos (KREIDER e BLUMBERG, 2005).

Já no 2º dia o filhote é capaz de exercer o reflexo de orientação dorso-ventral, visto quando o filhote é posicionado de costas em uma superfície plana. Os filhotes, com o passar do tempo, desenvolvem estratégias para a reorientação dorso-ventral a fim de facilitar o seu desempenho (WHISHAW e KOLB, 2005).

Para a avaliação pré-natal (Segmento II) que se dispõe a avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie expostas durante a fase de organogênese. A administração diária das fêmeas parentais deve começar duas semanas antes do acasalamento e continuar durante toda a gestação (OECD, 1995).

Normalmente, a substância teste é administrada a fêmeas prenhes, pelo menos, a partir da implantação até um dia antes do dia da cesariana, o que deve ser o mais próximo possível do dia normal do parto, sem correr o risco de perda de dados resultante do parto normal. Pouco antes de cesariana, as fêmeas são eutanasiadas e o conteúdo uterino são examinados, e os fetos são avaliados quanto às alterações dos tecidos moles e do esqueleto (OECD, 2001).

As conclusões deste estudo de toxicidade devem ser avaliados em termos dos efeitos observados, achados de necropsia e microscopia dos fetos. A avaliação irá incluir a relação entre a dose da substância e da presença ou ausência, incidência e gravidade das anomalias geradas os filhotes, incluindo lesões macroscópicas e quaisquer outros efeitos tóxicos (OECD, 1995; EPA, 1996).

A exposição intra-uterina a agentes teratogênicos em períodos de desenvolvimento pode levar ao aparecimento de efeitos tóxicos diversos sobre o organismo embriofetal, e

consequentemente, serem observados, ao nascimento, como diferentes alterações, desde a morte, até o nascimento do indivíduo normal (FIGURA 5) (LEMONICA, 2001).

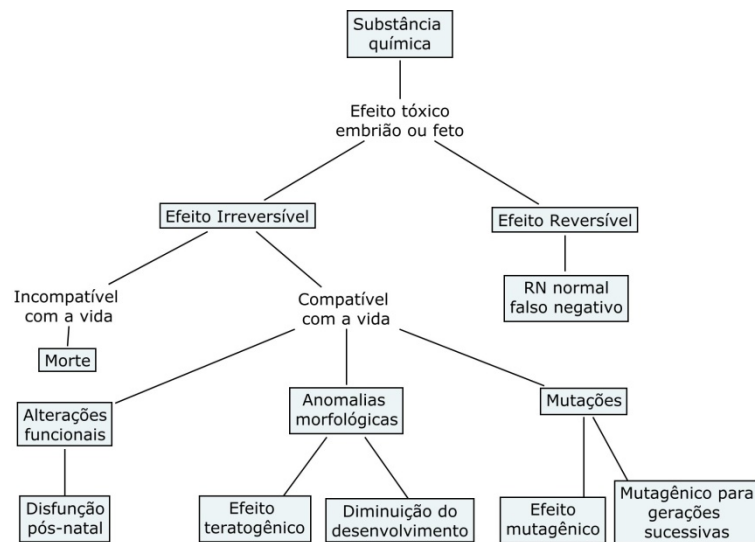


FIGURA 5 Resultados de uma possível exposição materna à agentes químicos durante o período de gestação (LEMONICA, 2001).

3.5.1 Testes de comportamento

A melhor maneira para revelar efeitos reprodutivos induzidos por xenobióticos é investigar todos os parâmetros possíveis. Há vários anos, os investigadores tem cada vez mais monitorado o comportamento animal quando se estudam os efeitos reprodutivos de substâncias (CHAHOULD e FAQI, 1998; FAQI, et al. 1998).

Durante avaliações toxicológicas é necessário proceder algumas análises comportamentais dos animais testados, para garantir o bem-estar e que as manipulações inofensivas e os estímulos estressores não estão induzindo a alterações endócrinas e comportamentais na idade adulta, já que esses efeitos poderiam ser associados ao comportamento materno, em que a mãe estimula com mais frequência e intensidade seus filhotes (BENNETI, 2005).

O comportamento materno em mamíferos é considerado o cuidado que os pais dispensam aos filhotes desde o nascimento até que eles desenvolvam as características e habilidades que vão assegurar a sua sobrevivência. O comportamento materno na rata é muito forte e confiável, tanto em vida livre quanto em condições laboratoriais e pode ser dividido nas seguintes categorias: construção do ninho (Figura 4), amamentação, lamber os filhotes e organização da ninhada (EBISUI, et al., 2009).



FIGURA 6 Construção do ninho para proteção dos filhotes de ratos Wistar, um comportamento maternal. Fonte: Clarissa Hollenbach, 2011.

O período neonatal tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorrem a maturação funcional e ganho de peso corporal, peso este que pode sofrer redução com a exposição a substâncias químicas bem como desordens funcionais e carcinogênese. Por outro lado, o ambiente inicial do neonato é determinado pela mãe que é responsável pela sobrevivência do filhote. A mãe, que é a primeira fonte de conforto térmico, alimentação e limpeza, determina primariamente o desenvolvimento dos sistemas fisiológicos de modulação do comportamento no neonato; o que por sua vez influencia o desenvolvimento da arquitetura do cérebro após o nascimento (CASTRO, 2006). Intervenções na relação mãe-filhote podem afetar comportamentos emocionais e respostas ao estresse na vida adulta (HUOT et al., 2004). Desta forma, a interação mãe-filhote é crucial para o crescimento somático e para o desenvolvimento comportamental.

O modelo de atividade geral em campo aberto foi proposto por Calvin Hall em 1934 para avaliação da emocionalidade de ratos frente a um ambiente novo. Hall definia, em seu trabalho, o termo “emocionalidade” como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas que denotam uma condição de excitação no animal. Walsh e Cummins (1976) reformularam o conceito, passando a defini-lo como uma entidade com componentes afetivos não específicos do comportamento.

Dentre vários modelos comportamentais usados para avaliar efeitos de drogas no Sistema Nervoso Central um dos mais empregados é a atividade geral. A Atividade exploratória de animais de laboratório pode ser analisada pelo modelo do campo aberto (*open-field*), que permite observar como o animal se comporta em amplo ambiente medindo o seu estado emocional (HO et al., 2002).

De acordo com Fernández-Teruel e colaboradores (1991) ratos que foram manipulados durante o período neonatal apresentam uma diminuição do medo, são mais ativos aumentando assim a atividade exploratória e também defecam menos quando expostos a ambientes novos.

Alguns estudos mostraram que estímulos estressantes durante os períodos de diferenciação sexual do sistema nervoso central: pré-natal e logo após o nascimento induzem a alterações estáveis que se manifestam pela diminuição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas (BENNETI, 2005; PADOIN, et al., 2001).

Meisel e Sachs (1994) ressaltam que quando se observa o comportamento sexual no macho devem ser analisados dois aspectos distintos: motivação ou apetite sexual ou ainda libido, e o desempenho ou também chamado de consumação sexual. Apesar da distinção, ambos estão relacionados.

A motivação sexual é avaliada principalmente pela latência para a primeira monta e latência para a primeira intromissão e ambas podem ser alteradas por fatores sensoriais e motores (MEISEL e SACHS, 1994; AGMO, 1997).

O comportamento sexual é um fenômeno muito complicado com o envolvimento de muitos componentes. Estes incluem a participação do sistema endócrino, sistemas nervosos centrais e periféricos. Efeitos sobre o comportamento sexual deve ser considerado como efeito reprodutivo adverso (CHAHOULD e FAQI, 1998).

ARTIGO I

**Assessment of reproductive toxicity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare*
L.) on male Wistar rats**

ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

Chillán, CL

Assessment of reproductive toxicity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) on male Wistar rats

C.B. Hollenbach^a, R. Stedile^a, F.P.S. Mello^a, T.L.Schuch^a, M.R.A. Rodrigues^b, F.B. Mello^c, J.R.B. Mello^a.

^a Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, CEP 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry and Geosciences, Federal University of Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^c Department of Basic Health Science, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, CEP. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Clarissa Boemler Hollenbach – Rua da República, nº 604/6, Cidade Baixa, CEP 90050-320, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: clarissa.hollenbach@gmail.com Telephone number: (55) 51 32091249

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate fertility, through the reproductive aspects of rats chronically treated with the essential oil of oregano. Doses were based in the values defined of Minimum Inhibitory Concentration of essential oil of oregano against *Candida* spp. and increased in an exponential scale. The animals were divided in five groups with 10 males and 30 females each, three groups treated with essential oil at a concentration of 3% Vol/Vol emulsion (GO1) at 9% (GO2) and at 27% (GO3). Negative control received the vehicle, emulsion 0.001% Tween 80 (GC-) and a Positive control treated with thymol and terpin-4-ol, in the concentration found in the essential oil of oregano used, detected by gas chromatography (3% + 3%) (GC+). The males were orally treated daily during seventy days before and twenty one days during the mating. Were evaluated the total number, the daily production and sperm morphology, plasma testosterone dosage, organ histopathology and animal growth. We conclude that the essential oil of oregano at the highest dose tested (GO3) and its positive control, compared to a negative control, interfere in sperm and hormonal parameters evaluated in male Wistar rats under the conditions tested.

Keywords: *Origanum vulgare*, essential oil, rats, fertility, toxicity.

Introduction

Oregano (*Origanum vulgare* L.) is an important plant rich in phenolic compounds with therapeutic actions. Although oregano is a plant native to the Mediterranean, it is grown successfully in the rest of the world throughout the year. Belonging to terpenes series, the essential oil of oregano has a predominance of monoterpenes and sesquiterpenes that have multiple biological activities, in addition they are very effective as insecticides, expectorant, antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory and antioxidant (Sahin et al., 2004; Pavela, 2005; Niero and Malheiros, 2009).

There is a global convergence in the food industry to seek alternative compounds able to ensure the microbial stability of their final products and prevent the action of microorganisms that cause spoilage or causing food borne illnesses. Among several new compounds studied, the essential oil of oregano and its chemical constituents have shown effectiveness in combating the growth and survival of bacterial and fungal contaminants of food, as well as inhibiting the production of microbial toxins and even against fungal species of clinical importance in veterinary (De Souza et al., 2005; Bussata et al., 2007; Cleff et al., 2010).

Studies mention the use of oregano as a preservative in foods of animal origin and as controller of microorganisms and endoparasites and also used as a growth promoter in various species of production animals (Allan and Bilk, 2003; Giannenas et al., 2003, Fukuyama et al., 2005, Bussata, 2007).

In vivo toxicology studies existing of essential oil of oregano are scarce, and of the research are devoted to study the genotoxicity of several species of oregano.

Ipek et al. (2005) evaluated the genotoxic and antigenotoxic effects of the essential oil of *Origanum Onites* L. and carvacrol, through the Ames *Salmonella*/Microsomal test. The mutagenic activity was initially screened using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 with or without metabolic activation. No mutagenicity was found in both strains, however, both samples strongly inhibited mutagenicity. Mezzoug et al. (2007) evaluated the mutagenic and antimutagenic activity test by somatic mutation and recombination (SMART) in *Drosophila melanogaster*, the essential oil of *Origanum compactum* and observed no increase in the number of somatic mutations in the essential oil tested.

Cleff et al. (2008) evaluated the preclinical toxicity of the essential oil of

oregano. Healthy rats received daily oral and intravaginal emulsion 3% Vol/Vol essential oil of *O. vulgare* for 30 days. Clinical, hematological and histopathological were not observed. The authors concluded that there was no significant toxicological alteration in the conditions tested.

Based on potential therapeutic and clinical use of essential oil of oregano, toxicological studies are needed and complementary to ensure safe to the use of formulations containing such oil in its constitution. The objective of this study was to evaluate fertility, through the reproductive aspects of rats chronically treated with the essential oil of oregano.

Materials and methods

Plant material and obtaining the essential oil

The *Origanum vulgare* L. was purchased from commercial distributor, imported by Ricex Import and Export LTDA. Sao Paulo - Brazil. The dried oregano is originally from Peru, belonging to the brand Elizabeth Oseca Laura Assoc La Florida Alto Alianza, Tacna, Peru. The plant material used consisted only of leaves of oregano.

Oregano essential oil was extracted by the method known as steam distillation in the laboratory of the Institute of Chemistry, UFRGS, Porto Alegre / RS Brazil, using equipment adapted for steam distillation without volatile solvents (Schultz et al., 1977). The vapor was collected and condensed in order to separate the water from the oil fraction. The essential oil was maintained in an amber glass recipient well closed, weighted and kept at refrigeration (Brasil, 2010).

Chromatographic analysis of essential oil

The chromatographic analysis of essential oil of oregano were performed in the laboratory of the Institute of Chemistry, UFRGS, Porto Alegre / RS, by gas chromatography with mass detector, split/splitless injector, GC/MS Shimadzu QP-5050A, with a view to identifying the principal chemical constituents. Was used as the ionization method the electron impact (EI) with ionization energy of 70 eV, the capillary column used was OV-5 (methyl silicone 5% phenyl groups) with 0.25 mm internal diameter, 0.25 mm thick film of stationary phase and 30 m in length. In the following chromatographic conditions: 60 ° C - 240 ° to 3 ° C / min at 10 ° C / min to 280 ° C, Td = 180 ° C, Dye = 240 ° C, split = 1:10. Initially, 1µl of solutions of varying

concentrations of standards were injected into the chromatograph to obtain the retention time of standards regarding the main compounds present in samples of oregano (α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, terpinen- α , p-cymene, limonene, 1,8-cineole, terpinen- α , terpinoleno, linalool, terpin-4-ol, α -terpineol, thymol and carvacrol). At later time it was prepared a solution in hexane 5000 ppm oil, which was injected into the chromatograph and compared with respect to retention times of standards in the chromatography column (Rodrigues et al., 2004).

Animals

Adult male (n = 50, 120 days old) and female (n = 150, 90 days old) Wistar rats were supplied by the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), and were housed in polypropylene cages (40 · 33 · 16,5 cm) with shavings as bedding, maintained under controlled temperature (± 22 °C), 50% \pm 5 relative humidity and lighting conditions (12L, 12D photoperiod) and had free access to food and water. Animals were allowed to adapt for at least ten days before the beginning of the experiment. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the UFRGS Ethical Committee for Animal Research (Project n ° 2008067).

Experimental groups

The animals were divided into 5 groups composed of 10 males and 30 females each. The dose used in the experiment which aims to assess toxicity of repeated doses consisted of three doses spaced. Was initially used a therapeutic dose of essential oil of oregano from the values defined of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) obtained in tests *in vitro* against *Candida* isolates, where established a MIC average of 3% for the essential oil of *O. vulgare* (Cleff et al., 2008).

Group I. Treated with essential oil at a concentration of 3% vol/vol emulsion, (GO1) Group II. Treated with essential oil emulsion at a concentration of 9%, (GO2). Group III. Treated with essential oil emulsion at a concentration of 27% (GO3). Group IV. Positive control treated with the combination of phenolic compounds in oregano, thymol and terpin-4-ol, in the concentration found in the essential oil of oregano used, detected by gas chromatography (3% + 3%), (solvent: emulsion containing 0.001%

Tween 80) (GC+). Group V. Negative control treated with emulsion containing 0.001% Tween 80 (GC-) the vehicle of emulsion of essential oil and the positive control (Mondello et al., 2006).

Treatment schedule

All animals in the experimental groups were dosed once daily by gavage, the volume of administration was equivalent to 10ml.kg^{-1} . Male rats were dosed for 91 days (70 days before mating and 21 during mating). Females were dosed before mating (14 days) and during mating (21 days), pregnancy (21 days), and lactation periods (21 days).

Mating procedure

Male rats were housed individually in a cage with wood shavings as bedding. Three nulliparus females were placed into a male cage for 2 hours each (6:00 am to 8:00 am) and vaginal smears were collected (8:00 am) and examined for the presence of sperm. The mating procedure was repeated from Monday to Friday for 3 weeks (EPA, 1996).

Fertility evaluation

After completion of the mating and pregnancy period some reproductive index were calculated to measure to fertility of treated males:

- Mating index: number of sperm positive females/number of mated females X 100;
- Pregnancy index: number of pregnant females/number of sperm positive females X 100;
- Birth index: total number of pups born alive / total number of pups born (live and / or dead) X 100.

Male examination procedure

All male rats were slightly anaesthetized with tiletamin/zolazepan 50% (40 mg /Kg IP) and euthanized by decapitation, on the following day at the end of the treatment. Testes, epididymides, ventral prostate and seminal vesicle were inspected macroscopically, weighed and fixed (with the exception of testes) in 10% neutral buffered formalin for routine processing and light-microscopic evaluation of sections stained with hematoxylin-eosin. One animal/group had its testis removed immediately

after being euthanized. The testis was fixed in Bouin's solution, for histological examination (EPA, 1996).

Plasma testosterone levels

After decapitation, blood was collected from the ruptured cervical vessels in a non-heparinized tube for the determination of plasma testosterone levels. The plasma was obtained after centrifugation (2400 rpm, 20 min) and was frozen at -20°C until the moment of hormonal determination. Plasma testosterone levels were determined by chemiluminescence using a kit of testosterone of the equipment Immulite 1000[®] in the Imuno[®] laboratory, in Porto Alegre, RS, Brazil.

Spermatid and sperm numbers

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) and sperm from cauda epididymis were counted. The testis and epididymides was rinsed and homogenized in 10 ml 0.9 % NaCl containing 0.5 % triton X-100 at medium speed in a Fisaton 720[®] tissuemizer for 1 min, after removal of the albuginea tunic of the testis. The number of homogenization-resistant spermatids was counted in a hemacytometer (Neubauer chamber).

The number of sperm and daily sperm production was determined as follows: Number of sperm (S) = $C_s \times FC \times V$; and daily sperm production – $C_d \times FC \times V$; S = total number per animal. FC = chamber factor (1.250). V = dilution (10^6). C_s = number of sperms counted. C_d = number of homogenization-resistant spermatids counted (EPA, 1996).

Sperm morphology assessment

To evaluate the percentage of morphologically abnormal sperm (defects in head, or tail piece), the ducts deferens was rinsed with 1ML 0.9 % NaCl and a sperm suspension was subsequently obtained. An aliquot of sperm suspension was stained with 2 % eosin to assess the percentage of morphologically abnormal sperm. Two hundred sperm/animal were analyzed microscopically (X400 total magnification) and were recorded as being either morphologically normal or abnormal. The abnormal sperm were classified according to head and cauda defects. The head alterations categories were outstanding, malformation and missing. The cauda alterations categories were outstanding, broken and cauda with intense folding (EPA, 1996).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey test was used to identify differences between groups and in the control groups. Proportions were analyzed by the Chi-square test. Statistical evaluation was performed using Excel and SPSS for Windows program and $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively, was considered significant.

Results

Chromatographic analysis

The chromatographic peaks shown in FIGURE 1 represent the compounds of oregano essential oil in greater quantities in the analyzed sample using chromatographic standards cis-sabinene hydrate (27.46%), thymol (17.97%), terpin-4-ol (10.55%). The compounds terpinen-4-ol and thymol are those which could be manipulated to administer to animals, is as represented by the peaks 15 and 22.

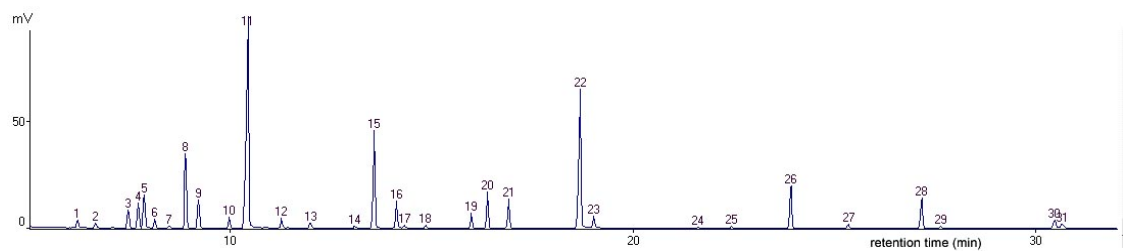


FIGURE 1. Total ion chromatogram (GC / MS) of the essential oil of oregano sample, prepared in a solution of 1000 mg L⁻¹ in hexane. Major peaks identified as: 11 (cis-sabinene hydrate), 15 (terpin-4-ol) and 22 (thymol).

Body weight gain

The oral dosing for 91 days, prior and during the mating period, with essential oil of oregano at 3%, 9% and 27% Vol/Vol did not induce death or systemic toxicity. Animals treated with different concentrations of oregano essential oil showed no reduction in body weight gain. In the TABLE 1 are presented the final body weight and organ relative weights of rats.

Plasma testosterone levels

The plasma testosterone levels shown in FIGURE 2 decreased significantly in GO2 and GO3 groups in relation to the negative control group.

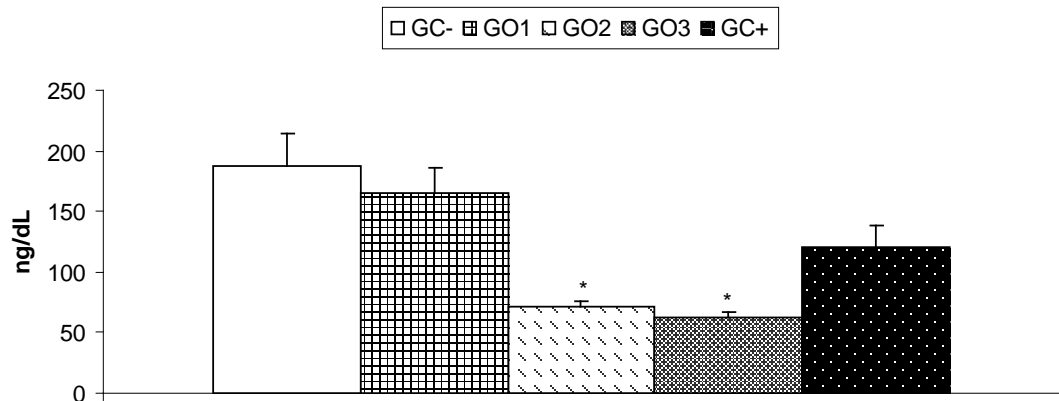


FIGURE 2. Plasma testosterone levels of rats treated for 91 days with an emulsion containing essential oil of oregano at different doses: 3% (GO1), 9% (GO2) and 27% (GO3) negative control (GC-) and positive control (GC+). Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0, 05$ compared to the negative control group. Anova test with post-test of Tukey.

TABLE 1. Final body weight and organ relative weights of male rats: negative control (GC-), positive control (GC+) Tymol 3% + terpin-4-ol 3%, GO1 (3%), GO2 (9%) e GO3 (27%).

	GC- (n=10)	GC+ (n=10)	GO1 (n=10)	GO2 (n=10)	GO3 (n=10)
Final B W (g)	432.1 \pm 13.8	417.9 \pm 10,3	431.4 \pm 15,9	435.3 \pm 16,4	408.7 \pm 18,9
Heart	0.134 \pm 0.01	0.262 \pm 0.01	0.194 \pm 0.01	0.193 \pm 0.02	0.213 \pm 0.03
Spleen	0.086 \pm 0.02	0.167 \pm 0.01	0.113 \pm 0.01	0.133 \pm 0.01	0.145 \pm 0.01
Liver	1.743 \pm 0.19	3.138 \pm 0.09	1.898 \pm 0.03	2.432 \pm 0.17	2.762 \pm 0.29
Stomach	0.221 \pm 0.01	0.422 \pm 0.12	0.291 \pm 0.01	0.327 \pm 0.03	0.366 \pm 0.02
Kidney right	0.156 \pm 0.01	0.293 \pm 0.01	0.190 \pm 0.01	0.243 \pm 0.02	0.229 \pm 0.02
Kidney left	0.157 \pm 0.01	0.284 \pm 0.01	0.182 \pm 0.01	0.235 \pm 0.02	0.234 \pm 0.02
Testicle right	0.208 \pm 0.01	0.354 \pm 0.01*	0.268 \pm 0.01	0.292 \pm 0.02	0.193 \pm 0.03*
Testicle left	0.215 \pm 0.01	0.353 \pm 0.01*	0.264 \pm 0.01	0.293 \pm 0.02	0.196 \pm 0.01*
Epididymis right	0.076 \pm 0.01	0.133 \pm 0.01*	0.092 \pm 0.01	0.114 \pm 0.01	0.101 \pm 0.02
Epididymis left	0.070 \pm 0.01	0.138 \pm 0.01*	0.097 \pm 0.01	0.118 \pm 0.01	0.108 \pm 0.02
Ventral prostate	0.064 \pm 0.01	0.105 \pm 0.01	0.066 \pm 0.01	0.102 \pm 0.01	0.104 \pm 0.02
Seminal vesicle	0.093 \pm 0.01	0.150 \pm 0.01*	0.115 \pm 0.01	0.115 \pm 0.02	0.129 \pm 0.02

* Significantly different ($P < 0.05$) from negative control group. Data analyzed by Anova and Tukey test. Values are expressed in mean \pm SEM.

Reproductive index

As can be seen in TABLE 2 the number the pups, body weight and the birth index did not differ between groups. Both the highest dose, GO2 and GO3 showed statistically significant difference in index of mating, but only GO3 presents statistical difference in pregnancy index and number of pups per litter.

TABLE 2. Reproductive indexes of females treated with: negative control (GC-), positive control (GC+) Tymol 3% + terpin-4-ol 3%, GO1 (3%), GO2 (9%) e GO3 (27%).

	GC-	GC+	GO1	GO2	GO3
Mating index (%)	76.7	73.3	56.7	40*	40*
Pregnancy index (%)	91.3	95.5	100	83.3	8.3*
Birth index (%)	100	100	100	100	100
Pups per litter	9.1 ± 0.5	8.9 ± 0.7	10.4 ± 0.5	8.8 ± 0.6	3* ^a
Pups body weight (g)	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.1	6.2 ^a

* Significantly different ($P < 0.01$) from negative control group. Data analyzed by Qui-Square. Values are percentages and means/group ± SEM.

^a Values obtained from single offspring born in that group.

Sperm parameters

The number of sperm in the caudal epididymis in male rats treated with emulsion containing essential oil of oregano at different concentrations resulted in statistically significant differences at the higher dose (27% Vol/Vol) and the positive control (GC+) (TABLE 3). Spermatid number and daily sperm productions also resulted in statistically significant differences at the median and the higher dose (9% and 27% Vol/Vol) and the positive control (GC+) (TABLE 3).

TABLE 3. Adult male rat sperm parameters (numbers and morphology): negative control (GC-), positive control (GC+), Tymo 3% + terpin-4-ol 3%, GO1 (3%), GO2 (9%) e GO3 (27%).

	GC-	GC+	GO1	GO2	GO3
Spermatid number (x10 ⁶ /testis)	280.5 ± 8,5	160 ± 9,3*	273.4 ± 19.4	193.5 ± 2.9*	94.9 ± 11.1*
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	46 ± 1.4	25.9 ± 1.6*	55.6 ± 3.3	31.6 ± 0.7*	15.5 ± 2.6*
Number total of spermatozoa (x10 ⁶ /epididymis)	1478.5 ± 52.1	699.6 ± 63.3*	1597 ± 58	1347.9 ± 56.4	396 ± 80.4*
Sperm with morphological Alterations (Caput/Cauda) (%)	4.2 ± 0.3	14.6 ± 0.7 ^a	3.4 ± 0.3	8.9 ± 0.6 ^a	17.9 ± 0.8 ^a

*Significantly different (P<0. 05) from control group. Data analyzed by ANOVA and Tukey test. ^a Significantly different (P<0. 01) from control group. Data analyzed by Chi-square. Values are means/group ± SEM.

Histology

Light microscopic evaluation presented morphological alterations in testicular tissue of male rats treated with essential oil of oregano at 27% (GO3). Degenerative alterations in testicle included areas of seminiferous tubules with cellular rarefaction, vacuolization of cells of the base and absence of sperm within the tubules.

Discussion

The present work aimed the influence of administration of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) on sperm parameters and fertility of the male rats, as part of reproductive toxicology evaluation of said essential oil.

The monitoring of weight during the period of treatment provides an indication of the animal's health status, which can provide important information regarding toxicity (US EPA, 1996). Analysis of body weight measured revealed no difference in weight gain between the three groups treated with essential oil and control groups, this result supports the hypothesis of no systemic toxicity in treated animals during the treatment period.

The result of the present study demonstrated that the essential oil acted directly on the sexual organs reducing the weight and causing tissue injury of the testis at the highest dose used these changes may be associated with metabolic disorders, as testosterone levels are also decreased. The direct action from oregano essential oil at the

highest dose used (27% V/V) on the testes too is responsible for the reduction in the sperm concentration and the production of abnormal gametes it may also play an adverse role on the Leydig cell, affecting testosterone production as suggested by Chen et al. (2007). Alterations in Leydig cells functions, the blood-testis barrier and the testicular vascular system as well as reactions of the local immune system may be considered as indirect effects resulting in a reduced fertility (Pflieger-Bruss, 2004).

The fertility of males treated with essential oil of oregano decreased in a dose dependent. In the intermediate dose (9%) only the rate of mating was affected, but the highest dose (27%), than the low rate of mating, males that mated failed to fertilize the females and only one pregnancy occurred. This is explained by the low daily production and number of sperm stored and the high rate of abnormal sperm. According with Working (1988), if the number of normal sperm per ejaculation is sufficiently low, fertilization is unlikely and an infertile condition exists, and second Chenoweth (2005) sperm structure can play a substantial role in both fertilization and pregnancy outcome.

This result corroborates the results found by Sharma and Jacob (2001) that evaluated the contraceptive efficacy of the *Mentha arvensis* leaves, also from Lamiaceae family, aqueous solution of the extract (10 mg/day/mice) when administered orally for 20, 40 and 60 days caused fertility inhibition and while maintaining their normal sexual behavior. With the increase in treatment duration, there occurred a corresponding decrease in the mean weight of testis and accessory organs of reproduction, sperm concentration, motility and viability in the caudal epididymis were also decreased.

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L. - Lamiaceae) was assessed by the effect of the short-term administration of aqueous extract on vital organs, on the organs of the reproductive system and sperm production of mature male Wistar rats. The results showed that the acute administration of the extract of *R. officinalis* at a dose of 291.2mg and 582.4 mg/kg body weight for five days, in the lower the extract did not significantly affect the body weight and organ not interfere with the production of gametes However, animals treated with the higher dose showed significant weight increase of the seminal vesicle but no significant alteration of the other variables. (Sá et al., 2006).

Another monoterpene, the Citral was tested on the male reproductive system by Illayperuma (2008). He concluded that Citral in a dose of 300mg/kg body weight by single intraperitoneal injection for 14 consecutive days in rats leads to reduction in weights of the testes, epididymis, seminal vesicles, prostate and plasma testosterone

levels.

The positive control group, containing the major compounds of the essential oil of oregano, thymol and terpin-4-ol, behave in this study, similar to the groups treated with the essential oil as regards of sperm counts, morphological changes in the sperm and the plasma testosterone concentration (the plasma testosterone without statistical significance but decreased). This confirms that some compounds such as thymol, used alone can cause toxicity, as described by Buyukleyla and Rencuzogullari (2009). However, the terpin-4-ol, the literature review demonstrated no toxic effect alone, except in high concentrations (Fletcher et al., 2005). However, having been used a relatively low dose the positive control group did not affect the fertility potential of animals, not affecting the female reproductive index.

In the positive control with the major compounds observed a weight increase of seminal vesicle, epididymides and testes. An increase in the weight of reproductive organs is under hormonal control and could suggest a disturbance of the reproductive endocrine functions (Elbetieha et al., 2001). The pituitary gland is responsible for the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), which act on the testes. Any damage to this gland could interfere with the male reproductive system, thus affecting the production of sex steroid hormones and male gametes (Mahony and Hodgen, 1995).

The essential oil of *Origanum vulgare* L. as well as other essential oils has potential for the development of new drugs as a claim recent research (Henriques et al., 2009, Liu et al., 2009). This study confirms that under the conditions tested the oil only is harmful when used in very high doses. The toxicity of essential oils does not entirely depend on high concentrations. All essential oils are very toxic at very high doses, many essential oils are inherently toxic at very low concentrations due to very others toxic components (Azirak and Recuzogullari, 2008). For this reason, care must be taken when using them in food industry, pharmaceutical or perfumery.

Conflict of interest

No conflict to disclose.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) for the financial support.

References

- Allan, P., Bilkey, G. 2005. Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63, 716–721.
- Azirak, S., Rencuzogullari, E. 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 728 – 735.
- Bussata, C., Mossi, A.J., Rodrigues, M.R.A., et al. 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 610-616.
- Buyukleyla, M., Rencuzogullari, E. 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72,943–947.
- Brasil. Farmacopeia Brasileira. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5a ed. Brasília, p. 548.
- Chen, H., Midzak, A., Luo, L-D., Zirkin, B. R. 2007. Aging and decline of androgen production. In: *Leydig cell in health and disease*. Contemporary endocrinology, 2, 117-131.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Sallis, E.S. et al. 2008. Toxicidade Pré-Clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (orégano) em Ratas Wistar. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 704-709.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Faria, R.O. et al. 2010. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 1291-1294.
- Chenoweth, P.J. 2005. Genetic sperm defects. *Theriology*, 64, 457-468.
- De Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, T.O., Trajano, V.N., Barbosa filho, J.M. 2005. Orégano (*Origanum vulgare* L, Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. *Revista Higiene Alimentar*, 19, 40-45.
- Elbetieha, A., Bataineh, H., Darmani, H., Al-Hamood, M.H. 2001. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicology Letters*, 119, 193-201.
- Fasseas, M.K., Mountzouris, P.A., Tarantilis, M. et al. 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, 106, 1188–1194.
- Fletcher, J.P., Cassela, J.P., 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.
- Fukayama, E.H., Berchini, A.G., Geraldo, A. et al. 2005. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 2316-2326.
- Giannenas, I.P., Florou –paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N.A. Spais, A.B. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archiv Tierernahrung*, 57, 99-106.

- Henriques, A.T., Simões-Pires, C.A., Apel, M.A. 2009. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. (Orgs.) Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2 ed., Univali, Itajaí, p. 221-249
- Ilayperuma, I. 2008. Effects of intraperitoneal administration of Citral on male reproductive organs in the rat. Galle Medical Journal, 13, 29-32.
- Ipek, I., Zeytinoglu, H., Okay, S. et al. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry. 93, 551–556.
- Liu C-X., Xiao P-G, Peng Y., Song N-N. 2009. Challenges in Research and Development of Traditional Chinese Medicines. Chinese Herbal Medicines, 1(1), 1-28.
- Milos, M., Mastelic, J.; Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp. hirtum*). Food Chemistry, 71, p. 79-83.
- Mondello, F., Bernardis, A., Girolamo, A. Cassone A., Salvatore, G. 2006. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. BMC Infect Disease, 6, 158.
- Mahony, M.C., Hodgen, G.D. 1995. Toxic effects on the hypothalamus-anterior pituitary-gonadal axis, control on the male and female reproductive system, and related issues. In: Witorsch RJ (Ed.) Reproductive toxicology. Raven Press, New York, pp. 195-213.
- Mezzoug, N. Elhadri, A., Dallouh A. et.al. 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 629, 100-110.
- Niero, R.; Malheiros, A. 2009. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. (Orgs.) Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2 edição, ed. Univali, Itajaí. p. 259-278.
- Pavela, R. 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia, 76: 691– 696.
- Pflieger-Bruss, S., Schuppe, H-C., Schill, W-B. 2004. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. Andrologia, 36, 337–345.
- Rodrigues, M.R.A., Krause, L.C., Camarão, E. et al. 2004. Chemical composition and extraction a yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3042 – 3047.
- Sá, R.C.S., Leite, M.N., Oliveira L.E.G., et al. 2006. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. Revista Brasileira de Farmacognosia, 16, 324-332.
- Sahin, F., Gulluce, M., Daferra A, D. et al .2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15, 549-5557.
- Schultz, T.H., Flath, R.A., Mon, T.R., Egging, S.B., Teranishi. R. 1977. Isolation of Volatile Components from a Model System. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 25, 446-449.

Sharma, N., Jacob, D. 2002. Assessment of reversible contraceptive efficacy of methanol extract of *Mentha arvensis* leaves in male albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 9-13.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) 1996. Guidelines for reproductive risk assessment [EPA/630/ R-96/009].

Working, P.K. 1988. Male reproductive toxicity: comparison of the human to animal models. *Environmental Health*, 77, 37- 44.

ARTIGO II

Effects of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) (Lamiaceae) on general reproductive performance and teratology in Wistar rats

ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

Elmsford, N.Y

Effects of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) (Lamiaceae) on general reproductive performance and teratology in Wistar rats

C.B. Hollenbach^a, R. Stedile^a, F.P.S. Mello^a, R. S. Bing^a, T.L. Schuch^a, M.R.A. Rodrigues^b, F.B. Mello^c, J.R.B. Mello^a

^a Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, CEP 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry and Geosciences, Federal University of Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^c Department of Basic Health Science, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Cep. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Clarissa Boemler Hollenbach – Rua da República, nº 604/6, Cidade Baixa, CEP 90050-320, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: clarissa.hollenbach@gmail.com Telephone number: (+55) 51 32091249

Abstract

The aim of this study was assess the effects of essential oil of *Origanum vulgare* (L.) on fertility, general reproductive performance and teratology to Wistar rats. The animals were divided in five groups with 10 males and 30 females each, females were treated orally with 3%, 9% and 27% Vol / Vol, a negative control with the emulsion vehicle (distilled water + 0.001% Tween 80) and a positive control the majors compounds of essential oil, thymol and terpinen-4-ol 3%/3%, from 14 days pre mating, mating, 21 days of pregnancy and 21 days of lactation. Reproductive indexes were calculated and maternal behavior was evaluated. Cesarean sections were performed in the half pregnant rats on day 21 of pregnancy and the fetuses were examined for external malformation and skeletal alteration. The data showed that the essential oil and positive control interfered in the fetal skeleton anomalies and the higher dose of essential oil (27%) had preimplantation loss and induced embryotoxicity as indicated by post-implantation loss, without any signs of maternal toxicity, under the conditions tested.

Keywords: essential oil, *Origanum vulgare*, fertility, teratology, embriotoxicity.

1. Introduction

Essential oils are volatile substances extracted from aromatic plants, formed by

structures shaped by terpenes, sesquiterpenes, phenolics, phenylpropanoids, that give their organoleptic characteristics, thus providing the raw materials of great importance for food, cosmetic and pharmaceutical [1].

Oregano (*Origanum vulgare* L.) is able to extract important essential oil, which has phenolic compounds such as thymol, carvacrol, and monoterpene alcohols, α -terpineol and γ -terpinene. According to literature, the essential oils of the *Origanum vulgare* present about 34 active compounds, and the phenolic compounds can achieve among 80.2% to 98% of the total composition of the oil [2]. The essential oil is responsible for the property like antimicrobial, antifungal and antioxidant [3].

Because of these therapeutic properties, the essential oil of oregano has been used in various sectors to humans and animals, as well as perfumery and pharmaceutical industry has been used as antimicrobial food, as a preservative in foods of animals origin and the controller of microorganisms and endoparasites and also used as a growth promoter in various species of production animals [4], [5], [6], [7], [8] and [9].

However there are many searches about applications of essential oil of oregano and other oils and investigations into their isolated compounds but not much information about female reproductive performance and teratology. This study was conducted to evaluate the effects of essential oil of *Origanum vulgare* on fertility, general reproduction and teratology in rats. Our study aims to facilitate therapeutic use of this substance, which has already proven the effectiveness *Candida* species and *Sporothrix Shenckii* [10] and *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* [11]. This is part of a more comprehensive evaluation of the reproductive toxicity of essential oil of oregano designed in three segments as recommended by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and by Guidelines of Food and Drug Administration (FDA).

2. Materials and methods

2.1. Obtain the essential oil of oregano

The leaves of *Origanum vulgare* L. was purchased from commercial distributor, imported by Ricex Import and Export LTDA. Sao Paulo - Brazil. The dried oregano is originally from Peru, belonging to the brand Elizabeth Oseca Laura Assoc La Florida, Alto Alianza, Tacna, Peru. Oregano essential oil was extracted by steam distillation in the laboratory of the Institute of Chemistry, UFRGS, Porto Alegre / RS Brazil, using

equipment adapted for steam distillation without volatile solvents [12]. The vapor was collected and condensed in order to separate the water from the oil fraction. One Kilogram of dried leaves was placed inside the equipment to obtain the essential oil, after extraction, the oil were stored in amber vials, kept refrigerated until use [13].

2.2 Chromatographic analysis of essential oil

The chromatographic analysis of essential oil of oregano were performed in the laboratory of the Institute of Chemistry, UFRGS, Porto Alegre / RS, by gas chromatography with mass detector, split/splitless injector, GC/MS Shimadzu QP-5050A, with a view to identifying the principal chemical constituents. Was used as the ionization method the electron impact (EI) with ionization energy of 70 eV, the capillary column used was OV-5 (methyl silicone 5% phenyl groups) with 0.25 mm internal diameter, 0.25 mm thick film of stationary phase and 30 m in length. In the following chromatographic conditions: 60 ° C - 240 ° to 3 ° C / min at 10 ° C / min to 280 ° C, Td = 180 ° C, Dye = 240 ° C, split = 1:10. Initially, 1µl of solutions of varying concentrations of standards were injected into the chromatograph to obtain the retention time of standards regarding the main compounds present in samples of oregano (α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, terpinen- α , p-cymene, limonene, 1,8-cineole, terpinen- α , terpinoleno, linalool, terpin-4-ol, α -terpineol, thymol and carvacrol). Later it was prepared a solution in hexane 5000 ppm oil, which was injected into the chromatograph and compared with respect to retention times of standards in the chromatography column [14].

2.3 Animals

Male (n = 50, 120 days old, 300 – 400 g) and female (n = 150, 90 days old, 200 – 270 g) albino Wistar rats were supplied by the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and were housed in individual polypropylene cages (40 x 33 x 20 cm male and 30 x 20 x 19 cm female) and were kept under constant conditions: a day/night cycle (lights on: 8:00– 20:00), a room temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ relative humidity. The animals received a standard pelleted diet (Nuvilab CR 1, Paraná, Brazil) and water *ad libitum* during the experiment. Breeding, housing and experimental procedures

followed guidelines published in the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the UFRGS Ethical Committee for Animal Research (Project n ° 2008067).

2.4 Treatment

The animals were divided in five experimental groups 10 males and 30 females each, a negative control group treated with the vehicle of the preparation of essential oil (0.001% Tween 80) (GC-) [15]. A positive control treated with the combination of phenolic compounds of oregano, thymol and terpin-4-ol, in the concentration found in the essential oil of oregano used, detected by gas chromatography (3% + 3%), and three groups treated with oregano essential oil, GO1- treated with essential oil at a concentration of 3% Vol / Vol emulsion with vehicle, GO2- treated with essential oil at a concentration of 9% Vol / Vol emulsion with vehicle, GO3- treated with essential oil at a concentration of 27% Vol / Vol emulsion with vehicle. All experimental groups were treated by gavage every day. The males were treated during 91 days (70 before the mating and 21 during the mating) and the females were treated for 14 days prior the mating, during the mating, extending over pregnancy (21 days) and lactation period until day 21 after parturition.

2.5 Mating procedure and diagnosis of pregnancy

Males were housed single in a cage with wood shavings as bedding. Three nulliparous females were placed into a cage of one male in the last 2 hours of the dark cycle (6:00–8:00 h) when females are removed from the cage of the males vaginal smears were assessed for presence of sperm. If the sperm was detect in the smear the first 24 hours is considered day 0 of gestation. The mating procedure was repeated every day for 15 mating sessions with duration of 3 weeks, with an interval of two days between each weekly session.

2.6 Fertility evaluation

After completion of the mating and pregnancy period some reproductive indexes are calculated to measure to fertility of treated females according to EPA, 1996 [16], they are:

-Mating index: number of sperm positive females/number of mated females X 100;

-Pregnancy index: number of pregnant females/number of sperm positive females X 100;

Delivery index: number of females delivering/number of pregnant females X 100;

Birth live index: number of live offspring/number of offspring delivered X 100;

Viability index: number of live offspring at lactation day 4/number of live offspring delivered X 100;

Weanling index: number of live offspring at day 21/number of live offspring born X 100;

-Post-implantation loss index: number of implantation sites/number of live fetuses/number of implantation sites X 100.

2.7 Maternal reproductive performance

The pregnant females were randomly assigned for the experimental group that experienced cesarean section or normal delivery, 50%/50%. All females were treated during the entire period of gestation and were weighed daily. Pregnant females were also observed for signs of resorption, dystocia and prolonged duration of pregnancy.

Females were selected for full-term pregnancy had their maternal behavior recorded on video and analyzed on days 1, 5 and 10 postnatal, during the light period. The video recordings were performed for 20 minutes after the experimental procedures (gavage). The behavior observed during the video recording was the act of licking and breast-feeding pups with the arched back, according Azevedo (2005) [17].

2.7.1 Normal Delivery

All assigned females to carry out normal delivery had the birth of their offspring. From day 21 of pregnancy the cage were inspected for births and the day 1 of birth was designed as 0 days postnatal. The number of infants viable and dead was recorded and pups were sexed and weighed. Any newborn death 0 days postnatal was considered to be a stillbirth. At weaning (postnatal day 21) all dams were pre-anesthetized with fentanyl citrate (0.02 mg / Kg) and euthanized with an overdose of anesthetic (sodium thiopental 100 mg / Kg) [18] and subjected to a postmortem examination. All major organs were inspected macroscopically and weighed (heart, liver, spleen, kidney, ovaries and uterus) and then were fixed in 10% neutral buffered formalin solution for

histopathological evaluation.

2.7.2 Cesarean Section

On day 21 of pregnancy the females assigned to the cesarean [19] were anesthetized with tiletamine + zolazepam hydrochloride (50mg / Kg) and performed a cesarean after euthanized with an overdose of anesthetic sodium thiopental (100 mg / Kg) [18]. The gravid uterus was weighed with contents, resorptions and live and dead fetuses were counted and the number of implantation sites was determined. All live fetuses were immediately weighed, numbered with marker pen, examined for externally visible malformations and were euthanized with an overdose of anesthetic (sodium thiopental 100mg/Kg) and fixed in a 5% solution of formalin. All fetuses were examined for skeletal anomalies after clearing with trypsin and staining with alizarin red S [20]. The degree of ossification was evaluated using proposed parameters [21].

2.8 Statistics

The data were analyzed by one – way analysis of variance (ANOVA) and using Tukey test tested differences between groups, to compare maternal weight gain, fetus weight and maternal behavior. The chi-square test was used to evaluate differences in the indexes analyzed and skeletal abnormalities in fetus. Statistical evaluation was performed using SPSS and EXCEL programs, and a difference was considered and the level of significance was set at $P < 0.05$ for ANOVA and $P < 0.01$ for chi-square.

3. Results

3.1 Chromatographic analysis

Chromatographic analysis of essential oil of oregano is shown in FIGURE 1. Represents the compounds present in greater quantities in the sample used in this experiment using chromatographic standards cis-sabinene hydrate (27.46%), thymol (17.97%), terpin-4-ol (10.55%) are present as a majority. The compounds thymol and terpinen-4-ol are those which could be manipulated to administer to animals to compose de positive control group is as represented by the peaks 15 and 22.

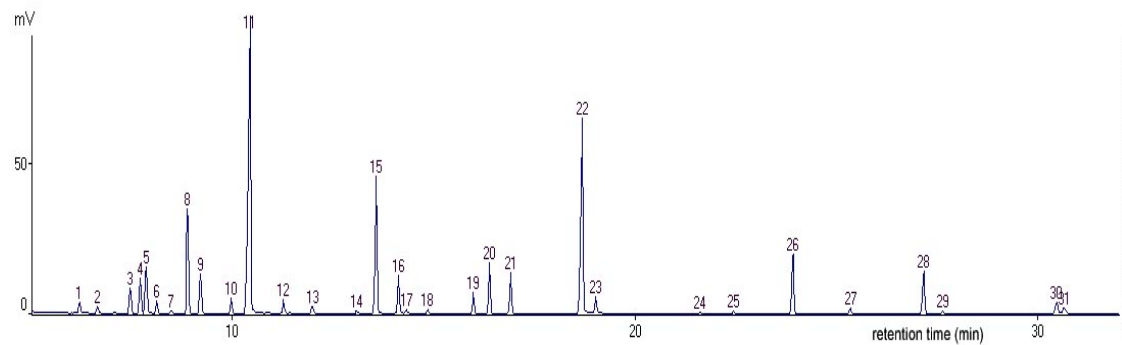


FIGURE 1. Total ion chromatogram (GC / MS) of the essential oil of oregano sample, prepared in a solution of 1000 mg L⁻¹ in hexane.

3.2 Body weight

No signs of toxicity were apparent or deaths were induced in female rats treated orally during pre-mating, mating, pregnancy and lactation with emulsion of oregano essential oil in three doses (3%, 9% and 27% Vol / Vol) [14]. There was no statistically significant difference between treated groups and the negative and positive control groups with respect to maternal weight and offspring nor about the pregnancy was weight gain observed at any dose level. There was no difference in absolute and relative organ weights between groups (TABLE 1).

Table 1. Initial and final body weight of gestation and relative organs weight (%) from dams treated during pre-mating, mating, pregnancy and lactation periods, with: negative control (n = 9), positive control (n = 9), GO1 (n = 7), GO2 (n = 6).

	GC-	GC+	GO1	GO2
<i>Initial Body weight</i> <i>Op (g)</i>	226.2 ± 14.4	242.6 ± 8.5	218.7 ± 3,0	225.7 ± 9.5
<i>Final body weight</i> <i>21p (g)</i>	309.4 ± 6.8	332.1 ± 13.7	307.3 ± 9,8	315.4 ± 9.6
<i>Heart</i>	0.31 ± 0.005	0.30 ± 0.009	0.33 ± 0.007	0.30 ± 0.006
<i>Spleen</i>	0.18 ± 0.006	0.22 ± 0.005	0.18 ± 0.007	0.18 ± 0.005
<i>Liver</i>	4.43 ± 0.096	6.05 ± 0.128	4.39 ± 0.099	4.73 ± 0.242
<i>Right Kidney</i>	0.30 ± 0.005	0.42 ± 0.011	0.30 ± 0.003	0.24 ± 0.053
<i>Left Kidney</i>	0.29 ± 0.005	0.40 ± 0.013	0.29 ± 0.004	0.29 ± 0.005
<i>Right Ovary</i>	0.03 ± 0.013	0.04 ± 0.020	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001
<i>Left Ovary</i>	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001
<i>Uterus</i>	0.12 ± 0.006	0.17 ± 0.018	0.12 ± 0.006	0.14 ± 0.007

Data were analyzed by ANOVA ($p > 0,05$). Values as mean ± SE, no significant difference among groups was observed. (0 p = day 0 of pregnancy and 21 p = 21 day of pregnancy).

3.3 Outcome of fertility

As can be seen in TABLE 2, there was statistically difference in the proportion of females impregnated by male rats (mating index) among GO2 and GO3 from negative and positive control group, and the rate of pregnant females was statistically difference among GO3 and the negative and positive control group, GO1 and GO2. In the post-implantation loss index there was statistically difference only in GO3 compared with negative control group and the others groups.

TABLE 3 shows the indexes of females that had a birth, as the index of delivery, live birth, viability and weaning, none of the variables showed difference statistically significance among the control groups. TABLE 4 shows the ratios of females who experienced cesarean as uterine weight, number of pups per litter and body weight of pups at birth, Neither them showed difference statistically significance among the control groups. In the GO3 the only female pregnant was destined to have normal delivery.

TABLE 2. Outcome of fertility tests in female rats treated with: negative control (GC-), positive control with the compounds thymol (3%) and terpin-4-ol (3%) (GC+), GO1 (3%), GO2 (9%) and GO3 (27%).

Outcome	GC-	GC+	GO1	GO2	GO3
<i>Mated females (n)</i>	30	30	30	30	30
<i>Mated males (n)</i>	10	10	10	10	10
<i>Sperm-positive females (n)</i>	23	22	17	12*	12*
<i>Pregnant females (n)</i>	21	21	14	10	1*
<i>Mating index (%)</i>	76.6	73.3	56.7	40*	40*
<i>Pregnancy index (%)</i>	100	100	100	100	100
<i>Post-implantation loss index (%)</i>	5.8	4.1	1.5	3.8	62.5*

Data were analyzed by Chi-square test. * Significantly difference (P < 0.01) from control group.

TABLE 3. Reproductive index from dams treated with: negative control (GC-), positive control with the compounds thymol (3%) and terpin-4-ol (3%) (GC+), GO1 (3%), GO2 (9%) and GO3 (27%), to give birth. Values represent mean and SEM of the litters and percentages.

Reproductive index	GC-	GC+	GO1	GO2	GO3
<i>N° (dams) pups</i>	8 (70)	10 (98)	7 (85)	5 (42)	1 (3)
<i>Number per litter (pups)</i>	8.75 ± 0.8	9.8 ± 0.7	10.6 ± 1.4	8.4 ± 1.1	3
<i>Pups body weight (g)</i>	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.05 ± 0.1	6.4 ± 0.4	6.2
<i>Delivery index (%)</i>	100	100	100	100	100
<i>Birth live index (%)</i>	100	84.8	100	100	100
<i>Viability index (%)</i>	100	91.1	98.5	100	100
<i>Weanling index (%)</i>	100	100	98.1	97.2	100

Data were analyzed by Chi-square test.

TABLE 4. Reproductive index from dams treated with: negative control (GC-), positive control with the compounds thymol (3%) and terpin-4-ol (3%) (GC+), GO1 (3%), GO2 (9%) with the caesarian section performed on pregnancy day 21 (Values represent mean and SEM of the litters).

Reproductive index	GC-	GC+	GO1	GO2
N° (dams) pups	12 (112)	9 (98)	8 (82)	5 (47)
Gravid uterus weight (g)	65.1 ± 5.1	59.2 ± 6.3	71.3 ± 3.5	63.1 ± 3.4
Number per litter (pups)	9.3 ± 0.8	9.8 ± 1.1	10.25 ± 0.4	9.4 ± 0.8
Pups body weight (g)	4.98 ± 0.1	4.99 ± 0.04	5.24 ± 0.07	4.83 ± 0.05
N° of pups with external malformations	0	0	0	0

Data were analyzed by Chi-square test.

3.4 Maternal Behavior

The Figure 2 represents the duration (time) of the maternal behavior of licking the pups. Figure 3 shows the duration of the behavior of breast-feeding with back arched. The group GO3 could not have it maternal behavior compared to the other groups, because there was only one female. In any of the two parameters evaluated was not found statistically significant difference when compared to the negative control group (GC-).

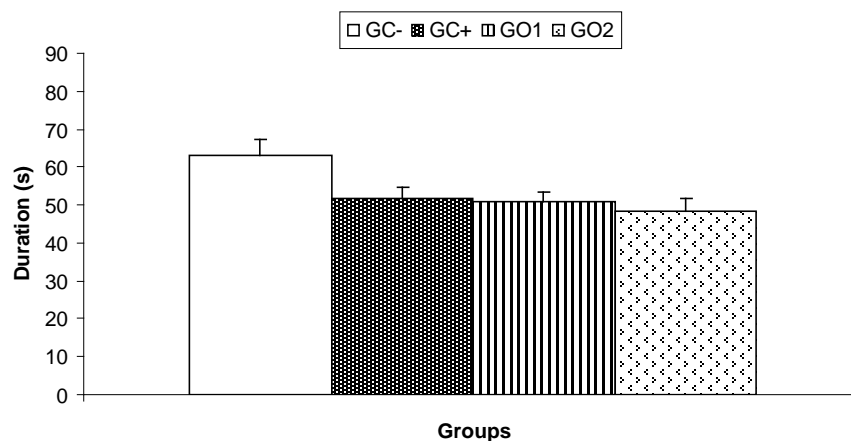


Figure 2. Mean ± SEM duration of licking behavior in the rat pups from litters of GC-(n = 9), GC + (n = 9), GO1 (n = 7) and GO2 (n = 5) (ANOVA $p = 0.084$).

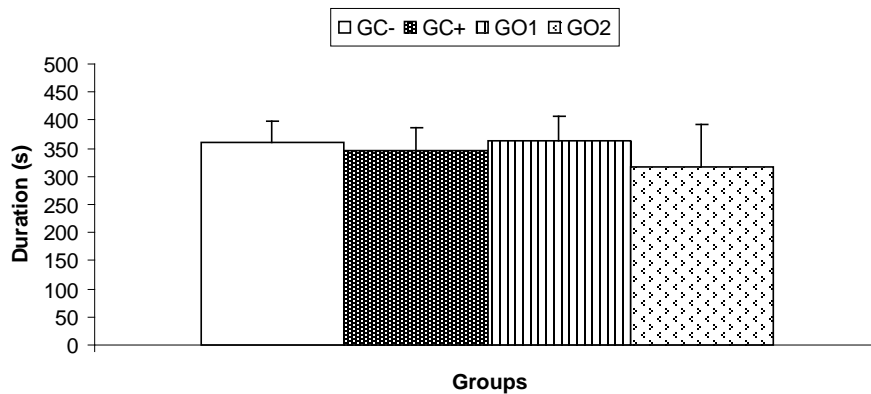


Figure 3. Mean \pm SEM duration of breast-feeding with back arched behavior in the rat pups from litters of GC- (n = 9), GC + (n = 9), GO1 (n = 7) and GO2 (n = 5) (ANOVA $p = 0.883$).

3.5 Histopathological evaluation

By analysis of the sexual and metabolic organs of females who gave birth at term were not observed inflammatory, degenerative and circulatory compatible with toxic lesions (Data not shown).

3.6 Fetal evaluation

There were no externally visible malformations in either group. The effects of prenatal exposure to *Origanum vulgare* oil in two concentrations on occurrence of fetal skeleton abnormalities are shown in Table 5. Were evaluated in GC- 12 litters, GC+ 11 litters, 5 litters in GO2, and 6 litters in GO1, the GO3 group could not be evaluated in this parameter as the only female pregnant was destined to have normal delivery. As shown in Table 5, only in a few cases, the incidence of fetal skeleton anomalies seemed to have been altered by treatment with essential oil of oregano and his positive control.

There was statistically significant difference in the percentage of fetuses with skeleton abnormalities between the negative control groups and the other groups, despite the high incidence of supernumerary ribs in all groups.

Table 4. Occurrence of skeletal abnormalities from dams treated with essential oil of oregano in two concentrations: GO1, GO2 and positive control (GC+) compared with negative control (GC-), during pre-mating, mating and pregnancy with the caesarian section performed on pregnancy day 21.

	GC-	GC+	GO1	GO2
Fetuses examined (n)	97	87	54	49
Fetuses with skeleton abnormalities (%)	31.9	56.3*	59.2*	61.2*
Fetuses with poorly ossification (%)	21.6	32.2	24.1	22.4
Fetuses with abnormalities in (%)				
Skull				
Os interparietalis incomplete ossification	1.03	1.15	0	0
Fusion os interparitalis with os frontalis	0	0	11.1	0
Fusion os supraoccipitalis with os temporalis	0	1.15	0	0
Os supraoccipitalis bipartite	0	3.45	0	0
Fusion of zygomatic	0	1.15	0	2.04
Sternum				
Sternebra irregular shaped	0	1.15	0	0
Addicional ossification center	2.06	3.4	0	0
Sternebra abcence	1.03	1.15	1.85	0
Thorax				
Ribs Bent	0	0	0	2.04
Irregular shaped	0	0	1.85	0
Supernumerary ribs	26.8	32.2	33.3	22.4
Vertebral column				
Vertebral arches irregular shaped	0	1.15	0	2.04
Ossification center bicentric	0	0	5.55	0
Additional ossification center	1.03	2.3	1.85	0
Fusion of the sacral vertebrae	0	1.15	0	0
Sacral vertebrae abcence	0	0	0	2.04

Data were analyzed by Chi-square test.

* Significantly difference ($P < 0.01$) from control group.

4. Discussion

In the present study the administration of essential oil of oregano in three concentrations did not affect body weight and the consumption of water and food during the pre-mating, pregnancy and lactation period (Data not shown). The relative organ weights did not differ among the groups. These results suggest that administration of essential oil of oregano in the three tested doses did not cause maternal toxicity.

The extent to which maternal toxicity affects development has been widely discussed in the context of risk assessment. It has been widely debated whether embryo/fetal toxicity is secondary to maternal toxicity [22].

The treatment during pregnancy: pre-implantation, implantation and organogenesis, GO1 and GO2 was not impaired uterine growth because the weight of the fetuses to term showed no statistically significant difference. However, GO3 had preimplantation loss, since the females were diagnosed with pregnancy but did not lead

to pregnancy to term and had no implantation sites in uterus inspected. The high rate of post-implantation loss in GO3 was calculated in the only female in the group who had pregnancy, even so, may be indicative of embryotoxicity.

The preimplantation period of pregnancy is considered to be "All or none" the period during which maternal exposure to exogenous agents may cause embryo lethality [23]. According with the Stanley and bower [24] at the undifferentiated stage of zygote proliferation and before implantation, exposure to a teratogen usually either kills the fertilized ovum which results in a spontaneous resorption, or spares it completely.

Benavides et al. [25] investigated the effect of the aqueous extract of *Origanum vulgare* on the preimplantational mouse embryo development. The aqueous extract was given *ad libitum* at pregnant mice: 0, 9, 18 and 36 mg/mL. When the embryos were evaluated in the fourth gestational day, a slight delay in the embryo development was observed, but only with the highest dose. With respect to embryo quality, an increase of degenerated embryos was observed but this was not significant.

Some constituents of many essential oils have been used extensively in cosmetic fragrances and as flavoring additives in the food industry. One study aimed to provide data on the embryo-fetotoxic potential of monoterpene β -myrcene in the rat concluded what the administration orally (0.25, 0.5 and 1.2g/kg) to Wistar rats from day 6 to 15 of pregnancy, was toxic to the rat embryo [26]. Another monoterpene the α -terpinene (30, 60, 125 and 250 mg/kg) was administered in corn oil was given by gavage to female Wistar rats from day 6 to 15 of pregnancy. Caesarean sections were performed on day 21 of pregnancy. A reduction in body weight and uterine weight indicated that the two highest doses tested (125 and 250mg) were maternally toxic. The highest dose (250 mg/kg) reduced the ratio of pregnant/treated female. Signs of delayed ossification and a higher incidence of minor skeletal malformations were observed at doses of 60 mg/kg or more [27].

Evaluation of maternal behavior in this experiment was carried to ensure the welfare and manipulations harmless and stressors are not inducing the endocrine and behavioral changes in the offspring, since these effects could be associated with maternal behavior, in which the mother stimulates more frequency and intensity with their pups [28].

Maternal behavior emerges soon after birth with the hormonal changes that occur late in pregnancy. In the first days of life of pups mothers spend up to 85% of total time with them [29]. Behavior manifested by the pursuit of the puppies when they

move away from the nest, by stimulating urination by anogenital licking, by positioning over the puppies to provide them with nutrition and heat and construction of the nest [30]. The administration of essential oil of oregano and its positive control during the pre-mating gestation and lactation did not affect the variables of maternal behavior evaluated, act of licking and breast-feeding pups with the arched back.

In order to assess the risk of essential oil is causing teratogenicity were observed first and second categories, according Chahoud et al. [31]. The GO3 cannot be evaluated because it had one litter what born at term. Therefore, beyond the negative and positive control groups, GO1 and GO2 were evaluated. The prevalence of skeletal malformations in fetuses in this study was low and did not showed a dose dependent manner but was statistical difference in the percentage of fetuses with skeleton abnormalities. The treatments produced a higher incidence of malformations skeletal that otherwise often occurs spontaneously in this species; all groups had a high incidence of supernumerary ribs. The term supernumerary is considered malformation by Solecki [32] however anomalies which also occur in controls, so called spontaneous anomalies or variations [33]. According to Neubert and Kavlock [33], a special point of controversy may arise when a substantial increase in a defined type of "variation" is observed in a study. While many investigators do not give too much weight to such deviations from normal development if they occur in the absence of clear-cut abnormalities, there have been some agencies suggesting that such increased rates of variations may be judged as an indication of a "teratogenic" potential.

Since we did not evaluate visceral abnormalities, does not exclude the possibility that soft tissue anomalies might be increased at lower exposure levels.

In the course of a scientific evaluation all possible deviations from normal reproduction and development should be taken into account, including many other toxicological and kinetic aspects, a considerable controversy exist in defining what weight should be given to the individual types of manifestations deviating from normal, or from controls [33].

5. Conclusion

In conclusion, the evidences point to the absence of maternal toxicity and no relevant teratogenic effects at the doses tested, however, the higher dose of essential oil of *Origanum vulgare* suggested embryotoxic effect and caused preimplantational losses. Therefore, became necessary complementary studies for attesting these data, given that

the essential oil is a substance complex, and determinations of new dosage strength and tests in other species are necessary.

6. Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

References

- [1] Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* 2009, 32: 588-594.
- [2] Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, Christaki E, Chatzpolou PS, Tsiligianni T, et al. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science*, 2005, 46: 595-601.
- [3] Sahin, F.; Gulluce, M.; Daferera, D.; Sokemen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M.; et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 2004, 15: 549-557.
- [4] 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*, 2001, 67: 187-195.
- [5] Amrik B, Bilkei G. Influence of farm application of oregano on performances of sows. *The Canadian Veterinary Journal*, 2004; 45: 674–677.
- [6] Fukayama EH, Bertechini AG, Geraldo A, Kato RK, Murgas LDS. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2005, 34: 2316-2326.
- [7] Busatta A C, Mossi AJ, Rodrigues MRA, Cansian RL, Oliveira JV. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007, 38: 610-616.
- [8] Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M, Zervas G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, 2007, 106: 1188–1194.
- [9] Roofchae A, Mehrdad I, Ebrahimzadeh MA, Akbari MR. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10: 6177-6183.
- [10] Cleff MB, Meinerz ARM, Schuch LFD, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Mello

JRB et al. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008, 60: 513-516.

[11] Cleff MB, Meinerz ARM, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010, 62:1291-1294.

[12] Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Egging SB, Teranishi R. Isolation of Volatile Components from a Model System. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, 25: 446-449.

[13] Brasil. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5a ed. Brasília, 2010, p. 548.

[14] Rodrigues MRA, Krause LC, Camarão EB, Santos JG, Dariva C, Oliveira JV. Chemical composition and extraction a yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52:3042 – 3047.

[15] Mondello F, Bernardis A, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. BMC Infect Disease, 2006, 6; 158.

[16] EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Federal Register 1996, 61(212):56274-56322.

[17] Azevedo, M.S. Efeito de intervenções no ambiente neonatal sobre a relação mãe-filho e o comportamento na idade adulta. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre. 2005. 100 p.

[18] CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais. Resolução N°1.000, 2012.

[19] OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 414 - Prenatal Developmental Toxicity Study, 22 January, 2001.

[20] Taylor W, Van Dyke GC. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Cybium 1985, 9; 107–119.

[21] Chahoud I. Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats. CD-ROM, Leipzig, 1996.

[22] Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. Reproductive Toxicology 1999, 13: 375–381.

[23] Lemonica IP, Damasceno DC, Stasi LC. Study of the embryotoxic effects of extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1996, 29: 223-227.

- [24] Stanley F, Bower C. Teratogenic drugs in pregnancy. *Medicine Journal of Australia*. 1986, 145: 596- 599.
- [25] Benavides V, D'arrigo G, Pino J. Efecto del extracto acuoso de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) en embriones preimplantacionales de ratón. *Revista Peruana de Biología*. 2010, 17: 381-384.
- [26] Delgado I F, Carvalho RR, Nogueira ACMA, Mattos AP, Figueiredo LH, Oliveira SHP, et al. Study on embryo-foetotoxicity of β -mircene in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 1993, 31; 31-35.
- [27] Araujo IB., Souza CAM, De-Carvalho RR, Kuriyama S.N., Rodrigues RP, Vollmer RS. Study of the embryofetotoxicity of *α -terpinene* in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 1996; 34: 477 – 482.
- [28] Benneti F. Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta. UFRGS, 2005. 87p.
- [29] Numan M. Maternal Behavior. In: Kobil E and Neill J. (eds) *The physiology of reproduction*. Raven press (New York) 1994 p. 221-302.
- [30] Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VBV. Rato. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM (eds). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. Atheneu, São Paulo, Brazil, 2009. p. 229 – 250.
- [31] Chahoud I, Bochert G, Neubert D. Dose response relationships in reproductive toxicology. In: Neubert D, Kavlock RJ, Merker H-J, Klein J. (eds.). *Risk assessment of prenatally-induced adverse health Effects*. Springer-Verlag, 1992. p. 227 -244.
- [32] Solecki H, Bürgin J, Buschmann R, Clark M, Duverger O, Fialkowski P et al. Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. *Reproductive Toxicology*, 2001, 15: 713–721.
- [33] Neubert D, Kavlock RJ. Introduction. In: Neubert, D., Kavlock, R.J., Merker, H-J, Klein, J. (eds.) *Risk assessment of prenatally-induced adverse health Effects*. Springer-Verlag, 1992. p. 1-23.

ARTIGO III

Desenvolvimento pós-natal da prole de ratos Wistar expostos ao óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante o período pré-natal

ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Belo Horizonte - MG.

Desenvolvimento pós-natal da prole de ratos Wistar expostos ao óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante o período pré-natal

C.B. Hollenbach^a, R. Stedile^a, F.P.S. Mello^a, R. S. Bing^a, P.P. Da Rosa^a, M.R.A. Rodrigues^b, F.B. Mello^c, J.R.B. Mello^a.

^a Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmento Leite n° 500, sala 204, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) Av. Sarmento Leite n. 245 Cep. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Clarissa Boemler Hollenbach – Rua da República, n° 604/6, Cidade Baixa, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: clarissa.hollenbach@gmail.com Telefone (55) 51 32091249

RESUMO

Neste estudo avaliou-se o efeito do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre o desenvolvimento geral, motor, neuroendócrino e comportamental da progênie de ratos Wistar expostos ao óleo essencial durante estudo de toxicidade reprodutiva. O óleo essencial do orégano foi testado em três concentrações, 3% (GO1), 9% (GO2) e 27% Vol / Vol (GO3), um controle negativo (GC-) tratado com o veículo da emulsão do orégano Tween 80 (0,01%) e um controle positivo (GC+) contendo os compostos majoritários (3% / 3% Vol / Vol) da amostra de óleo detectados por cromatografia em fase gasosa. Foram avaliadas em GO1: sete ninhadas, GO2: seis ninhadas, GO3: uma ninhada, GC-: 9 ninhadas e em GC+: 9 ninhadas. Para tanto, observou-se diariamente as características de desenvolvimento e testes de reflexos dos filhotes e na puberdade um macho e uma fêmea de cada ninhada foram eutanasiados para análise histopatológica e dosagem hormonal nos machos, também se analisou o comportamento em campo aberto, na idade adulta, foram formados casais não consanguíneos para a verificação do comportamento sexual. Concluímos que o tratamento dos pais não comprometeu o desenvolvimento dos filhotes e também não determinou mudanças comportamentais à progênie de ratos Wistar.

Palavras-chave: rato, filhote, óleo essencial, *Origanum vulgare*, toxicidade reprodutiva

ABSTRACT

This study evaluated the effect of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) on the overall development, motor, behavioral and neuroendocrine of rats progeny exposed to the essential oil during reproductive toxicity study. The essential oil of oregano was tested in three concentrations: 3% (GO1), 9% (GO2) and 27% vol / vol (GO3), a negative control (GC-) treated with the emulsion vehicle of oregano Tween 80 (0.01%) and a positive control (CG +) containing the major compounds (3% / 3% vol / vol) of oil sample detected by chromatographic gas phase. Were evaluated in GO1: seven litters, GO2: six litters, GO3: one litter, GC-: 9 litters and GC +: 9 litters. In order to assess, it was observed daily the characteristics of development and testing of reflexes of pups and at the puberty a male and a female from each litter were euthanized for histological and hormonal dosage in males, also analyzed the behavior in the open field, at the age adult couples were formed not consanguineous for verification of sexual behavior. We conclude that treatment of parents not compromised the development of the pups and also did not determine behavioral changes to offspring rats.

Keywords: rat, pup, essential oil, *Origanum vulgare*, reproductive toxicity

INTRODUÇÃO

Do orégano (*Origanum vulgare* L.) é possível extrair importante óleo essencial que possui compostos fenólicos, como timol, carvacrol, além de alcoóis monoterpênicos, α -terpineol e γ -terpineno e esse óleo essencial é responsável pela conhecida propriedade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (MILOS et al., 2000; CHAMI, et al., 2004; KABOUCHE et al., 2005).

Múltiplos estudos comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos frente a várias espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Penicilium italicum* e *Fusarium oxysporum*, assim como frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (PASTER et al., 1990; TANTAOUI-ELARKIi et al.,1993; DAOUK et al., 1995; CHAMI et al., 2004; CLEFF et al., 2010).

Outros estudos mencionam o uso de orégano como conservante em alimentos de origem animal, uso no controle de endoparasitas e como promotor de crescimento em várias espécies de animais de produção (ALLAN e BILK, 2003; GIANNENAS et al, 2003, FUKUYAMA, et al., 2005, BUSSATA, 2007).

Nas fases pré e pós-natal de ratos, 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 (ZENICK e KLEGG, 1989).

Em vistas ao potencial terapêutico do óleo de *Origanum vulgare* L. são necessários estudos toxicológicos complementares, estudos químicos e potenciais terapêuticos do óleo essencial de orégano vêm sendo desenvolvidos pelo grupo em cooperação com grupos de pesquisa da UFPel (Micologia da Faculdade de Veterinária e Instituto de Química), sendo os estudos toxicológicos indispensáveis desde o efeito aos progenitores até o desenvolvimento completo de suas ninhadas, tendo em vista as possibilidades terapêuticas promissoras que este óleo essencial apresenta no momento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção do óleo essencial

O *Origanum vulgare* L. foi adquirido de distribuidor comercial, importado por Ricex Importação e Exportação LTDA. São Paulo - Brasil. O orégano é originalmente do Perú, pertencente à marca Elizabeth Oseca Laura, Assoc La Florida, Alto Alianza, Tacna, Perú. O material vegetal utilizado consistiu apenas de folhas de orégano. O óleo essencial do orégano foi extraído pelo método conhecido como destilação a vapor no laboratório do Instituto de Química, UFRGS, Porto Alegre / RS Brasil, utilizando equipamentos adaptados para destilação a vapor sem solventes voláteis (SCHULTZ et al., 1977). O vapor foi recolhido e condensado a fim de separar a água da fração de óleo. O óleo essencial foi pesado e mantido em um recipiente de vidro âmbar bem fechado, sob refrigeração (BRASIL, 2010).

Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica do óleo essencial do orégano foi realizada no laboratório do Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre / RS, por cromatografia gasosa com detector de massas, injetor split / splitless, GC / MS Shimadzu QP-5050A, com vista a identificar os principais constituintes químicos. Foi usado como o método de ionização por impacto de electrons (EI) com energia de ionização de 70 eV, a coluna capilar utilizado foi OV-5 (metil silicone grupos fenilo 5%) com 0,25 mm de diâmetro

interno, 0,25 mm de espessura de película de fase estacionária e 30 m de comprimento. Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas: 60 ° C - 240 ° C a 3 ° C / min a 10 ° C / min até 280 ° C, Td = 180 ° C, Ti = 240 ° C split, = 1:10. Inicialmente, 1µl de soluções de diferentes concentrações dos padrões foram injetados no cromatógrafo para obter o tempo de retenção dos padrões em relação aos compostos principais presentes em amostras de orégão (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, terpinen- α , p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinen- α , terpinoleno, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, timol e carvacrol). Posteriormente, foi preparada uma solução de óleo em hexano 5000 ppm, que foi injectada no cromatógrafo e comparada em relação a tempos de retenção dos padrões na coluna de cromatográfica (RODRIGUES et al., 2004).

Animais

Foram utilizados na geração parental, ratos Wistar, machos (n = 50) e fêmeas (n= 150) com 120 dias de idade provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o experimento os animais foram mantidos em biotério sob condição constante de umidade (50% \pm 5), temperatura (21°C \pm 2) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, foram alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os animais (geração parental) foram tratados diariamente, por via oral, com sonda orogástrica, machos durante 91 dias, 70 antes e 21 dias durante o acasalamento, fêmeas pelo menos por 56 dias, 14 pré-acasalamento, 21 dias de gestação e 21 dias de lactação. O acasalamento teve duração de 21 dias, com um intervalo de 2 dias a cada 5 dias, na caixa de cada um dos machos foram introduzidas três fêmeas virgens, permanecendo com eles duas horas por dia (das 6h às 8h), correspondendo ao final do período escuro.

Alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram às normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996), obedecendo às leis brasileiras: Lei Nº 11.794, DE 8 de outubro de 2008; Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979; Decreto n.º 24.645 de 10 de Julho de 1934. O projeto (nº 2008067) teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de animais, CEUA / UFRGS.

Protocolo experimental

Para a formação dos grupos parentais os animais foram divididos em 5 grupos compostos de 10 machos e 30 fêmeas cada. A dose utilizada no experimento, que teve como objetivo avaliar a toxicidade de doses repetidas consistiu em três doses espaçadas exponencialmente. Foi inicialmente utilizada uma dose de óleo essencial de orégano a partir dos valores definidos de concentração inibitória mínima (MIC) obtidos em testes *in vitro* frente a linhagens de isolados de *Candida*, onde foi estabelecida uma CIM média de 3% para o óleo essencial de *O. vulgare* (Cleff et al., 2008). Foram formados 5 grupos: Grupo I. tratado com emulsão de óleo essencial na concentração de 3% Vol /Vol, com o veículo (GO1), Grupo II. tratado emulsão de óleo essencial na concentração de 9% Vol /Vol, com o veículo (GO2). Grupo III. tratado com emulsão de óleo essencial na concentração de 27% Vol /Vol, com o veículo (GO3). Grupo IV. Controle positivo tratado com a combinação de compostos fenólicos do orégano, timol e terpinen-4-ol, na concentração encontrada no óleo essencial do orégano, detectado por cromatografia em fase gasosa (3% + 3%), (solvente: emulsão contendo 0,001 % de Tween 80) (GC +). Grupo V. controle negativo tratado com água destilada contendo 0,001% de Tween 80 (CG -) o veículo da emulsão de óleo essencial e do controle positivo (MONDELLO et al., 2006).

AVALIAÇÃO DA PROLE

Desenvolvimento pós-natal

O desenvolvimento pós-natal da prole das fêmeas paridas foi observado desde o dia do nascimento (dia zero). As ninhadas, padronizadas em 4 machos e 4 fêmeas foram pesadas diariamente até o dia 36 pós-natal e os filhotes individualmente nos dias 0, 7, 14 e 21. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico geral no qual foi observado o dia do aparecimento da penugem, descolamento do pavilhão auricular, erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento do pêlo, abertura dos olhos e desenvolvimento sexual, quando foi observado o dia da descida dos testículos, a separação prepucial e abertura do canal vaginal. Após o desmame (22º dia de lactação), os animais foram colocados em caixas coletivas.

Testes reflexos

A partir do nascimento, as proles foram avaliadas quanto aos reflexos individuais dos filhotes de acordo com Whishaw e Kolb (2005) sendo observados em

diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, sendo eles: *a) Reflexo de Endireitamento*: do 2º ao 5º dia pós-natal (DPN) o animal foi colocado em decúbito dorsal e foi registrado o tempo gasto para voltar à posição normal (60s). *b) Resposta de Agarrar*: do 14º ao 17º DPN, os animais foram encorajados a agarrar-se com as duas patas dianteiras numa barra cilíndrica, ficando suspensos por no máximo 20 segundos. *c) Geotaxia Negativa*: no 7º, 8º, 9º e 10º DPN os animais foram colocados com as quatro patas sobre um plano inclinado de 30º, com a cabeça virada para o lado mais baixo desta; o reflexo foi considerado formado se o animal girar seu corpo a 180º, se reorientando (60s).

Eutanásias da prole na puberdade

Um macho e uma fêmea de cada ninhada, selecionados aleatoriamente, foram eutanasiados na puberdade a partir do 65º dia.

Machos

Os machos foram eutanasiados por decapitação, com anestesia prévia utilizando Tiletamina + Zolazepan (50 mg.kg⁻¹) nesta ocasião, coletou-se o sangue do tronco encefálico para dosagem hormonal. Os órgãos sexuais foram removidos: testículos, epidídimos, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata. Também foram retirados os rins, fígado, baço e coração de cada um dos animais, pesados e fixados em solução de formalina neutra tamponada a 10% com exceção do testículo, para avaliação histopatológica.

Cada testículo e cada cauda de epidídimo foram triturados e homogeneizados em 10 ml de NaCl 0,9% contendo 0,05% de Triton X-100, em triturador tecidual Fisaton 720[®] a uma velocidade de 600 rpm, durante 1 minuto. O macerado resultante foi acondicionado em microtubos individuais, sendo retirado de cada macerado, um volume correspondente a 100µl. Cada microtubo foi acrescido de 900µl de solução de NaCl 0,9%, chegando a um volume final de 1 mililitro. Desse volume foi realizada a contagem do número total de espermatozóides (cauda do epidídimo), e o número de espermátidas por animal (testículo), sendo utilizada para tanto uma câmara de Neubauer, em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. O número de espermatozóides e sua produção diária foram determinados pelas seguintes fórmulas:

$S = C \times FC \times V$ (espermatozóides) e $S = C \times FC \times V \div 6,1$ (produção diária) sendo que:

S = soma total por animal, C = número de espermatozóides ou espermátidas contados,

FC = fator câmara (1,250) e V = diluição (10^6).

Dosagem de testosterona plasmática

O sangue foi colhido em um tubo não heparinizado para a determinação dos níveis de testosterona no plasma. O plasma foi obtido após a centrifugação (2400 rpm, 20 min) e foi congelado a -20°C até ao momento da determinação hormonal. Os níveis de testosterona plasmática foram determinados por quimioluminescência usando um kit de testosterona do equipamento Immulite 1000[®] no Imuno laboratório[®], em Porto Alegre, RS, Brasil.

Fêmeas

As fêmeas foram eutanasiadas no dia do estro, confirmado por citologia vaginal, receberam como medicação pré-anestésica fentanila ($0,05\text{ mg.kg}^{-1}$) e anestesia com tiopental sódico (50 mg.kg^{-1}), via intraperitoneal (IP). Após, foram removidos e inspecionados o fígado, baço, coração, rins, ovários e útero. Cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica e fixados em solução de formalina neutra tamponada a 10% e foi alvo de análise histopatológica.

Teste de comportamento em campo aberto

O comportamento da prole foi testado aos 75 dias de idade, por meio do teste de campo aberto, foram analisadas as categorias comportamentais: atividade exploratória caracterizada pela locomoção total e permanência no centro, “*escanear*” e “*rearing*” permanecer sobre duas patas traseiras para investigar o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais, respectivamente e auto-limpeza - número de vezes que o animal utilizou as patas dianteiras para limpeza (AZEVEDO, 2005).

Comportamento sexual

O comportamento sexual dos filhotes foi avaliado aos 100 dias de idade. Foram constituídos casais não consanguíneos, dentro de cada um dos grupos experimentais. A citologia vaginal identificou as fêmeas em estro, as quais foram consideradas aptas para avaliação. O acasalamento ocorreu em uma caixa acrílica com maravalha no período escuro, sendo utilizada uma lâmpada vermelha para iluminação (15W). O macho foi colocado 10 minutos antes da fêmea para adaptação. A gravação foi iniciada no momento de introdução da fêmea, com duração de 20 minutos. Posteriormente, a fêmea

foi avaliada quanto a presença de espermatozóides na citologia vaginal e/ou tampão vaginal. Os parâmetros de comportamento avaliados foram: na fêmea a receptividade, medida pelo quociente de lordose (divisão do número de lordoses pelo número de montas) e no macho o tempo de latência para primeira monta, latência para primeira intromissão, número de montas incompletas (sem intromissão), número de intromissões (CHAHOUUD e FAQI, 1998).

Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm). As diferenças, nas análises quantitativas entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste de Tukey e, as variáveis qualitativas, como tempo para o aparecimento das características de desenvolvimento de filhotes e alterações morfológicas nos espermatozóides foram analisadas pelo teste qui-quadrado. O nível de significância foi estabelecido para uma confiança de 99% ($P < 0,01$) para o teste qui-quadrado e de 95% ($P < 0,05$) para o teste ANOVA (LAPONI, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do óleo essencial

Na análise do óleo essencial do *O. vulgare* foi evidenciada a presença de 31 compostos, sendo que os principais constituintes identificados, usando padrões cromatográficos, foram cis-sabineno hidratado (27,46%), timol (17,97%) terpinen-4-ol (10,55%) (Fig.1). Os constituintes químicos encontrados no óleo estudado estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (BUSATA, 2006; CLEFF et al., 2008, SILVA, et al. 2009) apenas com algumas variações.

Com base na figura os compostos terpinen-4-ol e timol se apresentaram nos picos 15 e 22, são os compostos passíveis de manipulação que se apresentaram como majoritários.

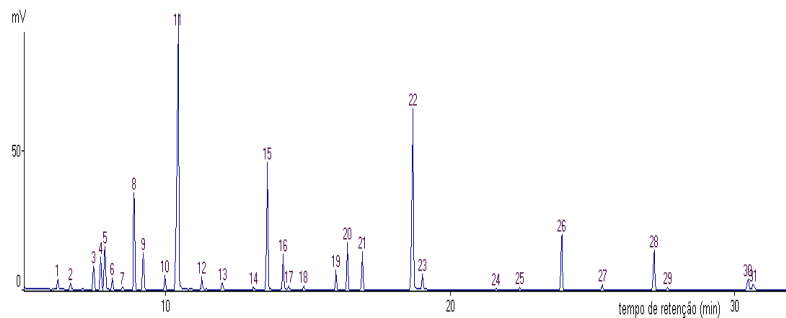


Figura 1. Cromatograma do íon total (GC/MS) da amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de 1.000 mg L^{-1} , em hexano. Os picos representam os compostos majoritários da amostra.

Desenvolvimento ponderal

A Fig. 2 apresenta o desenvolvimento ponderal das ninhadas nascidas de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano em três concentrações (GO1, GO2 e GO3), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) durante o período de gestação e lactação. A progênie foi acompanhada desde dia 0 pós-natal (DPN) até o 37 DPN, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos e o grupo controle negativo (ANOVA $P > 0,05$) e o crescimento observado é compatível com o esperado para a espécie (PASSOS et al., 2000). Este resultado corrobora com os encontrados com fitoterápicos por Mello et al. (2008) e Mello et al. (2009), onde o tratamento dos progenitores não afetou o desenvolvimento ponderal das ninhadas.

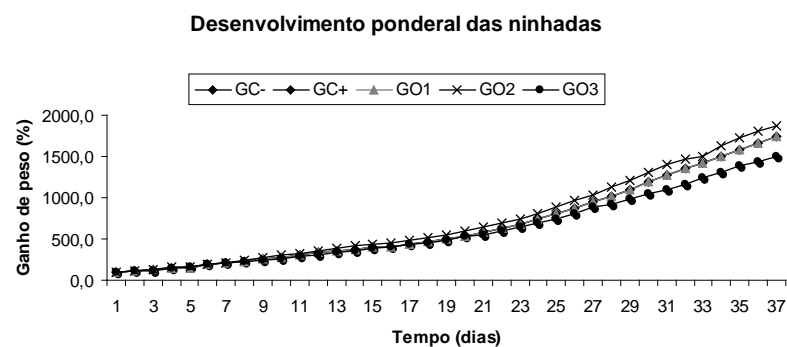


Figura 2. Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%) das progênies desde o nascimento até o 37º dia, nascidos de ratos tratados com o óleo essencial do orégano a 3% (GO1), 9% (GO2) e 27% (GO3) e GC+ comparados a um grupo controle negativo (GC-). Os valores representam a média percentual dos grupos.

Desenvolvimento físico e motor

Não houve diferença no período de aparecimento das características de desenvolvimento físico dos filhotes dos grupos tratados com óleo essencial de orégano (GO1, GO2 e GO3) e GC+ em relação aos filhotes do controle negativo (GC-) apesar de que GO3 não pôde ser comparado estatisticamente com os demais por se tratar de apenas uma ninhada, como pode ser visto na Tab. 1. A única ninhada nascida no grupo GO3 se desenvolveu perfeitamente, pois eram apenas três filhotes sobreviventes de uma perda pós- implantacional materna durante a gestação. Segundo Mello e Langeloh (2006) o desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais.

De acordo com Robinson e Brumley (2005) a observação de características de maturação dos filhotes, como a erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento do pêlo e abertura dos olhos é essencial para avaliar o efeito de um agente tóxico sobre o desenvolvimento cerebral pós-natal.

Tabela 1. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual de filhotes de ratos Wistar tratados por 91 dias (pais) e 77 dias (mães) com óleo essencial de orégano, 3% e 9% (GO1 e GO2), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+).

Característica	GC- (n = 58)	GC+ (n = 67)	GO1 (n = 55)	GO2 (n = 36)
Descolamento de orelhas	2,5 ± 0,5	3,0 ± 0,6	2,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
Aparecimento da penugem	5,5 ± 0,5	5,5 ± 0,5	5,5 ± 0,5	5,5 ± 0,5
Aparecimento de pelos	8	7,5 ± 0,5	8	8
Erupção de incisivos	9,0 ± 0,5	10,0 ± 0,7	8,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5
Abertura dos olhos	13,0 ± 0,7	13,0 ± 0,7	13,5 ± 0,5	13,5 ± 0,6
Descida dos testículos	16,5 ± 0,7	18,5 ± 0,6	16,5 ± 0,7	18,5 ± 0,5
Separação prepucial	36,0 ± 0,5	36,5 ± 0,7	36,0 ± 0,5	37,0 ± 0,6
Abertura do canal vaginal	37,0 ± 1,0	34,5 ± 1,1	35,0 ± 1,0	35,0 ± 0,9

Dados analisados por Qui-quadrado ($P > 0,01$).

A partir do 2º dia pós- natal (DPN) os filhotes de todas as ninhadas foram avaliados por testes reflexos para estimar seu desenvolvimento motor. O reflexo de endireitamento foi realizado do 2º ao 5º dia (Fig. 3 A), o teste de geotaxia negativa foi avaliado do 7º ao 10º DPN (Fig. 3 B), o Reflexo de agarrar foi medido do 14º ao 17º DPN (Fig. 3 C). O GO3 teve apenas uma ninhada e não pode ser comparado às médias dos outros grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $P > 0,05$).

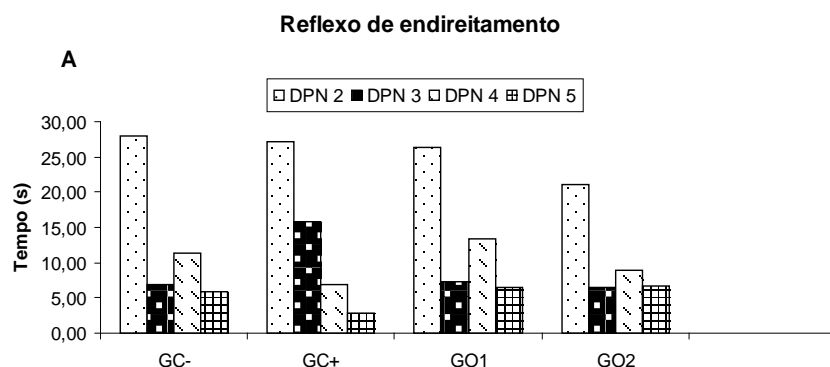
Em ratos, o equivalente ao terceiro trimestre gestacional humano ocorre após o

nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extrauterino, sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o período de maior crescimento neuronal (WEINBERG et al., 2008).

O desenvolvimento das funções sensoriais ocorre segundo uma sequência na seguinte ordem para todos os vertebrados: tátil, vestibular, auditiva e visual. A função vestibular pode ser demonstrada com testes de reflexos, pelo reflexo de endireitamento, já no 2º dia o neonato é capaz de exercer o reflexo de orientação dorso-ventral, embora se torne mais evidente com a idade, variações podem ocorrer. Os filhotes, com o passar do tempo, desenvolvem estratégias para a reorientação dorso-ventral a fim de facilitar o seu desempenho (WHISHAW e KOLB, 2005).

Na Fig. 3 C, é possível observar que há uma linearidade do reflexo com o dia em que o teste foi realizado, com a tendência a demonstrar um melhor desempenho com o passar dos dias, ou seja, apresentar o reflexo mais desenvolvido ou bem formado. A Geotaxia Negativa é um teste que remete à função vestibular e à propriocepção. O reflexo de virar 180º a partir da posição inicial tem sido considerado uma das respostas reflexas mais características dos ratos (KREIDER e BLUMBERG, 2005).

O rato desenvolve a habilidade de “agarrar”, entre o dia 14 e o dia 17 pós-natal. A força muscular despendida é avaliada, onde o animal deve ser capaz de sustentar por um determinado tempo o peso do seu próprio corpo, com o passar dos dias, ocorre uma melhora nas estratégias de força e o animal torna-se mais rápido na realização da tarefa (WHISHAW e KOLB, 2005).



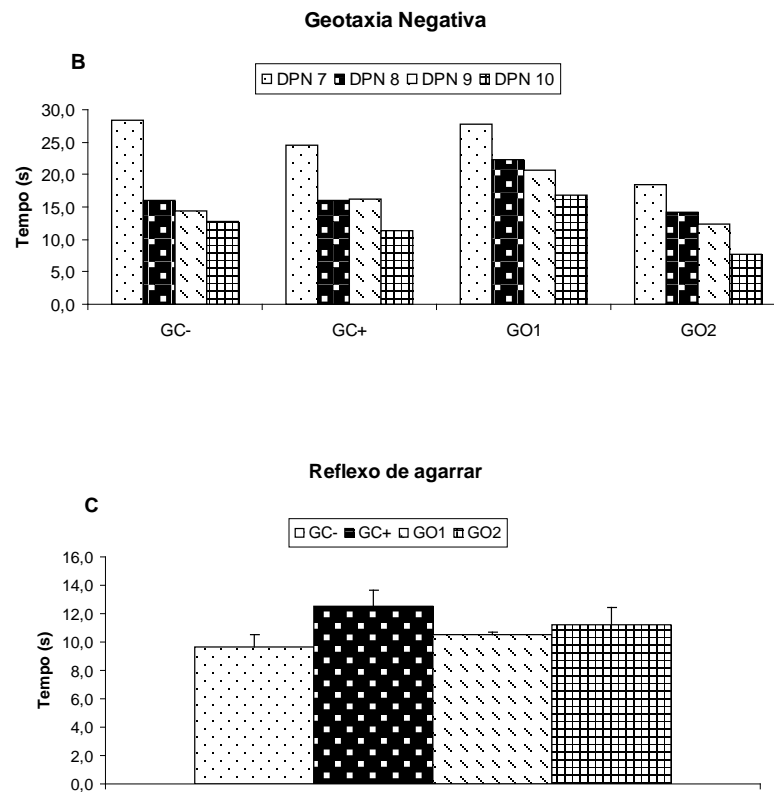


Figura 3. Tempo de resposta ao reflexo de endireitamento (A), resposta à geotaxia negativa (B), resposta ao reflexo de agarrar (C) das progênies de ratos e ratas tratados com o óleo essencial do orégano a 3% (GO1) e 9% (GO2), um GC+ comparados a um grupo controle negativo (GC-). *Valores representam a média \pm erro padrão da média do dia de avaliação do reflexo e em C representam a média dos grupos \pm erro padrão da média.

Análise histopatológica

O peso relativo dos órgãos bem como a análise histopatológica de filhotes machos e fêmeas eutanasiados na puberdade não sofreram interferência pelo tratamento parental, o peso dos órgãos não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos com relação à massa corporal dos órgãos analisados e a análise histopatológica não encontrou lesões compatíveis com lesões tóxicas (Machos: GC- = 6; GO1 = 7, GO2 = 5, GO3 = 2 e GC+ = 9 e fêmeas: GC- = 6; GO1 = 7, GO2 = 5, GO3 = 1 e GC+ = 9), (Dados não apresentados).

Parâmetros espermáticos

Os parâmetros espermáticos avaliados: número de células espermáticas,

produção diária de espermatozóides, número total de espermatozóides, alterações morfológicas nos espermatozóides e níveis testosterona plasmática são apresentados pela Tab. 2. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação ao controle negativo ($p = 0,121$, $p = 0,124$, $p = 0,09$ e $p = 0,235$, respectivamente). O grupo GO3 não pode ser comparado às demais ninhadas por tratar-se apenas de dois animais de uma única ninhada.

De acordo com Amann et al. (1976) a idade afeta a produção de espermatozóides e ratos púberes podem ter menores concentrações espermáticas. Segundo Robb et al. (1978) ratos machos normalmente são férteis e pareados com as fêmeas quando atingem 70-80 dias de idade. Portanto os baixos números de produção diária e de total de espermatozóides estão relacionados com variação fisiológica que ocorre na puberdade e a exposição ao óleo essencial em duas concentrações e seu controle positivo via útero e lactação, não alterou as produções espermáticas.

Tabela 2. Parâmetros espermáticos na puberdade de filhotes de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano (GO1, GO2 e GO3), controle negativo (GC-) controle positivo (GC+) N = GC- = 6; GO1 = 7, GO2 = 5, GO3 = 2 e GC+ = 9. Os valores representam a média dos grupos \pm erro padrão da média.

	GC-	GC+	GO1	GO2	GO3
Células espermáticas ($\times 10^6$ /Testículo)	141 \pm 18,5	107,6 \pm 3,6	125,9 \pm 7	131 \pm 12,3	149,5 \pm 14,5
Produção diária de espermatozóides ($\times 10^6$/Testículo)	53,8 \pm 45,2	61,3 \pm 2,1	57,4 \pm 3,4	49,5 \pm 2	44,3 \pm 12
Número total de espermatozóides ($\times 10^6$/Epidídimo)	899 \pm 45,2	840,6 \pm 34	801,6 \pm 35,4	918,4 \pm 84	1110 \pm 65
Espermatozóides com alterações morfológicas (%)	3,9 \pm 0,6	3,4 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	4 \pm 0,5
Testosterona plasmática (ng/dL)	175,5 \pm 15,4	186,6 \pm 9,3	193,7 \pm 25,4	166 \pm 15,7	154 \pm 0,5

Comportamento em campo aberto

A Fig. 4 apresenta o registro do teste de comportamento em campo aberto das ninhadas de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano em duas concentrações

(GO1, GO2), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+), GO3 não foi avaliado, já que os machos da ninhada nascida foram eutanasiados aos 65 dias. Um filhote macho de cada ninhada foi avaliado aos 75 dias de vida, durante 5 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA $P > 0,05$).

O teste do campo aberto tem sido amplamente utilizado para quantificar movimentos locomotores e de exploração dos animais de laboratório. Este teste permite observar como o animal se comporta em amplo ambiente medindo o seu estado emocional (HO et al., 2002). Através dos resultados obtidos, é possível afirmar que a progênie de ratos tratados com óleo essencial de orégano, o controle negativo e um controle positivo, não interferiram negativamente no estado emocional dos ratos, eles se mostraram muito ativos e permaneceram um tempo significativo no centro do campo aberto (± 20 s), isto confirma dados existentes sobre a redução do medo nos animais manipulados no período neonatal (PADOIN et al., 2001).

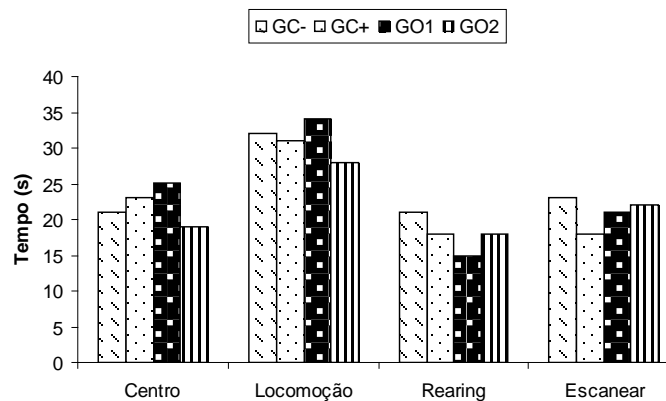


Figura 4. Frequência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear” da progênie de ratos tratadas óleo essencial de orégano em três concentrações (GO1, GO2 e GO3), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). (GC- n = 6, GC+ n=9, GO1 n=7, GO2 n=5).

Comportamento sexual

A Tab. 3 mostra os resultados do comportamento sexual da prole de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano em duas concentrações (GO1, GO2), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). GO3 não pôde ser avaliado, pois teve apenas uma ninhada. Foram formados 10 casais não consanguíneos nos grupos GC-, GC+ e GO1, e no GO2, cinco casais. Como é possível observar, não houve diferença significativa nos parâmetros de comportamento sexual frente à primeira experiência sexual. A receptividade das fêmeas do grupo GO2 foi sutilmente diferente

de GC-, no entanto não foi estatisticamente diferente de GC- e dos demais grupos. Como se pode ver, o número de montas incompletas (sem intromissão) foi significativamente mais do que o número de intromissões, ou seja, de montas completas.

Estudos mostraram que estímulos estressantes durante os períodos de diferenciação sexual do sistema nervoso central: pré-natal e logo após o nascimento induzem a alterações estáveis que se manifestam pela diminuição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas (BENNETI, 2005).

Tabela 3 Parâmetros de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos, prole de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano em duas concentrações (GO1, GO2), um controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Dados expressos em média \pm erro padrão da média.

	GC-	GC+	GO1	GO2
Latência de monta (min)	4,6 \pm 1,4	6,2 \pm 1,3	4,52 \pm 1,1	4,9 \pm 1,6
Latência de intromissão (min)	4,0 \pm 1,3	4,4 \pm 0,9	5,6 \pm 1,2	6,1 \pm 1,8
Nº de intromissões (min)	1,14 \pm 0,2	1,08 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
Nº de montas incompletas	5,3 \pm 0,2	6,5 \pm 0,4	5,9 \pm 0,1	5,7 \pm 0,3
Receptividade da fêmea	0,97 \pm 0,02	0,81 \pm 0,01	0,79 \pm 0,01	0,61 \pm 0,02

CONCLUSÃO

Os resultados alcançados complementam o estudo de toxicidade reprodutiva do óleo essencial de *Origanum vulgare*. Foi possível concluir, através dos diversos resultados obtidos, que o tratamento da geração parental não interferiu no desenvolvimento físico, motor e neuroendócrino da prole de ratos e ratas tratados com óleo essencial de orégano (GO1, GO2, GO3), e seu controle positivo (GC+).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ALLAN, P.; BILKEI, G. Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, v. 63, p. 716–721, 2005.

AMANN, R.P.; JOHNSON, L.; THOMPSON JR, D.L.; PICKETT, B.W. Daily

spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biology of reproduction*, v. 15, p. 586 – 592, 1976.

AZEVEDO, M.S. Efeito de intervenções no ambiente neonatal sobre a relação mãe-filhote e o comportamento na idade adulta. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre. 2005. 100 p.

BENNETI, F. Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta. Tese de doutorado. UFRGS, Porto Alegre, 2005. 87p.

BUSATTA, C. Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de manjerona e orégano. Dissertação de mestrado. URI campus de Erechim, 2006. 110 p.

BUSATTA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, M.R.A. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, (4), p. 610-616, 2007.

CHAMI, N.; CHAMI, S.; BENNIS, S. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infect Disease*,. vol. 8, n.3, pp. 217-226, 2004.

CHAHOU, I; FAQI, A.S. An optimized approach for the assessment of sexual behavior in male rats. *Reproductive Toxicology*, v. 12(6), p. 667–671, 1998.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O. et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, 2010.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Manual para técnicos em bioterismo. 2. Ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

DAOUK, R.K.; DAGHER, S.; SATTOUT, E. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, v.58, p.1147-1149, 1995.

FUKAYAMA, E.H., BERCHINI, A.G., GERALDO, A. et al. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira Zootecnia*, 34, 2316-2326, 2005.

GIANNENAS, I.P.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M. et al. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archive Tierernahrung*, v.57, p. 99-106, 2003.

HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. *Behavior Brain Research* 1.36p. 2002.

KABOUCHE, K.; BOUAGHANE, N.; LAGGOUNE, S. et al. Comparative

antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria *International Journal of Aromatherapy*, v. 15, n.3, p. 129-133, 2005.

KREIDER, J.C.; BLUMBERG, M.S. Geotaxis and beyond: Commentary on Motz and Alberts. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 27, p. 535 – 537, 2005.

LAPPONI, J.C. Estatística Usando Excel. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 2000. 451p.

MELLO J.R.B.; LANGELOH A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade, In: RHODEN E. L.; RHODEN C.R. *Princípios e Técnicas em Experimentação Animal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, pp 455 – 464, 2006.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n.1, p. 10-6, 2008.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28 n. 1, p.183-91, 2009.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M. et al. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 115(6), p. 1332-1340, 2001.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, v.20, no 11, p. 1603 – 1612, 2000.

PASTER, N.; JUVENT, B.J.; SHAYYA, E. et al. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. *Letters Applied Microbiology*, v.11, p.33-37, 1990.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p. 103 -107, 1978.

ROBINSON, S.R.; BRUMLEY, M.R. Prenatal behavior. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. *The behavior of the laboratory rat*. Oxford: Oxford University press., 2005. p. 257-265.

RODRIGUES, M.R.A.; KRAUSE, L.C.; CAMARÃO, E.B. et al. Chemical composition and extraction a yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂ *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*, v. 52, p. 3042 – 3047, 2004.

SILVA, M.P.; PESSOTTI, B.M.S.; ZANINI, S.F. et al. Morfometria intestinal de frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria tenella* e tratados com óleo

essencial de orégano. *Ciência Rural*, v.39, n.5, p.1471-1477, ago, 2009.

SCHULTZ, T.H.; FLATH, R.A.; MON, T.R. et al. Isolation of Volatile Components from a Model System. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*, v. 25, p. 446-449, 1977.

TANTAOUI-ELARAKI, A.; FERHOUT, H.; ERRIFI, A. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three *Moroccan* essential oils. *Journal of Essential. Oils Research.*, v.5, p.535-543, 1993.

WEINBERG, J.; SLIWOWSKA, J.H.; LAN, N., HELLEMANS, K.G.C. Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. *Journal of Neuroendocrinology*, v.20, p. 470–488, 2008.

WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. *The behavior of the laboratory rat*. Oxford: Oxford University press., 2005.

4 DISCUSSÃO GERAL

4.1 O óleo essencial

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. utilizado neste estudo demonstrou ser similar em relação aos compostos do óleo obtido por Cleff et al. (2008) que estabeleceu a dose *in vitro* terapêutica contra espécies de fungos importantes na clínica veterinária e foi esta a dose que norteou a dose inicial deste experimento. No cromatograma foram evidenciados 31 compostos, sendo que os principais constituintes identificados, usando padrões cromatográficos, foram cis-sabineno hidratado (27,46%), timol (17,97%) terpinen-4-ol (10,55%). Os constituintes químicos encontrados no óleo de orégano estudado estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (BUSATA, 2006; SILVA, et al. 2009) apenas com algumas variações nos compostos.

O rendimento da extração o óleo essencial através do equipamento adaptado para arraste a vapor foi de 0,2%. Foram utilizados aproximadamente 200 Kg de planta e todo óleo extraído foi aproveitado durante o procedimento experimental.

4.2 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre os machos

A administração por via oral do óleo essencial do orégano aos ratos machos não afetou o desenvolvimento ponderal dos animais em nenhuma das doses utilizadas. No entanto, o óleo essencial causou infertilidade de forma dose-dependente, nada aconteceu na dose inicial, na dose intermediária interferiu na taxa de acasalamento e diminuindo a concentração de testosterona plasmática e na maior concentração usada (27% V / V) a administração interferiu diretamente nos testículos já que a avaliação histopatológica revelou degeneração testicular, reduzindo o peso do órgão, diminuindo concentrações espermáticas e alterando a morfologia dos espermatozóides e ainda causando diminuição da concentração de testosterona plasmática circulante, e segundo Chen et al. (2007) a redução da concentração de testosterona é atribuída a um déficit primário do eixo hipotálamo-hipófise.

No grupo controle positivo com os compostos majoritários, timol e terpinen-4-ol 3%/3%, grupo que foi utilizado para balizar os resultados encontrados com o óleo essencial, houve diminuição da produção diária de espermatozóides, do número total de espermatozóides e alteração da porcentagem de malformações na morfologia

espermática. Mas sem diminuir estatisticamente os níveis de testosterona plasmática circulante e sem lesão histopatológica no testículo, sem alteração de peso deste órgão. Aumentando o peso dos testículos epidídimos e da vesícula seminal.

Estes resultados corroboram, de certa forma, com os resultados encontrados por Sharma e Jacob (2001) que avaliaram a eficácia contraceptiva das folhas de *Mentha arvensis*, planta da família Lamiaceae e que é rica no monoterpeno mentol. A utilização de extrato aquoso por via oral em ratos, por 20, 40 e 60 dias provocou inibição da fertilidade e mantendo ao mesmo tempo o seu comportamento sexual normal. Com o aumento da duração do tratamento, houve uma diminuição do peso dos testículos e dos órgãos acessórios, a concentração de espermatozóides, motilidade e viabilidade no epidídimo também foram diminuídos.

O citral, um monoterpeno presente em outra planta da família do orégano, a *Melissa officinallis* L. foi testado no sistema reprodutor masculino por Illayperuma (2008). Ele concluiu que o citral, na dose de 300mg/kg, através de injeção intraperitoneal por 14 dias consecutivos em ratos leva a uma redução no peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais, da próstata e dos níveis de testosterona plasmática.

Os ratos tratados com a maior dose (27% V/V) não foram capazes de fertilizar as fêmeas, visto que, de 12 fêmeas com espermatozóides no esfregaço vaginal apenas uma gestou, e esta teve uma alta taxa de perda pós-implantacional. Conforme Chenoweth (2005) defeitos na estrutura do espermatozóides desempenha um papel importante tanto na fertilização quanto na gravidez. Conforme Chenoweth (2005) defeitos na estrutura dos espermatozóides desempenha um papel importante tanto na fertilização quanto na gravidez.

4.3 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre as fêmeas

As fêmeas, por sua vez, não tiveram sinais de toxicidade materna, evidenciado pelo ganho relativo de massa corporal e os consumos relativos de água e ração (OECD, 1995; EPA, 1996).

O tratamento durante a gestação: pré-implantação, implantação e organogênese, nas doses 3 e 9 % não prejudicou o crescimento uterino, pois o peso dos fetos a termo não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa e também não interferiu

no tamanho das ninhadas, visto que o número de filhotes por ninhada não foi estatisticamente diferente do grupo controle negativo. No entanto, na dose mais elevada (27% V/V) há indícios de perda pré-implantação, uma vez que as fêmeas foram diagnosticadas com gestação, mas não levaram a gestação à termo e não possuíam locais de implantação no útero inspecionado. A elevada taxa de perda pós-implantação neste grupo (27% V/V) foi calculada na única fêmea do grupo que teve gestação, mesmo assim, pode ser indicativo de embriotoxicidade.

O Controle positivo não teve efeito deletério sobre a fertilidade das fêmeas, mas teve efeito diminuindo a taxa de nascidos vivos ou de natalidade, aquela representada pela divisão entre número total de filhotes nascidos vivos e o número total dos filhotes nascidos (vivos e/ou mortos) vezes cem. Apesar de ter acontecido em uma única fêmea, pode sugerir embriotoxicidade. Assim, são necessários outros estudos com novas concentrações destes compostos majoritários do óleo de orégano.

Benavides et al. (2010) investigaram o efeito do extrato aquoso de *Origanum vulgare* no desenvolvimento embrionário de ratos. O extrato aquoso foi dado *ad libitum* fêmeas prenhas na dose de: 0, 9, 18 e 36 mg / mL *ad libitum*. Quando os embriões foram avaliados no quarto dia de gestação, um ligeiro atraso no desenvolvimento do embrião foi observado, mas apenas com a dose mais elevada. No que diz respeito à qualidade dos embriões um aumento de embriões degenerados foi observado, mas não foi significativo.

Para avaliar o risco do óleo essencial do orégano estar causando teratogenicidade foram observadas alterações de categorias I (maiores) e II (menores), de acordo com Chahoud et al. (1992). Foram avaliados apenas os grupos controles e as doses 3 e 9% e foi baixa a prevalência de malformações esqueléticas em fetos neste estudo e não mostram maneira dose-dependente, mas houve diferença estatística no percentual de fetos com anomalias esqueléticas. Os tratamentos produziram uma maior incidência de malformações esqueléticas que por muitas vezes pode ocorrer espontaneamente nesta espécie, como a alta incidência de costelas supranumerárias em todos os grupos. O termo supranumerário é considerado malformação por Solecki (2001) no entanto, anomalias que também ocorrem nos controles, são chamadas anomalias espontâneas ou variações (CHAHOUUD et al., 1992). Este efeito que provocou malformações esqueléticas menores pode ser atribuído aos compostos monoterpênicos do óleo essencial de orégano.

Alguns compostos monoterpênicos isolados também foram avaliados quanto a malformações esqueléticas em fetos de ratos são eles o α -Terpineno e o β -Myrceno. O α -Terpineno nas doses 30, 60, 125 e 250 mg / kg por via oral a fêmeas de ratos Wistar do dia 6 ao dia 15 de gestação e através da coloração dos fetos com alizarina Red S foram encontrados sinais de ossificação retardada (ossos mal ossificados e não ossificados) e uma maior incidência de malformações ósseas menores foram observadas em doses de 60 mg de peso corporal / kg ou mais (ARAÚJO et al., 1996).

Já o β -Myrceno foi testado nas doses 0, 100, 300 e 500 mg / kg por gavagem à ratos machos 91 dias antes do acasalamento e durante o acasalamento, bem como para fêmeas, continuamente por 21 dias antes do acasalamento, durante o acasalamento e gestação e seu fetos foram corados com Alizarina Red S para avaliação esquelética e somente a dose mais alta 500 mg / kg provocou uma aumento das malformações esqueléticas menores (PAUMGARTTEN et al., 1998). Da Silva et al. (2012) investigaram os efeitos sobre a gestação do óleo essencial da *Mentha villosa* L., planta aromática da família Lamiaceae. Os grupos experimentais receberam por gavagem, a partir do dia 6 de gestação até o dia 16, 10, 25 ou 50 μ g / kg / dia de óleo essencial e metade dos fetos de cada ninhada foram direcionadas para o estudo de malformações viscerais e os restantes fetos para o estudo de malformações esqueléticas e o tratamento em nenhuma das doses causou malformações viscerais e esqueléticas.

As ratas que pariram a termo tiveram seu comportamento materno avaliado em períodos em que os filhotes são totalmente dependentes da mãe, dias 1, 5 e 10 pós-natal e nenhum dos grupos avaliados teve alterações no comportamento registrado. O comportamento materno é desencadeado por diversos mecanismos, dentre eles a elevação de ocitocina que ocorre durante o parto, elevação de prolactina, lactógeno placentário e estradiol e queda de progesterona. Fatores que alteram tais hormônios podem afetar o comportamento materno e suas variáveis fisiológicas (NUMAN et al., 1999).

4.4 Efeitos da administração do óleo essencial de orégano sobre a progênie

A progênie de machos e fêmeas tratadas com o óleo essencial do orégano foi acompanhada desde dia 0 até o dia 37 pós-natal e não se observou diferença estatística significativa entre os grupos e o grupo controle negativo no desenvolvimento ponderal,

físico e motor dos filhotes. Estes resultados corroboram com os encontrados por Mello et al. (2008) que avaliaram a toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera* e com Mello et al. (2009) e na avaliação da toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*, em ambos os estudos, o tratamento da geração parental antes e durante o acasalamento, gestação e lactação, não alterou o desenvolvimento físico das progênes.

A única ninhada nascida no grupo 27% se desenvolveu perfeitamente, pois eram apenas três filhotes sobreviventes de uma perda pós-implantacional materna durante a gestação, mas apesar disso tiveram um bom desenvolvimento e desempenho motor porque, segundo Mello e Langeloh (2006) o desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais.

A observação diária dos reflexos (reflexo postural, geotaxia negativa e força de agarrar) são indicadores sensíveis dos primeiros estágios do desenvolvimento do neonato (WHISHAW e KOLB, 2005). O reflexo medular postural é um dentre vários reflexos relativamente complexos que estão associados à postura, os quais são parcialmente integrados na medula e que os animais devem apresentar logo no nascimento.

Segundo Motz e Alberts (2005) o reflexo da geotaxia negativa refere-se a uma resposta de orientação e a movimentos expressos em oposição às pistas dos vetores gravitacionais. A tarefa é considerada diagnóstica para função vestibular e/ou proprioceptiva. O teste de força de agarrar geralmente é utilizado em baterias de testes de desenvolvimento a fim de complementar os testes de função motora, através da cronometragem do tempo que o animal fica suspenso à barra do aparato demonstra também uma resposta de força muscular e articulação das patas desenvolvida (MAURISSEN et al., 2003).

As tarefas do campo aberto são consagradas em pesquisas e permitem a avaliação do comportamento animal em diversos aspectos (WHISHAW e KOLB, 2005). No teste do campo aberto o número de cruzamentos é a medida mais utilizada na avaliação da atividade locomotora e os animais testados na puberdade, aos 65 dias, mostraram-se livres na execução da tarefa.

A avaliação do comportamento sexual da progênie de ratos e ratas tratados com

o óleo essencial do orégano nas concentrações 3% e 9% V/V mostrou que não houve diferença significativa frente à primeira experiência sexual. A receptividade das fêmeas do grupo 9% foi sutilmente diferente de GC-, no entanto não foi estatisticamente diferente dos demais grupos. O número de montas incompletas (sem intromissão) foi significativamente maior do que o número de intromissões, ou seja, de montas completas. Segundo Chahould e Faqi (1998) o comportamento sexual é um fenômeno muito complicado, difícil de se avaliar, com o envolvimento de muitos componentes.

Estudos mostraram que estímulos estressantes durante os períodos de diferenciação sexual do sistema nervoso central: pré-natal e logo após o nascimento induz a alterações estáveis que se manifestam pela diminuição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas (BENNETI, 2005).

5 CONCLUSÕES

- ✓ A administração do óleo essencial de *O. vulgare* por via oral aos ratos machos durante 91 dias, causou toxicidade reprodutiva de forma dose dependente, demonstrada através das avaliações espermáticas nas doses 9% e 27% V / V, não causando toxicidade sistêmica.
- ✓ Nas fêmeas a administração do óleo essencial do orégano no pré-acasalamento gestação e lactação, não causou toxicidade materna, mas a dose 27% V / V causou infertilidade, evidenciada através das perdas pré-implantação.
- ✓ As fêmeas que pariram à termo não tiveram o comportamento maternal afetado.
- ✓ Nas doses 3 % e 9% V / V onde as fêmeas foram avaliadas quanto à teratogenia, não houve malformações relevantes no desenvolvimento esquelético dos fetos.
- ✓ A progênie destas doses 3 % e 9% V / V não foi afetada pela administração do óleo essencial durante a gestação e a lactação, com desenvolvimento pós-natal geral pleno e com comportamento adequado para a espécie.
- ✓ Portanto, a concentração de óleo essencial de orégano considerada terapêutica, 3% V / V, não causou efeitos tóxicos, é segura para ratos e a extrapolação para outras espécies animais é possível. Assim, o óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (orégano) pode representar uma alternativa para a próxima geração de fármacos com amplo espectro de ação antifúngica para a medicina veterinária, desde que não recomendada a machos e fêmeas em fase reprodutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGMO, A. Male rat sexual behavior (Protocol). **Brain Research Protocols**, v.1, p. 203- 209, 1997.
- ALLAN, P. BILKEI, G. Oregano improves reproductive performance of sows. **Theriogenology**, v. 63, p. 716–721, 2005.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Plantas que curam**. Editora três, São Paulo, v. 2, 1996.
- AMANN, R.P.; JOHNSON, L.; THOMPSON JR, D.L.; PICKETT, B.W. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. **Biology of reproduction**, v. 15, p. 586 – 592, 1976.
- AMRIK, B; BILKEI, G. Influence of farm application of oregano on performances of sows. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 674–677, 2004.
- ANDERSON, D.; CONNING, D.M. **Experimental toxicology – The basic issue**. 2 ed. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 1993. 566p.
- ARAÚJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; DE CARVALHO, R.R. et al. Study of the embryofetotoxicity of *α-terpinene* in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 477 – 482, 1996.
- AYALA, L.; MARTINEZ, ACOSTA, A. et al. A note the effect of oregano as additive on the productive performance of broilers. **Cuban Journal of Agriculture Science**, v.40, p. 437-440, 2006.
- AZEVEDO, M.S. **Efeito de intervenções no ambiente neonatal sobre a relação mãe-filhote e o comportamento na idade adulta**. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre. 2005. 100 p.
- AZIRAK, S., RENCUZOLULLARI, E. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. **Environmental Toxicology**, p.728 – 735, 2008.
- BAKERINKE, J. A.; GOSPE, S. M.; TIMAND, R. J.; ELDRIG, M. W. Multiple Organ Failure After Ingestion of Pennyroyal Oil From Herbal Tea in Two Infants. **Pediatric**, v. 98, 944, 1996.
- BAMPIDIS, V.A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; et al. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **British Poultry Science**, v. 46, N° 5, p. 595-601, 2005.
- BENAVIDES, V.; D'ARRIGO, G.; PINO, J. Efecto del extracto acuoso de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) en embriones preimplantacionales de ratón. **Revista Peruana de Biología**, v.17 (3), p.381-384, 2010.

BENNETI, F. **Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta**. Tese de doutorado. UFRGS, 2005. 87p.

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

BOORHEM, R.L. et al. Reader's Digests – **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Reader's Digests Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1999. 416p.

BOTSOGLOU, N.A.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P. et al. The effect of a mixture of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, p. 217-222, 2004.

BOWN, D. **The Herb Society of America – Encyclopedia of Herbs & Their Uses**. Dorling Kindersley Publishing, Inc., New York. 1995.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5a ed. Brasília, p. 548, 2010.

BUCHANAN, R. L.; SHEPHERD, A. J. Inibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. **Journal of Food Science**, v.46, p.976-977, 1981.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de manjerona e orégano**. Dissertação de mestrado. URI campus de Erechim, 2006. 110 p.

BUSATTA, C., MOSSI, A.J.; RODRIGUES, M.R.A. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n.4, p. 610-616, 2007.

BUYUKLEYLA, M., RENCUZOGULLARI, E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 943–947, 2009.

CASTRO, V. L. **Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos**. Circular técnica 13, Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, SP. 2006.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais**. Resolução Nº 1.000, 2012.

CHAMI, N.; CHAMI, S., BENNIS, S. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infect Disease**, vol. 8, n.3, pp. 217-226, 2004.

CHAHOUD, I. **Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats**. CD-ROM, Leipzig, 1996.

CHAHOUD, I.; FAQI, A.S. An optimized approach for the assessment of sexual

behavior in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n.6, p. 667–671, 1998.

CHAHOUD, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAQI, A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 375–381, 1999.

CHAHOUD, I.; BOCHERT, G.; NEUBERT, D. Dose response relationships in reproductive toxicology. In: NEUBERT, D.; KAVLOCK, R.J.; MERKER, H.-J., KLEIN, J. (eds.). **Risk assessment of prenatally-induced adverse health Effects**. Springer-Verlag, p. 227 -244, 1992.

CHAN, V. S. W.; CALDWELL, J. Comparative induction of unscheduled DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by allylbenzenes and their 1'-hydroxy metabolites. **Food Chemical Toxicology**, 30, 831, 1992.

CHEN, H.; MIDZAK, A.; LUO, L.-D., ZIRKIN, B. R. Aging and decline of androgen production. In: Leydig cell in health and disease. **Contemporary endocrinology**, v. 2, p. 117-131, 2007.

CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. **Theriology**, v. 64, p. 457-468, 2005.

CHIANG, L.C. et al. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 811-816, 2005.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S. et al. Toxicidade Pré-Clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (orégano) em Ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 704-709, 2008.

CLEFF, M.B., MEINERZ, A.R.M., SCHUCH, L.F.D. et al. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.513-516, 2008.

CLEFF, M.B., MEINERZ, A.R.M., FARIA, R.O. et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v, 62, p. 1291-1294, 2010.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. Ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

CONNOR, T.H., et al. Genotoxicity of organic chemicals frequently found in the air of mobile homes. **Toxicology letters**, v.25, p. 33-40, 1985.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R. & QUINTAS, L.E.M. **Plantas Mediciniais – do cultivo à terapêutica**, 2. ed. Editora Vozes, Petrópolis. 1998.

COUTINHO W.M.; ARAUJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotécnica**, v. 23: 560-68. 1999.

DA SILVA, B. G.K.S.; SILVA, R.L., SOUZA, M.M.B.; SCHWARZ, A. Embryo and fetal toxicity of *Mentha x villosa* essential oil in Wistar rats. **Pharmacology and Biology.**, v. 50, n.7, p. 871-7, 2012.

DAOUK, R.K.; DAGHER, S.; SATTOUT, E. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. **Journal of Food Protection**, v.58, p.1147-1149, 1995.

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.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A., SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801– 804, 2004.

DELGADO, I.F.; CARVALHO, R.R.; NOGUEIRA, A.C.M.A. et al. Study on embryo-foetotoxicity of β -mircene in the rat. **Food and Chemical. Toxicology**, v. 31, p. 31-35, 1993.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DOMARACKÝ, M.; REHÁK, P.; JUHÁS, S.; KOPPEL J. Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth and Development of Mouse Preimplantation Embryos *In Vivo*. **Physiology Research**, v. 56, p. 97-104, 2007.

EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. p. 229 – 250.

ELBETIEHA, A.; BATAINEH, H.; DARMANI, H.; AL-HAMOOD, M.H. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. **Toxicology Letters**, v. 119, p. 193-201, 2001.

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

ENCICLOPÉDIA. **Delta Universal**. Rio de Janeiro: Delta, 1982. Vol.13 p. 7012 – 7015.

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, P.A., TARANTILIS, M. et al. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v.106, p. 1188–1194, 2007.

FDA / CDER, CBER. Guidance for industry, **Animal Models — Essential Elements to Address Efficacy Under the Animal Rule**. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, 2009.

FAQI, A.S., DALSENTER, P.R., MERKER, H.J.; CHAHOUD, I. Reproductive

toxicity and tissue concentrations of low doses of TCDD in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.150, p. 383–92, 1998.

FELLAH, S.; DOUF, P.N.; PETRISSANS, M.; et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of *Salvia officinalis* L. Oil from Two Culture Sites in Tunisia. **Journal of Essential. Oil Research**, v.18, p 553-556, 2006.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A., et al. Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman high- and low-avoidance rats. **Physiology & Behavior**, v.50 (3), p. 563-565, 1991.

FLETCHER, J. P. CASSELA, J.P.; HUGHES D.; CASSELA, S. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 81-86, 2005.

FLORIN, I. et al. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. **Toxicology**, v.15(3), p. 219 -232, 1980.

FILIPPIS, F.M. **Extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho – experimentos e modelagem**. Dissertação de mestrado. UFRGS, 2001. 114p.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148: 483-87. 2000.

FUKAYAMA, E.H.; BERCHINI, A.G.; GERALDO, A. et al. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2316-2326, 2005.

GEROTHANASSIS, I.P., et al. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to methanolic extracts of two Oregano species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 4185-4192, 1998.

GIANNENAS, I.P.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M. et al. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archive Tierernahrung**, v.57, p. 99-106, 2003.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. **Mutatagenesis Research**, v. 416(1-2), p. 129-136, 1998.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; VIANA, M. E. S.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of β-myrcene, α-terpinene and (+)- and (-)-α-pinene in the *Salmonella*/microsome assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 247, 2005.

GOULD, M.N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environmental Health Perspective**, v. 105, p. 977, 1997.

GUIMARÃES, P.I.C., OLIVEIRA, R.I.C.; ABREU, R.G. Extrairdo óleos essenciais de plantas. **Química Nova na Escola**, nº 11, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p. 616-625, 2006.

HAYES, A. J.; LEACH, D. N.; MARKHAM, J. L. *In vitro* cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 575, 1997.

HENRIQUES, A. T., SIMÕES-PIRES, C. A., APEL, M.A. Óleos essenciais: Importância e Perspectivas Terapêuticas In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs.) **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 2. Ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 221-249.

HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behavior Brain Research**, 136p. 2002.

HUOT, R.; GONZALEZ, M.; LADD, C.; THRIVIKRAMAN, K. et al. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal-axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v.29, p. 279–289, 2004.

HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Plants for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43(2), p. 89-124, 1994.

IARC. D – limonene. **Risk Human**, v. 73, p. 307, 1999.

ILLAYPERUMA, I. Effects of intraperitoneal administration of Citral on male reproductive organs in the rat. **Galle Medical Journal**, v. 13, p. 29-32, 2008.

IPEK, I. ZEYTINOGLU, H., OKAY, S. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, v.93, p. 551–556, 2005.

ISHIDATE JR, M.; SOFUNI, T.; YOSHIKAWA, K. et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 8, p. 623 -636, 1984.

ISMAN, M.B; WAN, A.J.; PASSREITER, C.M. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 65-68, 2001.

JIMÉNEZ, A.; GONZÁLEZ, Y. Efecto de la adición de las orégano (*Origanum vulgare*) en productivo de pollos de engorde. **Cultura Científica JDC**, p. 36-40, 2011.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and

calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v.73, p. 245-250, 2001.

KABOUCHE, K.; BOUAGHANE, N.; LAGGOUNE, S. et al. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 129-133, 2005.

KARPOUHTSIS, I.; PARDALI, E.; FEGGOU, E. et al. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, pp 1111-1115, 1998.

KREIDER, J.C.; BLUMBERG, M.S. Geotaxis and beyond: Commentary on Motz and Alberts. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 535 – 537, 2005.

LAM, L. K. T.; ZHENG, B. Effects of essential oils of glutathione -S-transferase activity in mice. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, PP 660-662, 1991.

LAPPONI, J.C. **Estatística Usando Excel**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 2000. 451p.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91 n.1, p. 131-137, 2005.

LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHÜLER-FACCINI, **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, p. 19 – 39, 2001.

LIU C-X., XIAO P-G, PENG Y., SONG N-N. Challenges in Research and Development of Traditional Chinese Medicines. **Chinese Herbal Medicines**, v.1, n.1, p.1-28, 2009.

LORENZI, H. e MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUZ, M.T. Cultura Contemporânea e Medicinas Alternativas: Novos Paradigmas em Saúde no Fim do Século XX. **Rev. Saúde Coletiva**, v.15, p.145- 176, 2005.

MAHONY, M.C.; HODGEN, G.D. Toxic effects on the hypothalamus-anterior pituitary-gonadal axis, control on the male and female reproductive system, and related issues. In: Witorsch RJ (Ed.) **Reproductive toxicology**. Raven Press, New York, p. 195-213, 1995.

MANOHAR, V., INGRAM, C., GRAY, J., TALPUR, N., ECHARD, B., BAGCHI, D., PREUSS, H. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and celular biochemistry**, v. 228, p.111 -117, 2001.

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**, 67: 187-195, 2001.

MARTOS, M.V.; NAVAJAS, J.F.; LÓPEZ, J.F.; ÁLVAREZ, J.A.P. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 526–531, 2008.

MAURISSEN, J.; MARABLE P.J.; ANDRUS, A. et al. Factors affecting grip strength testing. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 543-553, 2003.

MELLO J.R.B.; LANGELOH A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade, In: RHODEN E. L.; RHODEN C.R, **Princípios e Técnicas em Experimentação Animal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, pp 455 – 464, 2006.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.1, p. 10-6, 2008.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28 n. 1, p.183-91, 2009.

MEISEL, L.; SACHS, D.B. The physiology of male sexual behavior. In: E. Knobil and J.D. Neill, Editors, **Physiology of Reproduction** (2nd ed.), Raven Press, New York, pp. 3–106, 1994.

MEZZOUG, N. ELHARDRI, A., DALLOUH, A. et.al. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 629, n. 2, p. 100-110, 2007.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp. hirtum*). **Food Chemistry**, v.71, p. 79-83, 2000.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D. et al. *In vitro* Effect of Essential Oils and Isolated Mono- and Sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medicinal**, v.66, n.4, p. 366-368, 2000.

MONDELLO, F., BERNARDIS, A., GIROLAMO, A. et al. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infect Disease**, v. 6, p.158, 2006.

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v.27, p. 529-533, 2005.

NASCIMENTO, P.F.C., NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007.

NEUBERT, D.; KAVLOCK, R.J. Introduction. In: NEUBERT, D.; KAVLOCK, R.J., MERKER, H-J., KLEIN, J. (eds.) **Risk assessment of prenatally-induced adverse health Effects**. Springer-Verlag, p. 1-23, 1992.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs.) **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 2. Ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 259-274.

NUMAN, M. Maternal Behavior. In: KOBIL, E. e NEIL, J. (eds) **The physiology of reproduction**. Raven press (New York) p. 221-302, 1994.

NUMAN, M.; ROACH, J. K.; DEL CERRO, M. C. et al. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. **Brain Research**, v. 830, p. 358-371, 1999.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS,
Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 421, 27 July, 1995.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 414 - **Prenatal Developmental Toxicity Study**, 22 January, 2001.

OLIVEIRA F., AKISSUE G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M. et al. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 6, p. 1332-1340, 2001.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, E.; CARRETERO, E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v.20, no 11, p. 1603 – 1612, 2000.

PASTER, N.; JUVENT, B.J.; SHAAYA, E. et al. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. **Letters Applied of Microbiolog.**, v.11, p.33-37, 1990.

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 691– 696, 2005.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; DE-CARVALHO, R.R.; SOUZA, C.A.M. et al. Study of the effects of β -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 955-965, 1998.

PEANA, A.; D'AQUILA, P.S.; PANIN, F. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, p. 721-726, 2002.

PFIEGER-BRUSS, S., SCHUPPE, H-C., SCHILL, W-B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, v. 36, p. 337-345, 2004.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. **Food Chemistry**, v. 107, p. 449-463, 2008.

PONGPRAYOON, U.; SOONTORNSARATUNE, P.; JARIKASEM, S. et al. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: The essential oil. **Phytomedicine**, v.3, p. 319-322, 1997.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rat. **Journal of Reproductive Fertility**, v.54, p. 103 -107, 1978.

ROBINSON, S.R.; BRUMLEY, M.R. Prenatal behavior. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press., 2005. p. 257-265.

ROCKWELL, P.; RAW, I. A mutagenic screening of various herbs, spices, and food additives. **Nutrition Cancer**, v. 1, p. 10-15, 1979.

RODRIGUES, M. R. A. Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano. Tese de Doutorado, UFRGS, 2002, 163p.

RODRIGUES, M.R.A., KRAUSE, L.C., CAMARÃO, E.B. et al. Chemical composition and extraction a yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂ . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3042 – 3047, 2004.

ROEHSIG M.; SANT'ANNA, S.G.; SALLES, K.R.R.D., et al. Abortifacientes: efeitos tóxicos e riscos. **Saúde, Ética & Justiça**, v.16, n.1, p.1-8, 2011.

ROOFCHAE, A.; MEHRDAD, I.; EBRAHIMZADE, M.A. et al. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.32, p. 6177-6183, 2011.

SACHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, p. 621-632, 2005.

SÁ, R.C.S.; LEITE, M.N.; OLIVEIRA, L.E.G., et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 324-332, 2006.

SAHIN, F.; KARAMAM, I.; GULLUCE, M. et al. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n.1, p. 61–65, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, p. 549-5557, 2004.

SANSEVERINO, A.M. Síntese orgânica limpa. **Química Nova**, v.23 (1), p 102-107, 2000.

SCHULTZ, T.H.; FLATH, R.A.; MON, T.R. et al. Isolation of Volatile Components from a Model System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 446-449, 1977.

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1859 - 1862, 2007.

SCHUHMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 10 n. 6-7, p. 504 – 510, 2003.

SERVAN-SCHREIBER, D. Os condimentos e as ervas agindo pelo mecanismo que os remédios. In: SERVAN-SCHREIBER, D. **Anticancer: prevenir e vencer usando nossas defesas naturais**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2011. p. 147-148.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC. 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC. 1999.

SILVA, M.P.; PESSOTTI, B.M.S.; ZANINI, S.F. et al. Morfometria intestinal de frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria tenella* e tratados com óleo essencial de orégano. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1471-1477, 2009.

SOLECKI, H.; BURGIM, J.; BUSCHMANN, R. et al. Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. **Reproductive Toxicology**, v.15, p. 713–721, 2001.

SOUZA, M.M. et al. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin, T.M.B.; Cechinel Filho, V. **Ciências químico-farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003, 239p.

STANLEY, F., BOWER, C. Teratogenic drugs in pregnancy. **Medicine Journal of Australia**, v.145, p. 596- 599, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad, SANTARÉM, E.R. et al. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANTAOUI-ELARAKI, A.; FERHOUT, H.; ERRIFI, A. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. **Journal of Essential Oils Research**, v.5, p.535-543, 1993.

TAYLOR, W. & VAN DYKE, G.C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, n. 2, p. 107-119, 1985.

OUSSALAH, M. CAILLET, S.; SAUCIER, L. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157, *Salmonella Tiphymurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

VASCONCELOS, I.G.; OLIVEIRA, T.N. **Curva de crescimento de biomassa fresca da espécie *Origanum majorana* L. em cultivo protegido e caracterização morfológica de quatro acessos do gênero *Origanum* comercializados em Brasília**. Monografia, Bacharelado em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. 26 f.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, p. 482-504, 1976.

WATTENBERG, L.W. Inhibition of Carcinogenesis by Minor Dietary Constituents. **Cancer Research**, v. 52, p.2085, 1992.

WEINBERG, J.; SLIWOWSKA, J.H.; LAN, N., HELLEMANS, K.G.C. Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 470-488, 2008.

WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press., 2005.

WORKING, P.K. Male reproductive toxicity: comparison of the human to animal models. **Environmental Health**, v.77, p. 37- 44. 1988.

YANG, Y.C. et al. Insecticidal Activity of Plant Essential Oils against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 699- 704, 2004.

YANG, Y.C.; LEE, H.S.; LEE, S.H. et al. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 1595 - 1600, 2005.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 2. Ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 12 -31.

ZANANDREA, I.; JULIANO, B.M.; ANDREA, B.M. et al. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p. 14-16, 2004.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. In: New York: Raven Press, p. 275 – 309, 1989.