

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

ESTUDO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum
vulgare* L. (ORÉGANO) EM RATOS WISTAR, ATRAVÉS DO TESTE DE
MICRONÚCLEOS

MARIANI FOGAÇA DOS SANTOS

PORTO ALEGRE

2011

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

Estudo do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratos wistar, através do teste de micronúcleos

Autora: Mariani Fogaça dos Santos.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, junto a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na área de Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Farmacologia, Terapêutica e Toxicologia.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

PORTO ALEGRE

2011

MARIANI FOGAÇA DOS SANTOS

Estudo do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratos wistar, através do teste de micronúcleos

Aprovada em 25 de Março de 2011.

APROVADA POR:

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

Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

Marlete Brum Cleff
Membro da Comissão

Ana Raquel Mano Meinerz
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por existir e por ter me dado pais como Lauro e Sinara, agradeço a eles pela educação que me deram, pelo incentivo e ajuda para a realização de mais esta etapa educacional.

Ao meu orientador, João Roberto de Braga Mello, pela oportunidade e a Fernanda, incansável, muito obrigada pela ajuda e paciência.

Aos meus novos amigos que conquistei, companheiros de laboratório que me ajudaram, me incentivaram e fizeram parte desta minha jornada, Maíra, Tatiana, Jaqueline, Lisiane, Rafael, Luíza, Fabíola, e em especial, Clarissa, muito obrigada.

Aos funcionários do ratário do ICBS/UFRGS, Natalie e Irene, obrigada pela amizade e cuidado.

Aos professores da UFRGS que estiveram comigo nesta etapa enriquecendo mais o meu conhecimento.

Muito obrigada!

RESUMO

Tendo em vista o crescente uso do óleo essencial do orégano com diferentes finalidades terapêuticas, testes de toxicidade pré-clínica são imprescindíveis. No presente trabalho o potencial genotóxico deste óleo essencial foi testado através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar (*Rattus norvergicus*). Grupos de 5 ratos machos e 5 fêmeas foram tratados com o óleo essencial do orégano, por via oral em três doses: 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ respectivamente, um controle negativo utilizando o veículo da administração do óleo, Tween 80 (0,001%), um controle positivo utilizando ciclofosfamida, substância sabidamente mutagênica (25 mg.kg⁻¹) e um controle positivo utilizando os compostos majoritários encontrados no óleo testado. Em todas as doses utilizadas, com exceção do GC+, a frequência de micronúcleos foi avaliada após 3 dias de administração. A citotoxicidade foi avaliada pela relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) e a frequência de eritrócitos micronucleados. O óleo essencial, nas doses testadas, não afetou o desenvolvimento ponderal de ratos machos e fêmeas tratados. Os resultados revelaram através da proporção de EPC/ENC, que o óleo essencial do orégano e o controle positivo com os compostos majoritários causaram uma leve toxicidade na medula óssea de ratos Wistar, por meio de uma leve depressão na medula óssea. Não houve um aumento estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis $p > 0,01$) de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nas 3 doses do óleo essencial do orégano, mas aumentou a frequência de EPCMN do controle positivo com os compostos majoritários induzindo assim genotoxicidade nos eritrócitos dos ratos. Com base nos resultados é possível sugerir que através deste teste citogenético o óleo essencial do orégano utilizado neste experimento, não apresenta atividade genotóxica nas doses utilizadas.

ABSTRACT

Given the increasing use of essential oil of oregano with different therapeutic effects, toxicity tests are essential pre-clinical. In this work the genotoxic potential of essential oil was tested by the micronucleus test in bone marrow of rats (*Rattus norvegicus*). Groups of 5 males and 5 female rats were treated with the essential oil of oregano orally in three doses: 2000, 1000 and 500 mg.kg⁻¹ respectively, a negative control using the vehicle for administering the oil, Tween 80 (0.001%), a positive control using cyclophosphamide, a substance known to be mutagenic (25 mg.kg⁻¹) and a positive control using the major compounds found in oil tested. At all doses, except for GC +, the frequency of micronuclei was evaluated after 3 days of administration. Cytotoxicity was evaluated by the ratio of polychromatic erythrocytes and erythrocytes normochromatic (EPC / ENC) and the frequency of micronucleated erythrocytes. The essential oil in the doses tested, did not affect the growth of male and female rats treated. The results revealed by the ratio of EPC / forward, that the essential oil of oregano and the positive control with the major compounds caused a mild toxicity in the bone marrow of rats, through a slight depression in the bone marrow. There was a statistically significant increase (Kruskal-Wallis $p > 0.01$) frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes in 3 doses of essential oil of oregano, but increased the frequency of MNPCE positive control with the major components thus inducing genotoxicity in erythrocytes mice. Based on the results is possible to suggest that through this cytogenetic test the essential oil of oregano used in this experiment does not show genotoxic activity at the doses used.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Exemplar da planta orégano.....15
- FIGURA 2** – *Origanum vulgare* L com sumidades floridas.....17
- FIGURA 3** – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico (adaptado de Fenech, 2000) (RIBEIRO *et al.*, 2003).....24
- FIGURA 4** – Aparelho Destilador.....32
- FIGURA 5** – Contagem de eritrócitos, ENC: eritrócito normocromático; EPC: eritrócito policromático; MN: micronúcleo.....38
- FIGURA 6** – Cromatograma do íon total (GC/MS) da amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de 1.000 mg L⁻¹, em hexano. Picos identificados: ver Tabela 1.....39
- FIGURA 7** – Desenvolvimento ponderal dos machos e fêmeas (1º dia = 100%) tratados durante o período prévio à eutanásia, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....41
- FIGURA 8** - Número de eritrócitos normocromáticos (ENC) de machos, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....42
- FIGURA 9** - Número de eritrócitos normocromáticos (ENC) de fêmeas, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....43
- FIGURA 10** - Número de eritrócitos policromáticos (EPC) de machos, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....44
- FIGURA 11** - Número de eritrócitos policromáticos (EPC) de fêmeas, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....44

FIGURA 12 - Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, de machos tratados em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....45

FIGURA 13 - Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, de fêmeas tratadas em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).....46

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – Concentração (%) dos compostos presentes no óleo essencial de *O. vulgare* analisado por cromatografia gasosa (GC/MS).....40
- TABELA 2** - Relação de EPC/ENC de machos tratados com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).....47
- TABELA 3** - Relação de EPC/ENC de fêmeas tratadas com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).....47
- TABELA 4** - Frequência e relação de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de ratos Wistar machos tratados com três diferentes concentrações da substância teste.....48
- TABELA 5** - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de ratos Wistar fêmeas tratadas com três diferentes concentrações da substância teste.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

COVs	–	compostos orgânicos voláteis
DNA	–	ácido desoxirribonucléico
EPC	–	eritrócito policromático
ENC	–	eritrócito normocromático
EPCMN	–	eritrócito policromático micronucleado
GST	-	glutathione S – transferase
MN	–	micronúcleo
RNA	–	ácido ribonucléico
CAs	-	aberrações cromossômicas
MNs	-	micronúcleos
EPCs	-	eritrócitos policromáticos
EOs	-	óleos essenciais
OMS	-	organização mundial de saúde
EI	-	impacto eletrônico
SCE	-	troca de cromátides irmãs
NDI	-	índice de divisão nuclear
IR	-	índice de replicação
IM	-	índice mitótico
GCMS	-	cromatografia gasosa acoplada à detector de massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Orégano.....	15
2.1.1	Características gerais do <i>Origanum vulgare</i> L.	15
2.1.2	Composição química.....	17
2.1.3	Propriedades terapêuticas.....	18
2.2	Ensaio para a detecção de mutagênese.....	19
2.2.1	Teste de AMES.....	19
2.2.2	Sistema teste vegetal.....	20
2.2.3	Ensaio cometa.....	21
2.2.4	Teste SMART em <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2.2.5	Teste de micronúcleos.....	22
2.2.6	Teste de micronúcleos em medula óssea de roedores.....	22
2.3	Tipos de Mutagênese.....	24
2.4	Substâncias Mutagênicas.....	25
2.4.1	Mecanismo de ação das substâncias mutagênicas.....	26
2.5	Ensaio toxicológicos com orégano e seus compostos.....	27
2.6	Toxicidade de compostos de óleos essenciais.....	28
3	Objetivos Gerais.....	30
3.1	Objetivo Específico.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Material Vegetal.....	31
4.1.1	Origem, coleta e armazenamento.....	31
4.1.2	Obtenção do óleo essencial.....	31
4.1.3	Análise cromatográfica do óleo essencial.....	32
4.2	Animais.....	33
4.3	Protocolo Experimental.....	34
4.3.1	Seleção das concentrações da substância teste (Teste Preliminar).....	34
4.3.2	Formação dos grupos experimentais (Teste Definitivo).....	34
4.3.3	Tratamento dos animais.....	35
4.3.4	Eutanásia dos animais.....	36
4.3.5	Preparação das lâminas.....	36

4.3.6	Identificação e codificação das lâminas.....	37
4.3.7	Análise das lâminas.....	37
4.4	Análise Estatística.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Obtenção do óleo essencial de orégano e análise cromatográfica.....	39
5.2	Desenvolvimento Ponderal dos ratos.....	41
5.3	Número de Eritrócitos Normocromáticos (ENC).....	42
5.4	Número de Eritrócitos Policromáticos (EPC).....	43
5.5	Número de Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleos (EPCMN).....	45
5.6	Relação EPC/ENC.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
6.1	A escolha do teste de genotoxicidade.....	49
6.2	Desenvolvimento ponderal.....	50
6.3	Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN).....	50
6.4	A relação EPC/ENC.....	52
6.5	Compostos majoritários.....	54
6.6	Considerações finais.....	55
7	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VIEGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

O estudo das plantas medicinais, tradicionalmente utilizadas, é válido em dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de fármacos com potencial terapêutico, e em segundo, como medida de segurança para o uso popular (ELGORASHI *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 2005).

Neste contexto o orégano (*Origanum vulgare* L.) é uma planta originária das regiões da Ásia e Europa mediterrânea, pertence à família das lamiaceae, que atualmente apresenta vários potenciais terapêuticos, como antifúngico (CLEFF, 2008); antimicrobiano e antioxidante (SAHIN *et al.*, 2004).

A parte do orégano utilizada pela fitoterapia são as folhas, por possuírem um importante óleo essencial. De acordo com a literatura, os óleos essenciais do *Origanum vulgare* apresentam em torno de 34 compostos ativos, sendo que os compostos fenóis como carvacrol, timol, gama terpineno e *p* – cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (BAMPIDIS *et al.*, 2005). Segundo definição da ANVISA (BRASIL, 1999) os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processos físicos e podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Podem ser encontrados em todas as estruturas vegetais, ocorrem em diversos gêneros de plantas superiores, inferiores e constituem uma mistura complexa de substâncias, apresentando estruturas químicas heterogêneas (BRENNAN *et al.*, 2003).

Os organismos vivos estão habitualmente expostos a substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares, estes danos podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular e, por causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (COSTA e MENK, 2000).

Os estudos de genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse de comprovação da eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas. Isso se deve ao fato de muitas das plantas utilizadas por um grande número de pessoas, apesar de possuírem propriedades farmacológicas, também podem causar alterações no DNA (VARANDA, 2006). Na produção de um novo fármaco, os resultados de testes de genotoxicidade representam considerável peso, pois, a maioria das indústrias farmacêuticas libera o processamento de um novo agente terapêutico com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES *et al.*, 1995).

A Resolução-RE nº 90, de 16 de março de 2004, publicada no DOU do dia 18 de março de 2004, inclui um “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, onde indica o estudo especial para genotoxicidade, estudo que deve ser efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos. Deve ser feita avaliação *in vitro* da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo; e avaliação *in vivo* do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (teste de micronúcleo).

Baseados nos potenciais terapêuticos e utilização clínica do óleo essencial de orégano, os estudos toxicológicos são indispensáveis e complementares. Assim optamos avaliar a genotoxicidade do seu óleo essencial através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos. Este trabalho é complementar aos estudos químicos e potenciais terapêuticos do óleo essencial de orégano que vem sendo desenvolvidos em cooperação com o grupo de pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Orégano

2.1.1 Características gerais do *Origanum vulgare* L.

A espécie *Origanum vulgare* L. (orégano) (Figura 1), também chamado popularmente de manjerona-baiana, manjerona-selvagem, manjerona, oregão e ouregão, é uma erva perene e aromática nativa de regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, cultivada também no Brasil (LORENZI e MATOS, 2008), em solo úmido e fértil, mas se adapta a solos secos e calcários. A maioria das espécies é nativa do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), mas também cultivadas na Europa, Ásia e Taiwan (LORENZI e MATOS, 2008).

O orégano foi introduzido nas Américas para ser utilizado principalmente como tempero na culinária. O Chile é o principal produtor de orégano na América do Sul, seguido pela Bolívia e Perú, e produzido em menor escala na Argentina e no Uruguai (ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004; CASTRO e CHEMALE, 1995; KOKKINI *et al.*, 1994; TSINAS, 1999).



Figura 1 – Exemplar da planta orégano (Portal São Francisco, 2010).

O orégano é uma planta da família Lamiaceae, herbácea, muito ramificada, perene de caule ereto, por vezes corado de vermelho, por outras, com as hastes algumas vezes arroxeadas, podendo atingir de 30 a 50 cm, mas pode chegar até 80 cm de altura.

O plantio a campo é melhor em setembro, outubro ou novembro, sendo o espaçamento para plantio definitivo de 0,25 x 0,30m entre cada planta. A primeira colheita se dá em torno de 3 meses após o plantio e a mesma é anual. Suas folhas são esparsas - pubescentes, de 1 a 2 cm de comprimento, inteiras, pecioladas, ovais, pontiagudas e quase sem pêlos, flores numerosas, reunidas em inflorescências paniculadas terminais, esbranquiçadas, róseas ou violáceas, cor de rosa púrpura, rizoma rastejante, escuro e com raízes fibrosas (Figura 2). Sua propagação se dá por divisão de touceiras, sementes ou estacas e precisa de luz plena para seu desenvolvimento. É muito semelhante à *Origanum majorana* L. (manjerona-verdadeira), também cultivada no Brasil (LORENZI e MATOS, 2008; ZANANDREA *et al.*, 2004).

O gênero *Origanum* é composto por 3 grupos, 10 seções, 38 espécies, 6 subespécies e 17 híbridos, sendo caracterizado por uma grande diversidade morfológica e química. As diferentes espécies são amplamente empregadas e possuem diferentes nomenclaturas, os mais conhecidos são o orégano grego (*Origanum vulgare hirtum* L.), orégano turco (*Origanum onites* L.), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) (KOKKINI *et al.*, 1994; ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004).

O *O. vulgare* é utilizado como condimento e medicinalmente, sendo-lhe atribuídas diversas propriedades, tais como, antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante, anticancerígeno, antiespasmódico, carminativo, estimulante, emoliente e digestivo (ZANANDREA *et al.*, 2004).

A planta do orégano inteira é empregada na medicina caseira, cujo hábito foi originado na cultura italiana. O seu óleo é usado na composição de aromatizantes de alimentos e de perfumes. É cultivada no Sul e Sudeste do Brasil como especiaria de largo uso na culinária. São utilizadas suas folhas e flores frescas ou secas, pelo sabor e aroma que dá aos pratos (LORENZI e MATOS, 2008).



Figura 2 – *Origanum vulgare* L. com sumidades floridas (LORENZI e MATOS, 2008).

Em escala industrial o óleo essencial de orégano tem sido usado no preparo de cosméticos, vinagres e na dentística, no entanto, a importância do estudo destas plantas está principalmente relacionada às suas propriedades antimicrobianas (BARATTA *et al.*, 1998; DORMAN *et al.*, 2000; ALIGIANNIS *et al.*, 2001; VICHI *et al.*, 2001; BAYDAR *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005).

Sabe-se que o aroma próprio do orégano, é característico de espécies de plantas que produzem óleo essencial com um conteúdo relativamente alto de fenóis, mais especificamente, carvacrol ou timol (CASTRO e CHEMALE, 1995; SIMÕES e SPITZER, 2003).

2. 1. 2 Composição química

A composição química dos óleos essenciais e a percentagem de óleo presente nos vegetais variam muito conforme o clima, estação do ano, variedade e espécie, região, solo, estágio de crescimento da planta, época da colheita, além do método de extração (AMZALLAG *et al.*, 2005; KOKKINI *et al.*, 1994; SIMÕES e SPITZER, 2003; VAGI *et al.*, 2005).

Nas folhas e inflorescências do orégano é destacável a presença de até 1% de óleo essencial, com teor de 40 a 70 % de carvacrol, seguido de borneol, cineol, terpineol, terpineno e timol (LORENZI e MATOS, 2008).

Estima-se que as emissões de compostos orgânicos voláteis (COVs) pela vegetação são comparáveis aos emitidos de fontes antropogênicas (GUENTHER, 1999). Souza e colaboradores (2002) citam que nestes compostos voláteis incluem-se os hidrocarbonetos saturados e insaturados e os hidrocarbonetos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e álcoois, entre estes estão os monoterpenos.

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. 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).

2. 1. 3 Propriedades terapêuticas

O orégano tem alta atividade antioxidante pela presença do ácido fenólico e flavonóides. Adicionalmente tem propriedades antimicrobianas contra bactérias como *Listeria monocytogenes* e outros patógenos presentes nos alimentos, atuando como conservantes de alimentos (MARINO *et al.*, 2001). 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 (BUSSATA *et al.*, 2007; GIANNENAS *et al.*, 2003; OUSSALAH *et al.*, 2007). Cleff e colaboradores (2008) sugerem que a atividade antimicrobiana do *O. vulgare* tem sido atribuída aos compostos fenólicos que se encontram como componentes majoritários no seu óleo essencial, sendo que os principais são os monoterpenos e sesquiterpenos, como α -terpineno, γ -terpineno, ρ -cimeno, carvacrol e timol.

Calucci e colaboradores (2003) afirmam que alguns autores demonstraram que o orégano é uma fonte de vitamina C e outros compostos antioxidantes como

carotenóides, sendo também, encontrado um conteúdo de ácido ascórbico, de luteína e de zeaxantina no óleo essencial de *O. vulgare*.

Na medicina popular, o orégano é utilizado na forma de chá, como potente na cicatrização de feridas e úlceras gástricas, estimulante da atividade uterina (indução de partos), antihemorrágico, forte ação analgésica, espasmolítica, sudorífica, estimulante do sistema nervoso e digestivo e como antioxidante (LORENZI e MATOS, 2008; YUNES e CALIXTO, 2001).

A erva é considerada um expectorante brando, empregando medicinalmente suas folhas e inflorescências na forma de infusão ou decocto para tratar gripes e resfriados, problemas como tosse, bronquite, indigestão, distúrbios estomacais, flatulências, cólicas intestinais e cólicas menstruais. O orégano ainda é indicado para tratamento da dor de cabeça e alívio da irritação, além de ser utilizado para reduzir o enjôo do mar (LORENZI e MATOS, 2008).

A maceração de suas inflorescências em vinho durante 10 dias, preparada na concentração de 50 g para 1 litro, resulta em uma bebida doce, aperiente, béquica e digestiva, consumida contra bronquite, asma, artrite e dores musculares. Existem costumes populares de usar compressas feitas com uma almofada cheia de suas inflorescências frescas e levemente aquecidas para aliviar as dores do torcicolo. Na homeopatia é usada para a excitabilidade sexual (LORENZI e MATOS, 2008).

2. 2 Ensaios para a detecção de mutagênese

Muitos agentes químicos são capazes de provocar mutagenicidade em organismos vivos, sendo fundamental a avaliação desta mutação para garantir a saúde pública. Atualmente são utilizados diversos ensaios para detectar a mutagenicidade e citotoxicidade, direta ou indiretamente, de substâncias de uso humano, estes ensaios de atividade mutagênica podem ser *in vitro* ou *in vivo*, o que vai depender da especificidade da substância analisada. Aqui são apresentados os principais testes utilizados.

2. 2. 1 Teste de AMES

Muitas substâncias químicas podem ser avaliadas por sua ação mutagênica em bactérias. A metodologia mais utilizada para avaliação da atividade antimutagênica foi

descrita por Ames (1979). O método de Ames consiste em um ensaio simples utilizando uma linhagem-teste de bactérias, especificamente mutantes de *Salmonella typhimurium*, incapazes de crescerem na ausência de histidina. Essas bactérias na presença de drogas mutagênicas causam novas mutações originando uma certa reversão na mutação original proporcionando a síntese de histidina permitindo assim, o crescimento bacteriano (MACIEL *et al.* 2002).

Esse ensaio é realizado utilizando cultura de *Salmonella* mutante na presença ou ausência de homogenato de fígado de mamífero (STRYER, 1996) ou da fração microssomal (DIEL, 1999). A inibição da mutagenicidade é calculada pelo número de bactérias que foram revertidas em relação ao controle, levando-se em consideração as bactérias revertidas espontaneamente (MACIEL *et al.*, 2002).

2. 2. 2 Sistema teste vegetal

Sistemas testes vegetais como o de *Vicia faba*, e principalmente o de *Allium cepa*, têm sido utilizados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção de genotoxicidade (BAGATINI *et al.*, 2007). Esses sistemas também têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (MA *et al.*, 1995).

O sistema de teste de *Allium* é utilizado para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais, o sistema consiste na exposição das raízes da cebola em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. Assim, as alterações cromossômicas e as da divisão das células meristemáticas da raiz de cebola são testadas (VICENTINI *et al.*, 2001).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (BAGATINI *et al.*, 2007). O sistema de teste de *Allium* é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais, porque as suas raízes ficam em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de concentrações diferentes (BAGATINI *et al.*, 2007).

Os testes de citotoxicidade utilizando sistema teste vegetal *in vivo* estão validados por vários pesquisadores que realizaram de forma conjunta teste animal *in vitro*,

utilizando células de medula de rato Wistar e os resultados foram similares (VICENTINI *et al.*, 2001).

2. 2. 3 Ensaio cometa

O ensaio cometa é também conhecido como eletroforese em célula única e é empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. É um teste bastante sensível, simples e de custo relativamente baixo (ROSA, 2008). O teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, correspondendo a um teste citogenético (COLLINS *et al.*, 1997; COLLINS, 2004).

Este teste é uma avaliação de genotoxicidade, que detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de substâncias químicas, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (COLLINS, 2004).

O princípio deste ensaio leva em conta o comportamento do DNA, em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. As células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com o uso de detergentes em pH alcalino, e as proteínas nucleares são removidas com o uso de altas concentrações salinas. Na lâmina aparece apenas o nucleóide íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel em função do seu tamanho. Os fragmentos pequenos vibram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim, células com DNA danificado formam após a migração, o aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano sucedido (COLLINS, 2004; ROSA, 2008).

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações e sim lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, os danos detectados por este teste podem ser reparados (COLLINS *et al.*, 1997).

2. 2. 4 Teste SMART em *Drosophila melanogaster*

A mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) tem uma homologia genética com o organismo humano de 80 % e adicionalmente um número significativo de genes estudados na mosca provou ser homólogo de genes supressores de tumores em humanos (MIKLOS e RUBIN, 1996). Em função destas similaridades a *Drosophila* é considerada

um excelente modelo para estudar a genotoxicidade e seus mecanismos moleculares (AMARAL, 2001).

Em toxicologia tem-se utilizado a *Drosophila* principalmente para a obtenção de respostas em células germinais, por meio dos testes para a detecção de Letal Recessivo Ligado ao Sexo (SLRL) e para Perda do Cromossomo X em Anel (RXL) permitindo assim, o diagnóstico de agentes mutagênicos e clastogênicos. A análise dos danos induzidos é feita pela observação de grupos celulares com fenótipo marcador específico (mwh; flr³), que se manifestam na forma de tricomas mutantes. Estes fenótipos manifestam-se devido à perda da heterozigose induzida pelos diferentes tipos de eventos genotóxicos (AMARAL, 2001).

2. 2. 5 Teste de micronúcleos

O teste de micronúcleo *in vivo* foi descrito pela primeira vez por Schmid (1975).

Micronúcleos são núcleos pequenos, ou seja, pequenos corpúsculos arredondados de cromatina, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os micronúcleos podem ser formados como consequência da ação de agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a diminuição de cromossomos (clastogênicos), levando a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). Estes são, portanto, mutagênicos. A vantagem deste teste é basicamente a simplicidade, sendo de fácil execução, e o fato de ser de fácil análise permite que um grande número de células possa ser analisado em um curto espaço de tempo (MATEUCA *et al.*, 2006).

O teste baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso, preferencialmente, células de mamíferos, medula óssea ou sangue periférico, de animais devidamente tratados (FLORES e YAMAGUCHI, 2008).

2. 2. 6 Teste de micronúcleos em medula óssea de roedores

O teste de micronúcleo em medula óssea de roedores, *in vivo*, é um dos testes citogenéticos mais utilizado e aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais para a detecção de mutagênese cromossômica de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou secreção cromossômica anormal), danos no fuso mitótico, aberrações numéricas e cromossômicas. Internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi desenvolvido de início, em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos, portanto, aplicável a qualquer população celular nucleada (FENECH, 2000, 2006, 2007; HAYASHI *et al.*, 1994; MACGREGOR *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 2004).

Eritrócito policromático (EPC) é um eritrócito imaturo, em estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático por coloração seletiva para ribossomos. Eritrócito normocromático (ENC) é um eritrócito maduro, sem ribossomos e pode ser distinguido do eritrócito imaturo (policromático) pela coloração seletiva para ribossomos ou RNA (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Neste teste, o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (EPCs) que têm um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Ribeiro e colaboradores (2003) citam que na medula óssea, a célula tronco hematopoiética dá origem aos eritroblastos, estes sofrem uma duplicação final dos cromossomos, se dividem (ocorre a expulsão do núcleo) e se diferenciam em eritrócitos policromáticos, sendo que esse processo todo perdura de 10 a 12 horas. Na corrente sanguínea, os eritrócitos policromáticos se diferenciam em eritrócitos normocromáticos (ENC) e, posteriormente, em eritrócitos, perdurando este processo 24 horas.

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebra podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem, também, se formar a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o MN irá conter o

centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas. Durante a diferenciação, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os micronúcleos ficam retidos conforme Figura 3 (RIBEIRO *et al.*, 2003).

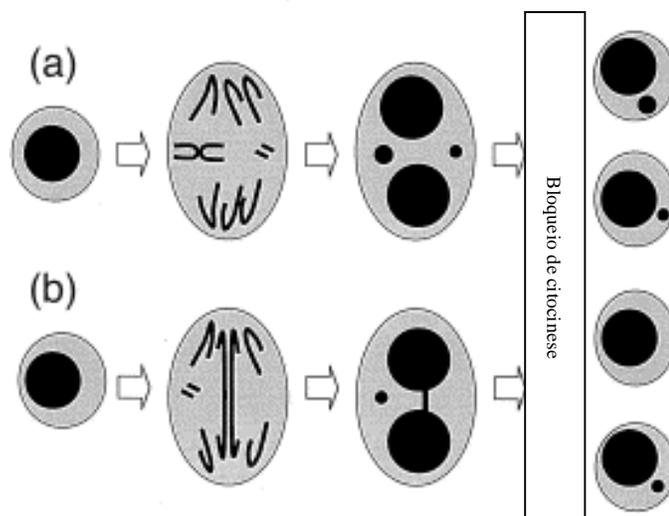


Figura 3 – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico (adaptado de Fenech, 2000) (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os animais são expostos à substância teste pela via oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou intradérmica, mas para o Teste do Micronúcleo, a substância química teste é, geralmente, administrada por via oral (gavage) ou por injeção intraperitoneal. São eutanasiados em 18 e 24 horas após o tratamento, para a coleta da medula óssea. Os esfregaços de medula óssea são corados adequadamente e analisados para a presença de micronúcleos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

2. 3 Tipos de mutagênese

Mutações são mudanças na sequência dos nucleotídeos do material genético de um organismo, podem ser causadas por erros de cópia do material durante a divisão celular, por exposição a radiação ultravioleta ou ionizante, mutagênicos, químicos, ou vírus (LEROI, 2003). As mutações têm origem nas falhas em mecanismos endógenos (replicação e reparo) e em modificações químicas diretas em uma das bases do DNA (LOPES, 2008).

Segundo Lombardi e colaboradores (2009) as mutações são classificadas em:

- **Genômicas (Aneuploidias e Poliploidias):** afetam o número de cromossomos intactos que surgem de erros de segregação cromossômica durante a meiose ou mitose.

- **Cromossômicas:** São desequilíbrios que envolvem somente uma parte de um cromossomo. Tais como, duplicações, deleções, inversões e translocações.
- **Gênicas:** afetam a estrutura do gene, são alterações no número de cromossomos.

2. 4 Substâncias mutagênicas

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares. Os danos podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular. Estas substâncias são conhecidas como genotóxicas por causarem lesões no material genético (BAGATINI, 2007).

Compostos com atividades biológicas, há tempos vem sendo avaliados, no entanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; KONSTANTOPOLOU *et al.*, 1992).

Substâncias com ação clastogênica são aquelas que quebram os cromossomos, é um tipo de aberração cromossômica, sendo esta quebra espontânea ou induzida. Sabe-se que os agentes alquilantes, alguns tipos de irradiação e substâncias mutagênicas provocam a quebra cromossômica induzida. Este tipo de aberração pode induzir a translocação de pares de bases, eliminações e quebra de cromátides (ELLIS, *et al.*, 2001).

Substâncias aneugênicas, são as que induzem aneuploidia ou secreção cromossômica anormal, a célula tem seu material genético alterado, sendo portador de um número cromossômico diferente do normal da espécie. Podendo ter uma diminuição ou aumento do número de pares de cromossomos, porém não de todos. A maioria dos afetados apresentam trissomia (três cromossomos ao invés de dois cromossomos), ou, menos comum, monossomia (apenas um cromossomo ao invés de dois cromossomos). O fator cromossômico mais usual é a não-disjunção meiótica, um erro na separação de um par cromossômico durante uma das duas divisões meióticas. Podendo ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II (ELLIS, *et al.* 2001).

Substâncias mutagênicas têm sido utilizadas em testes de genotoxicidade como controles positivos. Alguns exemplos de controles positivos recomendados e suas

respectivas doses são o etil-metanosulfonato 200 mg.kg, N-etil-n-nitrosourea 50 mg.kg, ciclofosfamida 50 mg.kg e mitomicina C 1 mg.kg (RIBEIRO *et al.*, 2003).

2. 4. 1 Mecanismo de ação das substâncias mutagênicas

Sabe-se que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos. Substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, à consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos (VARANDA, 2006).

A lesão genotóxica, é uma lesão a um ácido nucleico, correspondendo a uma alteração na estrutura física da dupla hélice, perturbando as funções que necessitam da integridade conformacional do polímero, tais como a replicação e transcrição. Após o estresse genotóxico, as vias de sinalização ativadas pela presença do dano reduzem a velocidade de progressão do ciclo celular, com o intuito de favorecer a reparação do material lesado (BARTEK e LUKAS, 2007; HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

O dano em nível de DNA tem como consequência direta às anormalidades na estrutura do cromossomo. As quebras cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas, e os arranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. Na carcinogênese, a perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (FENECH, 2000).

Quando a lesão é muito complexa e ou muito numerosa, as vias de indução de morte celular programada eliminam a célula danificada da população (HOUTGRAAF *et al.*, 2006). No entanto, algumas vezes, um sistema de reparação de DNA permite que a célula tolere o dano (síntese translesão de DNA) e embora não consiga corrigir a lesão eficientemente, garante à sobrevivência celular, desse modo, as lesões removidas de forma ineficiente acabam gerando a restauração imperfeita da sequência de nucleotídeos original, causando mutação gênica (JEGGO e LOBRICH, 2006).

2. 5 Ensaios toxicológicos com o orégano e seus compostos

Os óleos voláteis estão presentes em vegetais que constituem a dieta humana habitual e, também são incluídos como aditivos flavorizantes em alimentos e bebidas, como fragrâncias em cosméticos, em produtos domésticos sanitários e como princípios ativos de medicamentos. A toxicidade dos óleos bem como de seus compostos depende da dose, sendo muitas vezes produzidas reações tóxicas somente em doses elevadas (HENRIQUES *et al.*, 2009).

O estudo das plantas medicinais, tradicionalmente utilizadas, é válido por dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de fármacos com potencial terapêutico, e em segundo, como medida de segurança para o uso popular (ELGORASHI *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 2005).

Muitos testes genéticos buscam agentes que possam afetar o genoma, se um agente pode causar danos ao DNA, este tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou em microrganismos). Porém, organismos diferentes possuem metabolismos e mecanismos de reparação e de detoxificação que variam muito de um para outro, tornando diferentes também suas respostas a agentes genotóxicos (VILLELA, 2006).

Estudos em genotoxicidade têm sido feitos para comprovar a atividade antimutagênciã 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 glutatona S – transferase (GST) nos tecidos analisados, sugerindo atividade anticancerígena, sendo que a GST exerce função na detoxificação da carcinogênese química.

Ipek e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do óleo essencial de *Origanum onites* L. e de carvacrol, através do teste de 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 e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimutagênica e mutagênica pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, do óleo essencial de

Origanum compactum. Não observaram 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 à atividade genotóxica por Karpouhtsis e colaboradores (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 genotóxica.

Fletcher e colaboradores (2005) realizaram uma investigação *in vitro* do potencial mutagênico de uma variedade de óleos de *Melaleuca angustifolia* disponíveis comercialmente e também do principal componente do óleo, o monoterpeneo 4-terpineol, através do teste de AMES. Os resultados mostraram que todas as marcas do óleo e o monoterpeneo só apresentaram toxicidade na maior dose utilizada, nos níveis de 1500-2000 mg / mL.

2. 6 Toxicidade de compostos de óleos essenciais

Embora os monoterpeneos sejam conhecidos por serem substâncias seguras, para alguns deles, como a pulegona, foi detectada propriedade hepatotóxica, o safrol possui propriedade genotóxica e carcinogênica (CHAN e CALDWELL, 1992; BAKERINKE *et al.*, 1996).

Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de conhecer a possível mutagenicidade de compostos voláteis, pelo teste de AMES. Desta forma foi observado que os seguintes compostos não apresentam toxicidade: α – terpineno, 1,8 cineol, α – terpineol, *p* – cimeno, limoneno, α – pineno, β – pineno, linalol, mirceno e 4-terpineol (HENRIQUES *et al.*, 2009).

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.*, 2005).

Em trabalho realizado com β – mirceno, α – terpineno e α – pineno foi observado, pelo teste de AMES, que nenhum dos três compostos apresenta genotoxicidade. Os resultados obtidos sugerem que monoterpeneos hidrocarbonados não

são mutagênicos (GOMES-CARNEIRO *et al.*, 2005). Outro monoterpeneo cíclico estruturalmente similar, *d* – limoneno, também não demonstrou ser mutagênico pelo mesmo método (IARC, 1999). Para *d* – limoneno há relatos de que este composto seja tanto um agente carcinogênico renal como uma substância anticarcinogênica, dependendo da dose (GOULD, 1997). Em outro estudo envolvendo α - terpineno foi verificada embriofetotoxicidade dose-dependente em modelos de ratos levando à mal - formações do esqueleto (ARAÚJO *et al.*, 1996).

Dados de citotoxicidade *in vitro* têm sido utilizados para prever ou estimar irritações cutâneas e correlações entre os dados *in vitro* e *in vivo* (HENRIQUES *et al.*, 2009). Estudo realizado para verificar a citotoxicidade de diversas linhagens celulares demonstrou que 4-terpineol, 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).

3. Objetivos Gerais

Determinar os riscos da utilização do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano), especialmente no que se refere ao potencial genotóxico.

Avaliar o potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano), através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar em três diferentes doses.

Fornecer instruções para detectar substâncias que causem danos citogenéticos em cromossomos ou no aparelho mitótico de eritroblastos que resultem na formação de micronúcleos contendo fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

3.1 Objetivo Específico

Extrair e analisar por cromatografia gasosa o óleo essencial de *O. vulgare* e determinar os principais constituintes do óleo.

Avaliar o desenvolvimento ponderal dos ratos Wistar durante o período experimental, nos diferentes tratamentos.

Determinar a proporção de EPC entre os eritrócitos de machos e fêmeas de ratos Wistar submetidos aos diferentes tratamentos.

Determinar a frequência de EPCMN em medula óssea de ratos Wistar, machos e fêmeas nos diferentes tratamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 Material Vegetal

4. 1. 1 Origem, Coleta e Armazenamento

O *Origanum vulgare* L. foi adquirido de distribuidor comercial, importado pela Ricex Importação e Exportação LTDA. de São Paulo – Brasil. O orégano seco utilizado neste experimento é originário do Perú, pertencente à marca Oro Verde, sendo produzido em junho de 2009.

O material vegetal utilizado era composto somente das folhas do orégano, sendo estas embaladas em sacos de papel pardo (pesando aproximadamente 12,5 kg cada) revestidos internamente com uma camada plástica e armazenados em local fresco, seco e livre da exposição solar no Laboratório do Departamento de Farmacologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, até o momento da extração do óleo essencial.

A abertura das embalagens comerciais foi realizada somente no momento da extração, sendo todo material vegetal pertencente ao mesmo lote de produção.

4. 1. 2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial do orégano foi extraído pelo método laboratorial denominado destilação com arraste de vapor no laboratório do instituto de química da UFRGS, Porto Alegre/RS, utilizando para tanto o equipamento desenvolvido pelo engenheiro mecânico Edgar Witkowski, da empresa Schmitt e Vaz Indústria e Comércio de Óleos Vegetais, Máquinas e Equipamentos, Porto Alegre/RS. Onde se usou 1 Kg de folhas secas de orégano por vez, obtendo-se melhor rendimento na extração de óleo. Deste volume de planta, foi extraído 6 ml de óleo essencial em média. Durante todo o experimento foi gasto aproximadamente 30 g de óleo.

O aparelho de extração por arraste de vapor usado neste experimento consiste de uma caldeira contendo água aquecida até o ponto de ebulição e logo acima dela um reservatório contendo as folhas da planta. Quando o vapor proveniente da caldeira, passa, subindo através do reservatório contendo o material, leva consigo pequenas gotas de óleo. Essas gotas seguem com o vapor de água até um condensador onde são resfriadas e coletadas em um balão volumétrico, já que a água e o óleo formam frações

separadas (Figura 4). A destilação por arraste de vapor é uma destilação de misturas imiscíveis de compostos orgânicos e água (no caso, o óleo volátil). O princípio desta destilação baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais. 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 4 – Aparelho Destilador (Edgar Witkowski, 2009).

4. 1. 3 Análise cromatográfica do óleo essencial

As análises cromatográficas do óleo essencial do orégano foram realizadas no laboratório do instituto de química da UFRGS, Porto Alegre/RS, pela Dr.^a e Professora Maria Regina A. Rodrigues, em cromatógrafo gasoso com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shimadzu QP-5050A, visando à identificação dos principais constituintes químicos. Foram preparadas soluções ($1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do óleo essencial, sendo injetados $1 \mu\text{L}$ dessas soluções. Também foi preparada uma solução ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dos padrões cromatográficos (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, α -terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α -terpineol, timol e carvacrol), que foi submetida às mesmas condições das amostras, utilizando como método de ionização o impacto eletrônico (EI) com energia de ionização de 70

eV. Foi utilizada a coluna capilar OV-5 (metil silicone com 5% de grupos fenila) com 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária e 30 m de comprimento. Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas:

Temperatura detector= 180°C

Temperatura injetor= 240°C

Fluxo= 1,0 mL/min

Split= 1:10

Coluna: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm(micro)m)

Rampa de aquecimento:

60°C - 240° a 3°C/min, a 10°C/min até 280°C

Foram injetadas no equipamento, inicialmente, 1 µl de soluções de concentrações variadas de padrões para obtenção do tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano. Posteriormente foi preparada uma solução de óleo a 5000 ppm em hexano, que foi injetada no cromatógrafo e seu comportamento químico foi comparado com o comportamento dos padrões cromatográficos anteriormente injetados em relação aos tempos de retenção na coluna cromatográfica, com base nos espectros de massas da biblioteca Willey e NIST do equipamento com dados da literatura (RODRIGUES, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade inicial de 7 semanas, hípidos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) com condições constantes de umidade, temperatura (21°C ± 2) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h às 20h). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram aclimatados às condições ambientais do Biotério Setorial, durante 15 dias antes do início da fase experimental, sendo alojados coletivamente por sexo (n = 5/caixa) em caixas de polipropileno destinadas à manutenção de ratos.

O alojamento, manejo e eutanásia seguiram a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e os princípios éticos na

experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996).

O projeto de pesquisa intitulado “Estudo da genotoxicidade de óleo essencial do orégano comum (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, número do projeto: 2008067 e cadastrado no sistema de Pesquisa da UFRGS (Nº 15062).

4. 3 Protocolo Experimental

4. 3. 1 Seleção das concentrações da substância teste (Teste Preliminar)

Para a seleção das concentrações da substância teste a ser utilizada na condução do estudo definitivo, foi realizado um experimento preliminar com 18 animais. Para tanto, foram constituídos 3 grupos experimentais com 6 animais cada (3 machos e 3 fêmeas), usando o mesmo protocolo e as mesmas condições do estudo principal, porém focando no aparecimento de sinais clínicos de toxicidade para o animal (diarréia, falta de vontade de comer ou beber água, perda de peso).

Devido a ausência de dados toxicológicos do óleo essencial do orégano (DL50), que poderiam nortear o estabelecimento das doses de estudo, foi utilizada como dose máxima tolerada (DMT) a dose de 2000 mg/kg (OECD, 1997). Esta dose é a dose mais alta que pode ser administrada sem induzir mortalidade, morbidade, toxicidade excessiva ou depressão medular durante a condução de um estudo. As duas doses mais baixas testadas foram correspondentes a 50% e 25% da DMT.

Desta forma, cada um dos grupos citados acima recebeu as seguintes doses de tratamento: 2000 mg.kg⁻¹, 1000 mg.kg⁻¹ e 500 mg.kg⁻¹. Não apresentando sinais clínicos, foram utilizadas estas mesmas doses no Teste Definitivo.

4. 3. 2 Formação dos Grupos Experimentais (Teste Definitivo)

Foram constituídos 6 grupos experimentais, formados por 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas), sendo que os animais foram selecionados aleatoriamente, baseado em sorteio prévio, considerando o número da caixa de origem (caixa de manutenção durante a aclimatação), o sexo em questão e o número individual do animal.

- Grupos Experimentais

Grupo Controle Negativo (GC-): Tratado com o veículo empregado na dissolução do óleo essencial de orégano, 0,001 ml de Tween 80 em 100 ml de água destilada (10 ml.kg^{-1}) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

Grupo I (GD I): Tratado com a concentração de 2000 mg. kg^{-1} de óleo essencial (equivalente a massa aproximada de 2g do óleo em 10 ml do veículo utilizado na dissolução) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

Grupo II (GD II): Tratado com 1000 mg. kg^{-1} de óleo essencial (equivalente a massa aproximada de 1g do óleo em 10 ml do veículo utilizado na dissolução) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

Grupo III (GD III): Tratado com 500 mg. kg^{-1} de óleo essencial (equivalente a massa aproximada de 0,5g do óleo para 10 ml do veículo utilizado na dissolução) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

Grupo Controle Positivo – Ciclofosfamida (GC+): Tratado com 25 mg.kg^{-1} ciclofosfamida (equivalente a massa aproximada de 0,029 g de Genuxal[®] diluída em 8 ml de água destilada) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

Grupo Controle Positivo – Compostos Majoritários (GC+ CM): Tratado com a associação dos compostos fenólicos do orégano, timol e 4- terpineol, na concentração de 2000 mg.kg^{-1} (equivalente a massa aproximada de 0,04g timol e 0,15g 4-terpinol para 10 ml do veículo utilizado na dissolução) (n = 5 machos e 5 fêmeas).

4. 3. 3 Tratamento dos animais

Os animais experimentais, machos e fêmeas, foram tratados diariamente por via oral, com sonda oro-gástrica flexível. A massa corporal individual foi aferida diariamente, para estabelecimento do volume de administração. Todos os animais foram tratados com volume idêntico, correspondendo a 10 ml.kg^{-1} .

Os animais pertencentes aos Grupos I, II e III e GC- e GC+CM, tratados com o óleo essencial do orégano, com o veículo e com a associação dos padrões

cromatográficos, respectivamente, foram tratados durante 3 dias consecutivos. O GC+ foi tratado durante dois dias consecutivos, iniciando a dosificação a partir do segundo dia de tratamento dos demais grupos.

O intervalo entre tratamentos em todos os grupos experimentais foi 24 horas, sendo que a medula óssea foi coletada entre 18 e 24 horas após o último tratamento dos animais.

4. 3. 4 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados 24 horas após o último tratamento em câmara de CO₂. Os animais foram eutanasiados em grupos, respeitando-se o intervalo de tempo suficiente para preparação completa das lâminas dos ratos.

4. 3. 5 Preparação das lâminas

Após a eutanásia, cada animal foi colocado sobre uma bancada em decúbito dorsal. Foi realizada anti-sepsia com álcool 70% nos membros posteriores. A pele de cada uma das patas foi incisada com tesoura, e ambos os fêmures de cada animal foram retirados. O excesso de tecido, ao redor do osso foi removido com tesoura e pinça de dissecação, bem como com o auxílio de papel toalha absorvente, através de fricção leve na superfície externa do fêmur (RIBEIRO, 2003).

Após a limpeza dos ossos, as duas epífises foram removidas com o auxílio de uma tesoura, a fim de possibilitar a visualização e o acesso ao canal medular. A medula óssea de cada fêmur foi extraída com auxílio de uma seringa de 1 ml previamente preenchida com soro fetal bovino (Laborclin). A agulha foi inserida na abertura do fêmur, injetando-se o soro fetal bovino, de modo a empurrar a medula diretamente sobre uma lâmina, previamente identificada com o número e grupo do animal, e com o fêmur correspondente (direito ou esquerdo). Para cada fêmur foi necessário a confecção de uma lâmina de análise, totalizando duas lâminas por animal.

Após a coleta em lâmina, a medula foi macerada com uma espátula metálica e misturada com o soro fetal bovino até ser obtida uma mistura homogênea para posterior realização de esfregaço.

As lâminas de cada um dos fêmures de todos os animais (duas lâminas por animal) foram secas ao ar, durante aproximadamente 24 horas, secas e fixadas em metanol, por dez minutos.

Transcorridas 24 horas após a fixação das lâminas, as mesmas foram coradas com uma solução contendo 5% de GIEMSA® e 95% de tampão fosfato com pH correspondente a 5,9, ficando imersas por dez minutos.

Após este período, as lâminas foram submetidas a um enxágue com água corrente para a remoção do excesso da solução corante, e foram secas ao ar ambiente.

4. 3. 6 Identificação e codificação das lâminas

As lâminas de extremidade fosca foram identificadas inicialmente com o código do grupo, com o número do animal e com a identificação do fêmur correspondente (direito ou esquerdo).

Posteriormente a marcação inicial e antes da microscopia, as lâminas foram codificadas para realização de “análise cega”. A identificação inicial de cada lâmina foi coberta com fita adesiva preta, e sobre esta fita foi fixada uma nova etiqueta branca contendo números sequenciais de 1 a 120. Este foi então o novo código atribuído a cada lâmina preparada com as células provenientes da medula óssea dos ratos tratados.

Foi criada uma tabela de decodificação onde foi preenchido o resultado da análise microscópica, com base no código final de cada preparado (numeração de 1 a 120).

A codificação das lâminas não foi feita pelo mesmo analista que as analisou em microscópio. A leitura foi feita no laboratório de farmacologia do ICBS da UFRGS, Porto Alegre/RS.

4. 3. 7 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento médio inicial entre 200 e 400 vezes, para identificação de campos com boa qualidade técnica, onde as células estejam bem espalhadas, coradas adequadamente e íntegras.

Após a identificação deste local, a leitura das lâminas foi realizada com aumento de mil vezes (objetiva de imersão) ao acaso, seguindo um movimento de zig-zag.

A análise foi feita em 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) por lâmina, totalizando 2000 EPCs por animal. O número de células micronucleadas (EPCs com micronúcleos) foi registrado em uma planilha.

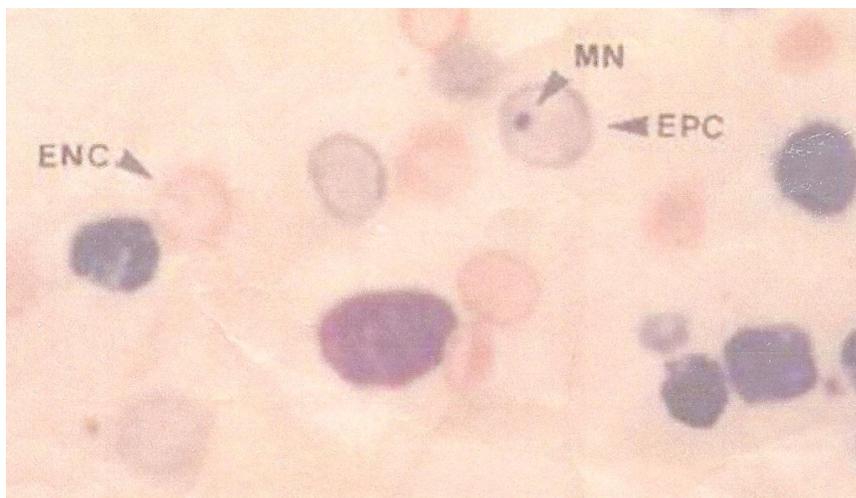


Figura 5 – Contagem de eritrócitos, ENC: eritrócito normocromático; EPC: eritrócito policromático; MN: micronúcleo (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A relação entre o número de EPC (eritrócito policromático) e o número de ENC (eritrócito normocromático) encontrados foi também determinada em cada lâmina lida, analisando-se 500 eritrócitos por lâmina (totalizando 1000 eritrócitos por animal).

Após ambas as leituras e registros, foram realizados a decodificação dos resultados e os agrupamentos dos dados levando em consideração as suas origens.

4.4 Análise estatística

A metodologia utilizada para análise estatística inclui os testes: análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis e o teste Qui-quadrado para as variáveis qualitativas, sempre que se fizer necessário a comparação entre médias, ou no caso de $p < 0,05$ realizou-se o Teste Tukey.

Todas as variáveis respeitaram os valores estatisticamente significativos, com uma confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) para ANOVA; Kruskal-Wallis e 99% ($\alpha = 0,01$) para o Qui-quadrado. Os programas utilizados para efetuar essas análises foram o SPSS 18 e o EXCEL 2007 (LAPPONI, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do óleo essencial de orégano e análise cromatográfica

O óleo essencial do orégano foi extraído pelo método denominado destilação por arraste de vapor.

As análises cromatográficas do óleo essencial do orégano foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shimadzu QP-5050A, ao longo de toda extração. Os picos cromatográficos demonstrados na Figura 6 representam os compostos do óleo essencial de orégano em maior quantidade na amostra analisada. Os constituintes presentes em maior quantidade são chamados de compostos majoritários. De acordo com a Tabela 1 os compostos 4-terpineol e timol se apresentaram nos picos 15 e 22, como majoritários.

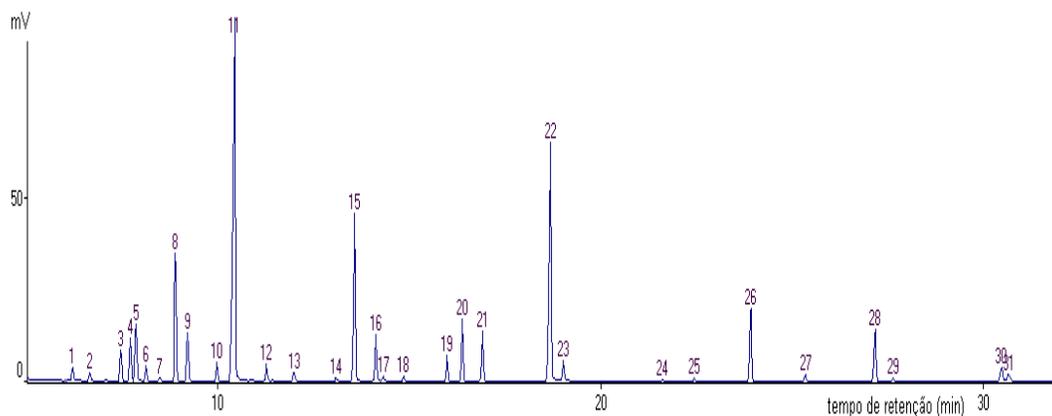


Figura 6 – Cromatograma do íon total (GC/MS) da amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de 1.000 mg L^{-1} , em hexano. Picos identificados: ver Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração (%) dos compostos presentes no óleo essencial de *O. vulgare* analisado por cromatografia gasosa (GC/MS).

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	C (%)
1	6,22	α -pineno *	0,60
2	6,67	Mirceno	0,38
3	7,48	α -terpineno*	1,45
4	7,73	<i>p</i> -cimeno*	1,93
5	7,87	Limoneno*	2,73
6	8,14	cis-ocimeno	0,68
7	8,49	trans-ocimeno	0,18
8	8,90	γ -terpineno*	6,30
9	9,22	trans-sabineno hidratado	2,58
10	9,98	α -terpinoleno*	1,04
11	10,45	cis-sabineno hidratado	27,46
12	11,27	<i>p</i> -ment-2-en-1-ol	0,92
13	12,00	<i>p</i> -ment-2-en-1-ol	0,62
14	13,10	borneol	0,27
15	13,58	4-terpineol*	10,55
16	14,13	α -terpineol*	2,74
17	14,33	trans-piperitol	0,36
18	14,86	cis-piperitol	0,45
19	15,99	Éter metil timol	1,48
20	16,39	Éter metil carvacrol	3,59
21	16,92	Acetato de linalila	2,98
22	18,70	Timol*	17,97
23	19,04	Carvacrol*	1,29
24	21,63	Acetato de nerila	0,19
25	22,46	Acetato de geranila	0,29
26	23,93	β -cariofileno	4,71
27	25,36	α -humuleno	0,50
28	27,18	Germacreno	3,57
29	27,65	Farnesol	0,31
30	30,47	Espatunelol	1,05
31	30,66	Óxido de cariofileno	0,83

C (%) = áreas dos picos normalizadas, sem usar fator de correção.

* Compostos identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões.

Outros compostos identificados com base nos espectros de massas da biblioteca Willey e NIST do equipamento e pelos dados da literatura (RODRIGUES *et al.*, 2004; BUSSATA *et al.*, 2007).

5.2 Desenvolvimento Ponderal dos Ratos

O ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) foi calculado através da avaliação da massa corporal (g) durante os 4 dias de tratamento prévios à eutanásia dos animais experimentais (Figura 7).

A análise estatística não demonstrou efeito de interação entre tratamento e sexo e também não existe efeito entre sexos. Verificou-se que todos os grupos apresentaram ganho relativo de massa corporal semelhante durante o período de tratamento, sem apresentar diferença estatisticamente significativa (ANOVA $p=0,201$).

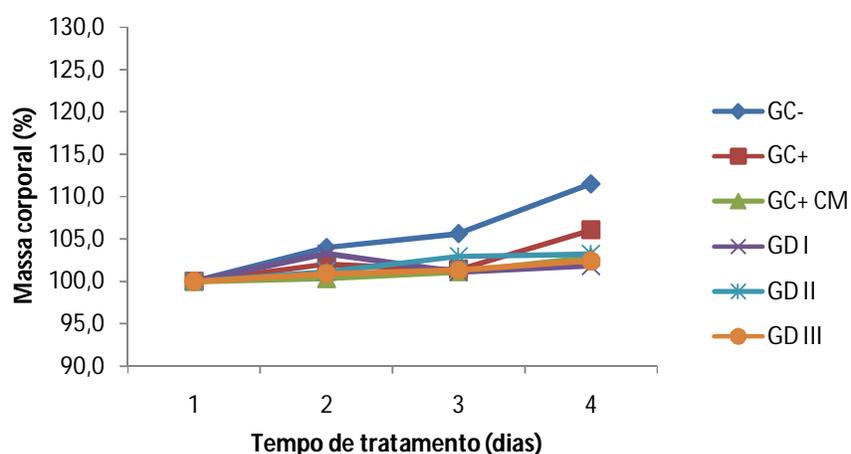


Figura 7 - Desenvolvimento ponderal de machos e fêmeas (1º dia = 100%) tratados durante o período prévio à eutanásia, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg^{-1} (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo ($n = 5$ machos e $n = 5$ fêmeas).

5.3 Número de Eritrócitos normocromáticos (ENC)

As Figuras 8 e 9 mostram o número de ENCs contados em esfregaço sanguíneo da medula óssea dos ratos machos e fêmeas, respectivamente. Foram contados 500 ENC por medula de rato, totalizando 1000 eritrócitos por animal para a relação ENC/EPC em cada grupo de tratamento. Machos e fêmeas tratados diariamente por via oral com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo utilizando os padrões cromatográficos representando os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Deste parâmetro não foi realizada análise estatística, pois isoladamente não possui relevância significativa para o resultado final, o número de eritrócitos normocromáticos, que são eritrócitos maduros, sem ribossomos e tem a função de compor a relação de ENC e EPC.

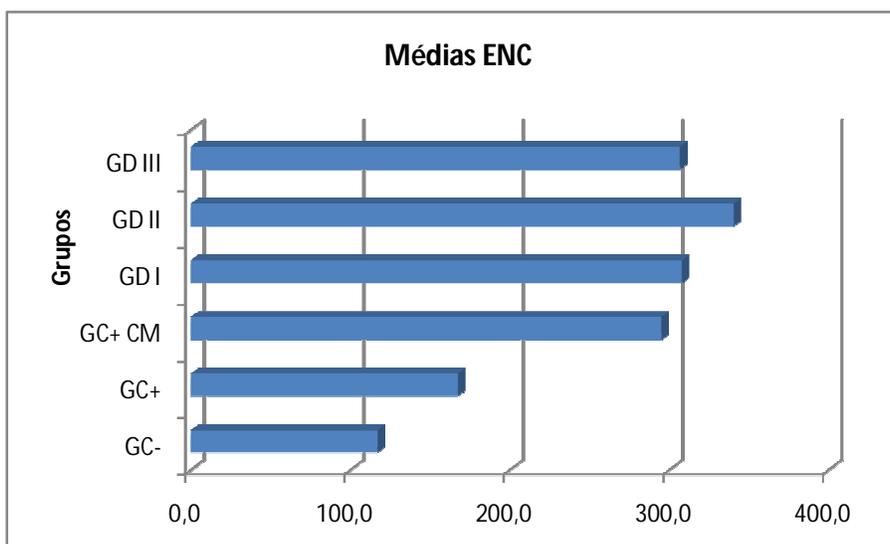


Figura 8 - Número de eritrócitos normocromáticos (ENC) de machos, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

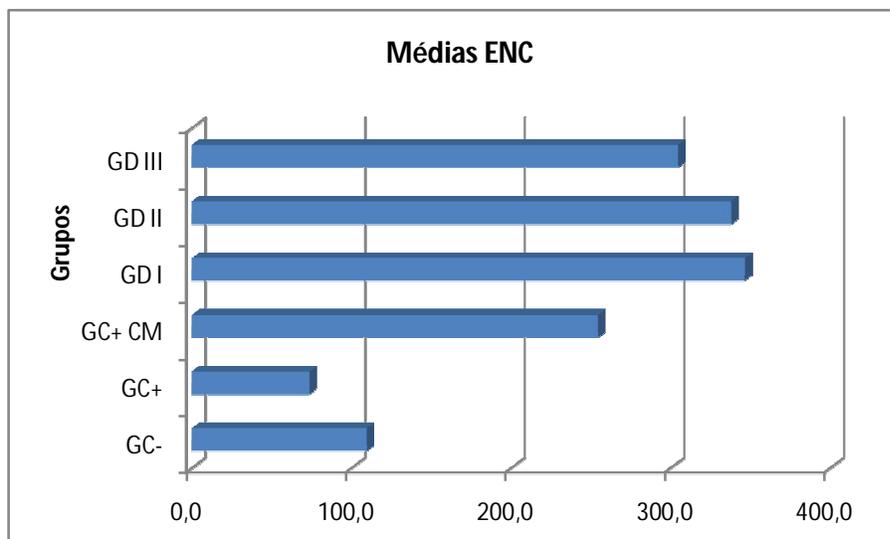


Figura 9 - Número de eritrócitos normocromáticos (ENC) de fêmeas, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg^{-1} (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo ($n = 5$).

5. 4 Número de Eritrócitos policromáticos (EPC)

As Figuras 10 e 11 mostram o número de EPCs contados em esfregaço sanguíneo da medula óssea dos ratos machos e fêmeas, respectivamente. Foram contados 1000 EPCs por medula de rato, totalizando 2000 eritrócitos por animal em todos os grupos experimentais. Machos e fêmeas tratados diariamente por via oral com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg^{-1} (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo utilizando os padrões cromatográficos representando os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Também neste parâmetro não foi realizada análise estatística, pois isoladamente não possui relevância significativa para o resultado final. O eritrócito policromático, é um eritrócito imaturo, que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático por coloração seletiva para ribossomos. Estes eritrócitos têm a função de compor a relação de ENC e EPC.

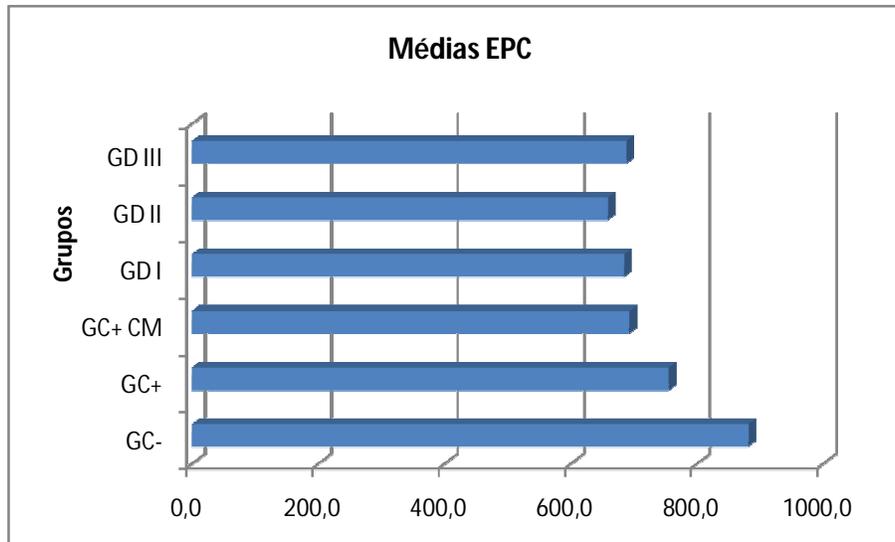


Figura 10 - Número de eritrócitos policromáticos (EPC) de machos, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

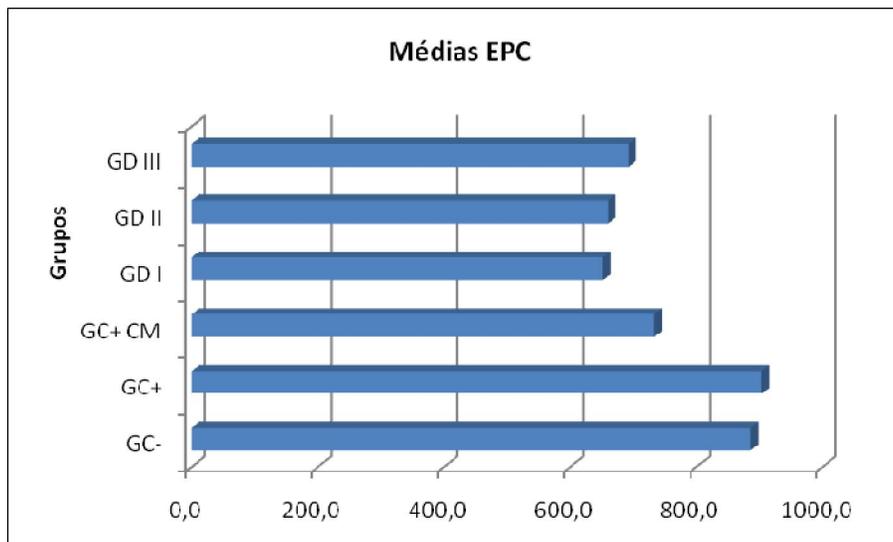


Figura 11 - Número de eritrócitos policromáticos (EPC) de fêmeas, contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

5. 5 Número de Eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN)

As Figuras 12 e 13 mostram o número de EPCMN contados em esfregaço sanguíneo da medula óssea dos ratos machos e fêmeas, respectivamente. Foram contados 1000 EPCs por medula de rato, totalizando 2000 eritrócitos por animal, dos quais foi contado o número de células micronucleadas. Machos e fêmeas foram tratados diariamente por via oral com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo utilizando os padrões cromatográficos representando os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Na análise estatística, através da Análise de Variância Não – Paramétrica de Kruskal-Wallis, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, relativos ao número de células EPCMN.

Sendo que GC+ e GC+CM, diferem estatisticamente dos demais grupos testados. Este resultado garante a validação do teste pelo grupo controle positivo, que utilizou a ciclofosfamida, um agente conhecidamente genotóxico e assim, confirmando que o controle positivo utilizando os padrões cromatográficos representando os compostos majoritários do óleo do orégano é positivo (genotóxico).

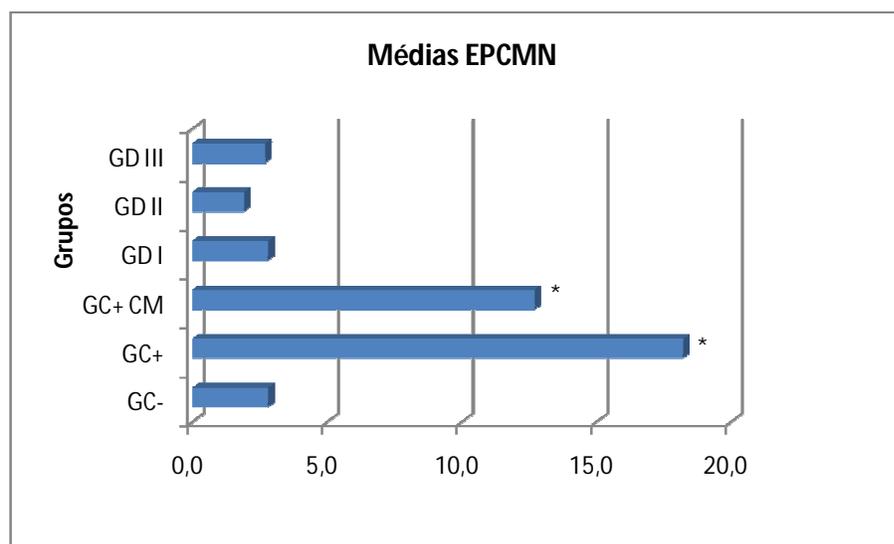


Figura 12 - Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, de machos tratados em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os composto majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

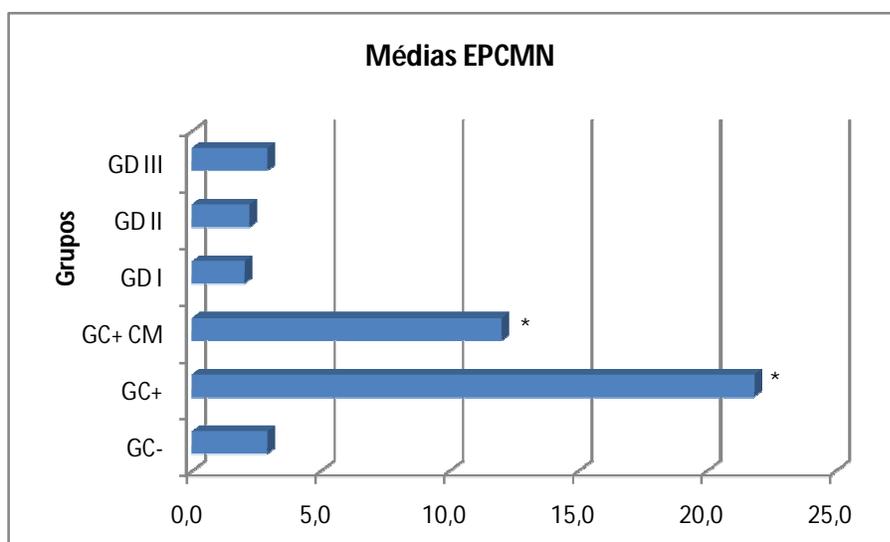


Figura 13 - Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, de fêmeas tratadas em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), um grupo controle negativo (GC-), um controle positivo ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

5. 6 Relação EPC/ENC

As Tabelas 2 e 3 revelam a relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos, determinados em cada lâmina de esfregaço sanguíneo, analisando-se 500 eritrócitos por lâmina (totalizando 1000 eritrócitos por animal) nos grupos experimentais. Machos e fêmeas foram tratados diariamente por via oral com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo utilizando os padrões cromatográficos representando os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM). Para realizar a análise estatística usou-se a variável rel_EPC_ENC, que é resultante da divisão da média EPC pela média ENC. Por sua vez, a média EPC é resultante da média entre EPC_direito e EPC_esquerdo de cada animal. Também de forma análoga, foi assim calculado a média de ENC. Realizando a Análise de Variância (ANOVA) observa-se que não existe efeito da interação entre tratamento e sexo (p=0,993). Não foi observada diferença de médias entre sexo (p=0,998).

Tabela 2 - Relação de EPC/ENC de machos tratados com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Grupos	GC-	GC+	GC+ CM	GD I	GD II	GD III
Médias ENC	116,6	167,1	295	307,9	340,3	306,7
Médias EPC	880,6	755,4	692,3	684,1	658,2	688,2
Relação EPC/ENC	0,88	0,76	0,69	0,68	0,66	0,69

Tabela 3 - Relação de EPC/ENC de fêmeas tratadas com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Grupos	GC-	GC+	GC+ CM	GD I	GD II	GD III
Médias ENC	109,4	73,2	254,3	346,1	337,6	304,5
Médias EPC	886,9	903,2	733,7	651,9	660,3	692,6
Relação EPC/ENC	0,89	0,90	0,73	0,65	0,66	0,69

As Tabelas 4 e 5 mostram a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados e a relação EPC/ENC encontrados nos 6 grupos de tratamento testados machos e fêmeas, tratadas com o óleo do orégano em diferentes dosagens, 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ (Dose I = GD I, Dose II = GD II, Dose III = GD III), respectivamente, um grupo controle negativo (GC-), um grupo controle positivo utilizando ciclofosfamida (GC+) e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo do orégano (GC+ CM).

Tabela 4 - Frequência e relação de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de ratos Wistar machos tratados com três diferentes concentrações da substância teste.

Tratamentos	n° EPCs analisados	n° EPCMNs	Relação EPC/ENC
GC-	10000	2,8	0,88
GC+	10000	18,2	0,76
GC+ CM	10000	12,7	0,69
GD I	10000	2,8	0,68
GD II	10000	1,9	0,66
GD III	10000	2,7	0,69

Tabela 5 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de ratos Wistar fêmeas tratadas com três diferentes concentrações da substância teste.

Tratamentos	n° EPCs analisados	n° EPCMNs	Relação EPC/ENC
GC-	10000	2,9	0,89
GC+	10000	21,8	0,90
GC+ CM	10000	12	0,73
GD I	10000	2	0,65
GD II	10000	2,2	0,66
GD III	10000	2,9	0,69

6 DISCUSSÃO

Este experimento testou o potencial genotóxico do óleo essencial do orégano em três diferentes doses, 2000, 1000 e 500 mg.Kg⁻¹ comparadas a um controle negativo, um controle positivo ciclofosfamida, e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo essencial do orégano por via oral em ratos Wistar. A análise dos resultados obtidos indica que o óleo essencial do orégano utilizado não apresentou genotoxicidade nas doses e condições testadas.

Os resultados deste experimento estão de acordo com os observados por Ipek e colaboradores (2005) que através do teste AMES Salmonela afirmaram que o óleo essencial de *Origanum onites* L. não é genotóxico. Assim como Mezzoug e colaboradores (2007) que avaliaram a atividade antimutagênica pelo teste SMART em *Drosophila melanogaster*, do óleo essencial de *Origanum compactum*.

6.1 A escolha do teste de genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar foi de rápida execução, fácil realização e com baixo custo. A espécie utilizada (*Rattus norvegicus*) também trouxe benefícios, pois são ratos dóceis e respondem bem a manipulação regular, adaptáveis a novos ambientes e bastante prolíferos.

Na avaliação genotóxica, há a necessidade de testes rápidos e confiáveis que detectem os danos genéticos. O Teste do Micronúcleo encontrou seu lugar em biomonitoramento, como um teste que oferece um procedimento técnico mais fácil em relação aos ensaios de aberrações cromossômicas (CAs), pois os micronúcleos (MNs) são mais fáceis de observar e contar do que as CAs (FLORES e YAMAGUCHI, 2008).

O aspecto mais importante do Teste do Micronúcleo é que permite identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, por isso é capaz de expressar os danos no cromossomo como MNs. Assim, o teste do MN é originalmente, entre os testes citogênicos, o que fornece uma medida de confiança da perda do cromossomo e da ruptura (FENECH, 1998).

Comparado com outros testes citogenéticos, o teste do MN apresenta algumas vantagens, incluindo baixo custo, rapidez de análise para triagem de grande número de

substâncias. É capaz de considerar e avaliar as diferentes fases da farmacocinética das drogas, avaliada nos cromossomos se possui reprodutibilidade satisfatória, já que foi adaptado por vários autores ao estudo em diferentes espécies (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas pode ser usada como indicativo para o câncer, considerando que os testes medem um evento iniciante e intermediário na tumorigênese, e considerando a existência de altas associações entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, em roedores e no homem. Como um resultado destas considerações, os testes de toxicidade genética, incluindo o Teste do Micronúcleo *in vivo*, são usados, rotineiramente, para uma avaliação toxicológica inicial no desenvolvimento de agentes químicos e medicamentos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

6. 2 Desenvolvimento ponderal

O acompanhamento do peso corporal durante o período de tratamento fornece um indicador do estado de saúde dos animais, o que pode fornecer informações importantes no que diz respeito à toxicidade (EPA, 1996). Neste experimento que testou a genotoxicidade do óleo essencial de orégano em três diferentes dosagens, o desenvolvimento ponderal dos animais durante o tratamento não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Este resultado fortalece a hipótese de ausência de toxicidade nos animais tratados durante o período do tratamento do teste de micronúcleos, o que é indispensável para a validação dos resultados (OECD, 1997). A toxicidade, nesse caso, é baseada na presença de sinais clínicos como diarreia, falta de vontade de comer ou beber água, perda de peso, ou depressão da medula óssea, durante o estudo. Embora a dose mais alta testada tenha sido a DMT, ela não deve exceder 2.000 mg/kg/dia. Por isso, foi usado um teste piloto com a finalidade de identificar a dose máxima tolerada (DMT) da substância teste, sem acusar toxicidade excessiva (OECD, 1997).

6. 3 Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN)

Segundo Ribeiro e colaboradores (2003) o principal resultado do teste de micronúcleos é a frequência de EPC que contém pelo menos 1 micronúcleo

(frequência de EPC micronucleado). No entanto, a distribuição de micronúcleo entre as células pode ter valor na identificação de mecanismos.

MacGregor e colaboradores (1987) reuniram em um documento diretrizes para a realização do teste de micronúcleos em medula óssea, seleção de espécies animais, dose, métodos de amostragem e de contagem, e delineamento estatístico para análise de ensaios de genotoxicidade em que o ponto final é a medida da frequência de micronúcleos de eritrócitos na medula óssea de mamíferos.

Neste teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar, tratados com o óleo essencial do orégano em três dosagens diferentes, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) dos grupos tratados com o grupo controle negativo, revelando não haver genotoxicidade no óleo essencial. No entanto, o controle positivo compostos majoritários foi diferente do controle negativo nos EPCMN, mostrando efeito genotóxico. Os resultados obtidos estão de acordo com Karpouhtsis e colaboradores (1998), que revelaram que entre os compostos fenólicos extraídos do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) e avaliados pelo teste de mutação e recombinação somática em *Drosophila* apenas o timol exibe atividade genotóxica. E com os resultados de Fletcher e colaboradores (2005) que avaliaram óleos de *Melaleuca angustifolia* e também do principal componente do óleo, o 4-terpineol, através do teste de AMES, os resultados mostraram que o 4-terpineol só apresentou toxicidade na maior dose utilizada.

Segundo Ribeiro e colaboradores (2003) métodos estatísticos podem ser usados para avaliar os resultados do teste, contudo, a análise estatística não deve ser o único critério para a determinação de uma resposta positiva. A relevância biológica dos resultados também deve ser levada em conta. Os critérios para se determinar um resultado como positivo devem incluir um aumento na frequência de PCEMN relacionado à dose, ou um aumento claro na frequência de PCEMN na dose mais alta.

De acordo com a resolução 474/OECD (1997) existem vários critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento dose-dependente em o número de micronúcleos ou um claro aumento do número de micronúcleos em grupo de dose única em uma determinada amostra e os métodos estatísticos podem ser utilizados como um auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, a significância estatística não deve ser o único fator determinante para uma resposta positiva.

A constatação de que uma substância aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados indica que a substância tenha interferido na divisão nuclear dos eritroblastos da medula óssea de forma que os fragmentos de cromatina ou cromossomos inteiros tenham ficado na anáfase e não conseguiram ser incorporados em um dos núcleos da célula filha. Agentes que quebram cromossomos ou interferem com o conjunto do eixo ou função são conhecidos por induzir micronúcleos como resultado do atraso na anáfase dos fragmentos acêntricos e cromossomos translocados, podendo ser individual ou de cromossomos inteiros. O ensaio do micronúcleo fornece um índice conveniente desses tipos de danos e de um método rápido de identificação dos agentes com potencial para induzir estes tipos de danos. Uma elevada frequência de micronúcleos sugere fortemente que um desses tipos de dano ocorreu (MacGREGOR, *et al.*, 1987).

6. 4 A relação EPC/ENC

Além da frequência de EPCs micronucleados, o índice de EPC aos outros eritrócitos devem ser determinados. Uma redução acentuada na frequência de EPC indica a inibição da divisão e maturação das células nucleadas na eritropoiese (MacGREGOR, *et al.*, 1987).

A percentagem de EPC entre o total de eritrócitos (EPC+ENC), ou seja, a relação EPC/ENC deve ser determinada a fim de se avaliar a citotoxicidade na medula óssea, podendo, também, ser usada para documentar a biodisponibilidade da substância química teste no tecido alvo. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem de EPC (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Segundo documento da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, Umbuzeiro e colaboradores (2004) ressaltam que para a segurança da substância teste, a proporção de EPC não pode ser menor que 20% do valor encontrado no grupo controle negativo, ao contrário, a dose utilizada pode ser tóxica.

A proporção EPC entre os outros eritrócitos, no presente estudo, revelou uma diminuição na contagem de eritrócitos policromáticos em relação ao controle negativo, em todas as doses testadas, em machos e fêmeas. O grupo controle que usou os compostos majoritários também teve diminuição na contagem, mas apenas nos machos. Estes resultados revelam que as doses testadas do óleo essencial de orégano e os seus

compostos majoritários causaram uma leve toxicidade na medula óssea dos animais e a ausência de sinais clínicos de toxicidade durante o estudo reforçam este resultado, já que a substância deprimiu a medula óssea sem causar sinais clínicos desta depressão.

Muitas espécies vegetais e óleos essenciais foram avaliados quanto à mutagenicidade, apresentando resultados negativos. Como exemplo, pode-se citar derivados antraquinônicos de *Aloe vera* L. que foram avaliados através do teste de AMES com as linhagens TA1535, TA1537, TA98 e TA100 na concentração de 5mg/placa. Foi observada atividade mutagênica na cepa TA1537. É uma planta bastante usada em preparados farmacêuticos e cosméticos (PARRA *et al.*, 2000).

Ocimum basilicum L. é uma planta usada (sob a forma de infuso) na medicina tradicional como antiespasmódica, carminativa, contra catarros e desintéria. O extrato etanólico 70% foi avaliado pelo teste de AMES, apresentando respostas positivas, para as cepas de *S. typhimurium* TA98 com ativação metabólica e TA1535 sem ativação metabólica (LOPEZ *et al.*, 2000).

De Paula e colaboradores (2007) investigaram a composição química e mutagenicidade dos óleos essenciais de *Ocimum selloi* nativos do Sul do Brasil, através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar. O óleo essencial designado como quimiotipo A teve como constituintes majoritários o chavicol metila ou estragol (46,33%), trans-anetol (31,20%) e germacreno D (6,37%). O quimiotipo B apresentou como principais constituintes o metil eugenol (45,17%), trans-cariofileno (43,52%) e isoaromadendrene (4,83%). Os resultados obtidos na avaliação *in vivo* de mutagenicidade do estragol e do eugenol indicam que nenhum dos quimiotipos estudados apresentou atividade mutagênica.

Ozaki e colaboradores (2002) avaliaram a genotoxicidade do extrato dos frutos de gardênia, através do teste de Ames, empregando as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*, com e sem ativação metabólica (S9). Os resultados demonstraram que o extrato não apresentou atividade mutagênica.

Fonseca (2008) avaliou o potencial mutagênico, antimutagênico e genotóxico do óleo essencial de *Citrus aurantium*, utilizando o teste do cometa em células da mucosa gástrica e o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar. Os resultados mostraram que os tratamentos com três níveis de doses do óleo essencial (125, 250 e 500 mg/kg, vo) não aumentaram a frequência de reticulócitos micronucleados, o que indica ausência de efeito mutagênico deste óleo.

Fletcher e colaboradores (2005) demonstraram pelo teste de AMES que nem o óleo de *tea tree* nem 4-terpineol mostrou ter a capacidade de induzir mutações em qualquer uma das cepas teste, confirmando que não são mutagênicos ou cancerígenos. No entanto, as doses mais elevadas do óleo de *tea tree* e do 4-terpineol exerceram seus efeitos tóxicos em todas as linhagens.

Alguns estudos mostraram evidências negativas do potencial genotóxico *in vivo* do eugenol (MAURA *et al.*, 1989; ABRAHAM, 2001). Também foi relatado que alguns óleos essenciais tiveram efeito antígenotóxico (IPEK *et al.*, 2005; AYDIN *et al.*, 2005). E foi encontrado apenas um estudo comprovando o efeito genotóxico em medula óssea *in vivo* do timol e carvacrol (AZIRAK e RENCUZOGULLARI, 2008).

Os óleos essenciais (EOs) obtidos a partir do orégano *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus* e *Satureja thymbra* foram examinadas por GCMS demonstrando que foram carvacrol, timol, γ -terpinene e *p*-cimeno os principais constituintes encontrados. Estes óleos e seus principais constituintes, carvacrol e timol, foram testados para a atividade inseticida e genotóxicas em *Drosophila*. A mutação somática e teste de recombinação em *Drosophila* revelaram que, entre os cinco compostos estudados, apenas o timol exibiu atividade genotóxica (KARPOUHTSIS *et al.*, 1998).

6.5 Compostos majoritários

O grupo controle positivo que continha os compostos majoritários do óleo essencial do orégano, se comportou neste estudo, de maneira semelhante aos grupos tratados com o óleo essencial no que diz respeito a leve toxicidade na medula óssea. Isto vem confirmar que alguns compostos, como o timol, utilizado isoladamente podem causar toxicidade, como está descrito na literatura. No entanto, o 4-terpineol, pela revisão de literatura, não demonstrou ter efeito tóxico isoladamente, a não ser em altas concentrações (FLETCHER *et al.*, 2005).

Os efeitos genotóxicos do timol foram investigados em linfócitos periféricos humanos tratados nas concentrações de timol: 25, 50, 75, e 100 mg/ml por 24 e 48 h de tratamento usando troca de cromátides irmãs (SCE), aberrações cromossômicas (CA), e do teste de micronúcleos (MN). índice de divisão nuclear (NDI), o índice de replicação (IR) e índice mitótico (IM) foram calculados para determinar a citotoxicidade do timol. Timol induziu CA estrutural e frequência de MN em todas as concentrações. O timol

dose-dependentemente reduziu a NDI nos dois períodos de tratamento. O tratamento com timol diminuiu o IR para o tempo de tratamento de 24 h sem qualquer significância estatística. Entretanto, timol diminuiu o IR para o tempo de tratamento 48h em uma maneira dose-dependente. O timol também diminuiu o IM na maior concentração sem efeito dose-dependente (BUYUKLEYLA e RENCUZOGULLARI, 2009). Neste estudo, timol teve um efeito significativamente clastogênico. No entanto, ele não teve um efeito aneugênico BUYUKLEYLA e RENCUZOGULLARI, 2009).

Azirak e Rencuzogullari (2008) relataram que tanto carvacrol e timol induziram CA estruturais numéricas e totais, nas células de medula óssea de ratos e que carvacrol e timol têm efeito citotóxico, diminuindo o IA. Como resultado, timol induziu quebras em DNA de cadeia única e de cadeia dupla e também causou um aumento na frequência de mutações cromossômicas em cromátides irmãs. Resultados mostraram que o timol, muito provavelmente, tem um risco genotóxico.

O timol interage com os sistemas celulares, alterando a estrutura, função e resposta da célula de produtos celulares. Os danos causados por timol afetam a taxa de síntese de DNA, causando aberrações estruturais e mutação dos cromossomos e influencia o processo de divisão celular (AZIRAK e RENCUZOGULLARI, 2008).

6. 6 Considerações finais

O potencial do óleo essencial de *Origanum vulgare L.* e de outros óleos essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos está bastante explícito em pesquisas recentes. Henriques e colaboradores (2009) ressaltam o efeito sinérgico entre os componentes da mistura complexa que constituem os óleos essenciais, chegando frequentemente a mais de 50 substâncias, sendo assim, a utilização do óleo como um todo parece ser o caminho mais adequado, embora algumas substâncias isoladas que ocorrem em quantidades relevantes em algumas espécies da planta possam ser consideradas.

Inúmeros produtos de uso veterinário contêm em sua formulação óleos essenciais ou produtos isolados, seja como ativos ou como adjuvantes. Pode-se citar preparações para uso externo, contendo cânfora e pomadas, cremes ou outras formulações terapêuticas contendo óleo de citronela, portanto, o mercado fitoterápico existe e necessita de novas estratégias para aumentar e diversificar a eficiência farmacológica.

Este teste de genotoxicidade realizado com o óleo essencial do orégano é relevante, pois vem contribuir para as pesquisas com produtos naturais, com mais um dado para a segurança deste óleo essencial. No entanto, ainda são necessários outros testes de genotoxicidade e de toxicidade, para garantir a segurança do óleo essencial de orégano.

7 CONCLUSÃO

O óleo do orégano extraído e analisado por cromatografia gasosa com detecção de massa. Os picos cromatográficos revelaram que os compostos majoritários presentes no óleo foram os monoterpenos timol e 4-terpineol.

Na realização do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar, utilizando o óleo essencial do orégano nas doses: 2000, 1000 e 500 mg.Kg⁻¹ e um controle positivo com os compostos majoritários do óleo essencial do orégano, é possível concluir que:

- O óleo essencial do orégano, nas doses testadas, não afetou o desenvolvimento ponderal de ratos machos e fêmeas tratados durante o período experimental.
- O óleo essencial do orégano não induziu genotoxicidade nos eritrócitos medulares de ratos Wistar nas concentrações avaliadas, já que não aumentou a frequência de EPCMN na medula óssea.
- O controle positivo com os compostos majoritários induziu genotoxicidade nos eritrócitos dos ratos, induzindo aumento dos eritrócitos policromáticos micronucleados.
- Através da análise da proporção de EPC entre os eritrócitos, o óleo essencial do orégano e o controle positivo com os compostos majoritários causaram uma leve toxicidade na medula óssea de ratos Wistar, por meio de uma leve depressão na medula óssea.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 39, p. 493–498, 2001.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALVARENGO, M. C. *et al.* **Teste de micronúcleos em medula óssea de ratos alimentados com arroz em diferentes níveis de polimento.** CIC UCPEL, Pelotas, 2009.
- AMARAL, V.S. **Monitoramento do impacto dos dejetos industriais em amostras de água do rio Caí, através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 74.
- AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**; v. 221(4617), p.1256-64, 1983.
- AMES, B. N. Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer. **Science**. v. 204, p. 587, 1979.
- AMZALLAG, G. N. *et al.* Soil microvariations as a source of variability in the wild: the case of secondary metabolism in *Origanum dayi* Post. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 6, p. 1235-1254, 2005.
- ARAÚJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; DE – CARVALHO, R.R.; CURIAMA, S.N.; RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embriofetotoxicity of α -terpinene in the rat. **Food chem toxicol**, v. 34, p.477, 1996.
- ARCILA-LOZANO, C. C. *et al.* El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Alan**, v. 54, n. 1, 2004.
- ARORA, S. *et al.* Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. v. 24, p. 193-200, 2005.
- AYDIN, S.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. **Mutat Res-Genetic Toxicol Environ Mutagen**, v. 581, p. 43–53, 2005.
- AZIRAK, S., RENCUZOGULLARI, E. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. **Environ.Toxicol**. Published online in Wiley InterScience, p. 728 – 735, 2008.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17(3), p. 444-447, 2007.

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.; CHATZPOULOU, P.S.; TSILIGIANNI, T.; SPAIS, A.B. 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.

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

BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, p. 211-218, 2007.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Chicago, v. 15, p. 169-172, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução 104/99, de 26/04/1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 14/05/99, 1999.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. From commercial racemic fragrances to odour active enantiopure compounds: the ten isomers of irone. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 14, n. 1, 2003.

BUSSATA, C. *et al.* Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, 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.

CALUCCI, L. *et al.* Effects of γ – irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 51, p. 927-934, 2003.

CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica (Seleção de métodos e técnicas de laboratório das parasitoses humanas)**. São Paulo: Atheneu, p. 296 – 297, 2001.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Mediciniais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. ed. Agropecuária. Guaíba, p. 9-10, 1995.

CAVALCANTE, I. M. S. M. *et al.* **Potencial mutagênico (teste de micronúcleo) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *L. organoides***. Piauí, 2009.

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

CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em Medicina Veterinária com ênfase em *Candida* spp.** Tese de Doutorado, PPGCV, UFRGS, Porto Alegre, 2008. p. 129.

CLEFF, M. B. *et al.* Toxicidade Pré-Clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (orégano) em Ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, Pelotas, v. 27, n. 5, p. 704-709, 2008.

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

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, p.249 – 261, 2004.

COLLINS, A.; DUSINSKA, M. *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen**, v. 30, p. 130 – 146, 1997.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: ciência e desenvolvimento**. v.3, p. 24-26, 2000.

DEGRANDI, T. H. **Toxicidade genética do ditelureto de difenila: um estudo empregando modelos biológicos procaríotos e eucariotos**. Dissertação de Mestrado, PPGGBM, UFRGS, Porto Alegre, 2009. p. 130.

De PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; RIBAS, J. L.C. *In vivo* Evaluation of the Mutagenic Potential of Estragole and Eugenol Chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. Essential Oil. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26 (6), p. 846-51, 2007.

DIEL, P.; SMOLNIKAR, K.; MICHNA, H. *In Vitro* Test Systems for the Evaluation of the Estrogenic Activity of Natural Products. **Planta Med.** v. 65, p. 197-203, 1999.

DORMAN, H. J. D.; SURAI, P.; DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **J. Essenc. Oil Res.**, v. 12, n. 2, p. 241-248, 2000.

ELGORASHI, E. E. *et al.* Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol Lett.** v. 143, p. 195-207, 2003.

ELLIS, N. A.; CIOCCI, S.; GERMAN, J. "Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells". **Hum Genet** 108. 2, p. 167-73, 2001.

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

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat Res.**, v. 404, p. 155-165, 1998.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.**, 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, 2, p. 1084-1104, 2007.

FLETCHER, J. P. *et al.* 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.

FLORES. M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FONSECA, V. B. **Avaliação do potencial toxicogenético e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L. *In vivo***. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2008. p. 37.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol.**, v. 22, p. 255, 2002.

GIANNENAS, I. P. *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.; 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 Chem Toxicol**, v. 43, p. 247, 2005.

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

GUENTHER, A. Modeling biogenic volatile organic compound emissions to the atmosphere. In: **Reactive hydrocarbons in the atmosphere** (C. N. Hewitt, ed.). Academic Press, London, p. 97, 1999.

GUIMARÃES, P.I.C., OLIVEIRA, R.I.C.; ABREU, R.G. Extrairdo óleos essenciais de plantas. **Química Nova na Escola**, n. 11, 2000.

HAMMER, K. A. *et al.* A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil. **Food Chem toxicol**, v. 44, 616, 2005.

- HAYASHI, M. *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutat. Rés.**, 312, p. 293-304, 1994.
- HAYES, A. J.; LEACH, D. N.; MARKHAM, J. L. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. **J essent oil res**, 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., ed. Univali, Itajaí, p. 221-249, 2009.
- HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSSEN, J.; GEISSEN W. J. A concise review of DNA damage checkpoints e repair in mammalian cells. **Cardiovasc Revasc Med** 7, p. 165-172, 2006.
- IARC. D – limonene. **Risk Hum**, v. 73, p. 307, 1999.
- IPEK, I. *et al.* Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry**, v.93, p. 551–556, 2005.
- JEGGO, P. A.; LOBRICH, M. Contribution of DNA repair e cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. **DNA Repair (Amst)** 5, p. 1192-1198, 2006.
- KARPOUHTSIS, I. *et al.* Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 1111-1115, 1998.
- KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; VOKOU, D. Patterno f geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. **Bioch System Ecol.** v. 22, p. 517-528, 1994.
- KONSTANTOPOLOU, I.; VASSILOPOLOV, L.; MAVIAGANITSIPIDO, U.; SCOURAS, Z.G. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, v. 48, p.616-9, 1992.
- LAM, L. K. T.; ZHENG, B. Effects of essential oils of glutathione -S-transferase activity in mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 660-662, 1991.
- LEROI, A. **Mutants: On the form, varieties & errors of the human body**. Harper Collins, 1, p. 16-17, 2003.
- LOMBARDI, F. R.; RIBEIRO, A. N.; RODRIGUES, C. E. **Câncer: bases genéticas, desenvolvimento e metástases**. Trabalho de conclusão de curso de graduação. UNILINS, SP, 2009. p. 54.
- LOPES, S. **Bio: volume único**. 2. ed. – São Paulo: Saraiva, 2008.

LOPEZ, A. G. L.; PARRA, A. V.; RUIZ A. R.; *et al.* Estudio toxicogenético de um extrato fluido de *Ocimum basilicum* L.(albahaca branca). **Rev Cubana Plant Med**, v. 5(3), p.78-83, 2000.

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

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat. Res.** v.334, p. 185-195, 1995.

MACGREGOR, J. T. *et al.* Guidehnes for the conduct of micronucleus assays in mammalian boné marrow erythrocytes. **Mutat. Rés.**, 189, p. 103-112, 1987.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat Res**, v. 113(3-4), p.173-215, 1983.

MATEUCA, R. *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 88, p. 1515-1531, 2006.

MAURA, A.; PINO, A.; RICCI, R. Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. **Mutat Res**, v. 227, p.125–129, 1989.

MEZZOUG, N. *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, Issue 2, p. 100-110, 2007.

MIKLOS, G.L.G.; RUBIN, G.M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organism. **Cell**. v. 86, p. 521 – 529, 1996.

MIKOS, J.; HARKENTHAL, T. H. L. M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. **Planta Med**, v. 66, p. 366, 2000.

NETO, J. X. A. *et al.* Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 5, n. 2, 2005.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 edição, ed. Univali, Itajaí, c. 10, 2009.

OECD – Guideline for The Testing of Chemicals. Method 474 “**Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**” (Adopted: 21st July 1997).

OUSSALAH, M. *et al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:h7, *Salmonella Tiphymurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. **Food Control**. v. 18, p. 414-420, 2007.

OZAKI, A.; KITANO, M.; FURUSAWA, N.; *et al.* Genotoxicity of gardenia yellow and its components. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p.1603–1610, 2002.

PARRA, A. V.; LOPEZ, A. G.; RUIZ, A. R.; *et al.* Derivados antraquinónicos del *Aloe vera* l. Tamizaje genotóxico. **Rev Cubana Plant Med**, v. 5(2), p. 46-50, 2000.

PEREIRA, K. D. *et al.* Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* do cloridrato de mepivacaína 2% associado à epinefrina. **55º Congresso Brasileiro de Genética**, São Paulo, 2009. p. 106.

PINHATTI, V. R. **Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanilhidrazonas**. Dissertação de Mestrado, PPGBCM, UFRGS. Porto Alegre, 2009. p. 94.

Portal São Francisco. **Orégano**. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/oregano/oregano.php>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

PURVES, D. *et al.* Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**. v. 10, n. 4, p. 297-312, 1995.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutagênese Ambiental**. ed. ULBRA. Canoas, 2003.

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

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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3042 – 3047, 2004.

ROSA, R. M. **Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do diseleneto de difenila em células de mamíferos**. Tese de Doutorado, PPGCB:B, UFRGS. Porto Alegre, 2008. p. 171.

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**. 56, p. 2-9, 2004.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9 – 15, 1975.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. ed. UFRGS/ed. UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, p. 468-495, 2003.

SOUZA, E. L. *et al.* Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SOUZA, L. S. *et al.* Teste do micronúcleo em medula óssea de soja convencional e transgênica. **55º Congresso Brasileiro de Genética**. São Paulo, 2009. p. 97.

SOUZA, S. R. *et al.* Emissão por folhas de *Ficus benjamina* L. (Moraceae) de compostos orgânicos voláteis oxigenados. **Revista Brasil Bot.** v. 25, p.413, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica**, 4 ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 776, 1996.

TAKAHASHI, C. S. *et al.* **Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo**. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>. Acesso em: 10 out. 2004.

TSINAS, A. C. The art of oregano. **Grain Feed & Milling Technology**, p. 25-26, 1999.

UMBUZEIRO, G. A. *et al.* Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microssoma. In: **Série Documentos SBMCTA** - n. 1, 2004.

VAGI, E. *et al.* Phenolic and tripterpenoid antioxidant from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 17-21, 2005.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, June 2005. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026&lng=en&nrm=iso>. access on 21 Dec. 2010.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O; *et al.* *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598, 2001.

VICHI, S. *et al.* Deterioration of the presence of antioxidants deriving from sage and orégano extracts added to animal fat means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis. **Nahrung-Food**, v. 45, n. 2, p. 101-104, 2001.

VILLELA, I. V. **Avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais da região hidrográfica da bacia do lago Guaíba**. Tese de Doutorado, PPGBCM, UFRGS. Porto Alegre, 2006. p. 153.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Argos: Chapecó, p. 500, 2001.

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